

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

campus GOVERNADOR VALADARES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**ÁQUILA RODRIGUES COSTA SANTOS**

**AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA, COMPORTAMENTAL E DE EXPRESSÃO  
GÊNICA DO RECEPTOR GABA<sub>A</sub> NO HIPOTÁLAMO DORSOMEDIAL EM  
RESPOSTA AO ESTRESSE EM RATOS OBESOS**

GOVERNADOR VALADARES

2019

**ÁQUILA RODRIGUES COSTA SANTOS**

**AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA, COMPORTAMENTAL E DE EXPRESSÃO  
GÊNICA DO RECEPTOR GABA<sub>A</sub> NO HIPOTÁLAMO DORSOMEDIAL EM  
RESPOSTA AO ESTRESSE EM RATOS OBESOS**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora –campus Governador Valadares, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Cibele Velloso Rodrigues  
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga da Silva Junior  
Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes  
Co-orientadora: Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira

GOVERNADOR VALADARES

2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Santos, Áquila Rodrigues Costa.

Avaliação fisiológica, comportamental e de expressão gênica do receptor GABAA no hipotálamo dorsomedial em resposta ao estresse em ratos obesos / Áquila Rodrigues Costa Santos. -- 2019. 86 p.

Orientadora: Cibele Velloso Rodrigues

Coorientador: Helena Coutinho F de Oliveira

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2019.

1. obesidade. 2. hipotálamo dorsomedial. 3. GABA. 4. estresse. I. Rodrigues, Cibele Velloso , orient. II. Oliveira, Helena Coutinho F de , coorient. III. Título.

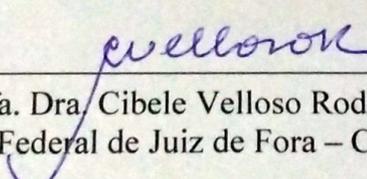
ÁQUILA RODRIGUES COSTA SANTOS

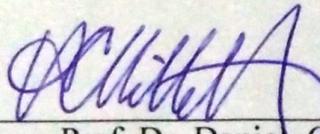
**AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA, COMPORTAMENTAL E DE  
EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR GABA<sub>A</sub> NO HIPOTÁLAMO  
DORSOMEDIAL EM RESPOSTA AO ESTRESSE EM RATOS OBESOS**

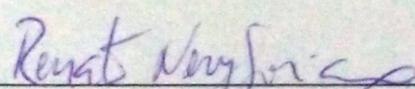
Dissertação de mestrado apresentado ao programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora –campus Governador Valadares, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Aprovado em 12 de ABRIL de 2019

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Cibele Velloso Rodrigues – Orientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Daniel Campos Villela  
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – Campus JK

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Renato Nery Soriano  
Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus pais, Otoni e Leni, que são minha  
principal fonte de inspiração, coragem e persistência.**

**À minha avó, Maria da Conceição Costa (*in memoriam*), por ter sido  
uma grande amiga e que sempre será minha eterna saudade.**

**Ao meu noivo, Lander, por todo apoio, carinho e companheirismo.**

## AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Cibele, por acreditar e confiar na minha capacidade de realizar este trabalho. Com ela eu aprendi sobre como ser ético, dedicada e sobre a importância que temos na formação de pessoas. Obrigada por todo ensinamento e experiência compartilhada!

Ao professor Dr. Luiz Gonzaga, pela constante motivação e por ter me dado a oportunidade de crescer profissionalmente e como pessoa. Ele abriu diversas portas, me fez enfrentar desafios e não mediu esforços para que isto ocorresse.

Ao professor Dr. Rodrigo Cunha, por todo apoio ao projeto, pelos ensinamentos e auxílio. E principalmente, por ter me permitido fazer parte do laboratório de fisiologia cardiovascular (LFC) da UFOP.

Aos alunos do LFC – UFOP que me auxiliaram de diversas formas. Por todo conhecimento compartilhado, paciência, apoio, palavras de incentivo e pelas despedidas carinhosas. Muito obrigada Aline Rezende, Aline Mariah, Érika Monteiro, Fabiana Rodrigues, Fernanda Ferreira, Fernanda Silva, Gabriela Carvalho, Glenda Viggiano, Laura Batista, Lucas Gabriel, Máira Talma, Mariana Guedes, Sylvana Noronha e Thayane Reis.

Aos técnicos do LFC Sra. Marly Lessa e Sr. Milton de Paula, por terem sido tão solidários e carinhosos comigo. Por todo auxílio, ensinamentos, palavras de conforto e alegria transmitida.

Aos moradores da minha casa em Ouro Preto, Elzi e Maurício. Não poderia ter me encontrado em ambiente melhor. Elzi que é uma mulher que eu admiro, batalhadora e que transmite muita luz. Tornou-se uma grande amiga pela qual, nunca deixarei de sentir saudades. Maurício, aluno estudioso, dedicado e ainda cozinheiro. Tornou-se também um amigo. Nosso lar sempre esteve repleto de admiração, companheirismo e respeito mútuo. Sou muito grata.

Ao professor Dr. Robson Santos e ao laboratório de hipertensão da UFMG, por me permitirem utilizar equipamentos para realização da expressão gênica e além de todo apoio. Um agradecimento especial à professora Dra. Daisy Motta, que me recebeu com muita simpatia e com quem aprendi tanto sobre ser uma profissional humilde, empolgada, proativa e competente.

Aos amigos do núcleo de pesquisa em nutrição e genética. Pelo amparo e incentivo desde o início da caminhada. Prof. Antônio Frederico, Profa. Maria Anete, Nilcemar Rodrigues, Thaísa Netto, Andreza Brito, Bianca Lima, Brisa Machado, Cleonice Souza e Natália Smider.

Também não posso deixar de agradecer as pessoas que me deram as primeiras oportunidades no ramo da pesquisa: Profa. Dra. Gabriella Freitas e Profa. Dra. Andrea Monteiro. Não tenho palavras para agradecer todas as oportunidades de aprendizado, convivência, trabalho em grupo e amizades que me foram dadas. Agradecer também ao Prof. Dr. Marcus Vinicius e Profa. Dra. Lúcia que, também, me deram espaços para atuar em seus projetos, de modo que eu pudesse crescer profissionalmente.

Aos meus pais, Otoni e Leni, a base de toda minha formação. A vocês nunca será suficiente tudo que eu possa fazer para agradecer o constante apoio, a educação que me foi dada e por acreditaram tanto em mim.

Agradecer pela estadia durante os experimentos na UFMG, à minha irmã Aquidauana e meu cunhado Lucas. Fizeram de tudo para que eu me sentisse em casa e que não achasse que estava os incomodando. Além dos jantares maravilhosos. Sou grata pela hospitalidade e pelos quilos adquiridos.

À minha irmã Ágatha, minha avó Neuza e também a todos os amigos, amigas, familiares, que de alguma forma me apoiaram e contribuíram nessa jornada. Obrigada por entenderem minha ausência!

Ao meu noivo, Lander, que mesmo a distância, nunca deixou de me apoiar e incentivar. Ainda que estivesse enfrentando, também, novos desafios e eu com pouco tempo livre, não mediu esforços para me ver e me acompanhar nos trabalhos em alguns finais de semana e feriados. Obrigada pelo carinho, amor e companheirismo.

Aos meus amigos de turma pelo companheirismo e amizade, Vanessa, Bolívar, Domício e Márcio.

Agradecer pelos serviços, disponibilidade e amizade: Joyce e Oyama.

À Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira, pelo aceite da co-orientação e sugestões.

Agradecimentos aos apoiadores: SBBq/PMBqBM, UFOP e UFMG.

Agradecimentos aos financiadores: FAPEMIG/PPSUS/MS/CNPq- CDS APQ 03522-13, FINEP-CT-INFRA e UFJF-PROPP.

Sou grata a todos, meu muito obrigada!

## RESUMO

A obesidade e o estresse estão diretamente relacionados a doenças cardiovasculares. Durante o estresse ocorre um aumento de débito cardíaco, pressão arterial e temperatura corporal. O hipotálamo dorsomedial (HDM) é essencial para a integração das respostas fisiológicas e comportamentais ao estresse emocional e nos transtornos de ansiedade. O envolvimento do HDM em transtornos de ansiedade e no estresse está relacionado a redução hipotalâmica na neurotransmissão GABAérgica em ratos. Porém, não se conhece o mecanismo que gera o comprometimento dessa neurotransmissão em ratos obesos. Desta forma, o objetivo foi avaliar os efeitos da obesidade na resposta ao estresse agudo em ratos nas variáveis frequência cardíaca (FC), temperatura corporal interna (TCI), estado de ansiedade e pânico e nível de expressão gênica do receptor GABA<sub>A</sub> em comparação com ratos não obesos. Para tanto, ratos Wistar foram alimentados com dieta controle (Nuvilab®) ou Dieta Hiperlipídica (DH) 45% Kcal/g de lipídio por nove semanas. Em seguida, foram implantados sensores para obter valores de FC e TCI. Após sete dias de recuperação, registros dos valores foram realizados durante 20 min de tempo basal de todos os animais, 30 min durante o estresse social por rato intruso nos animais do grupo controle submetido ao estresse (CE) e obeso submetido ao estresse (OE), 30 min em animais que não foram submetidos ao estresse, controle não submetido ao estresse (CNE) e obeso não submetido ao estresse (ONE) e 30 min finais para todos. Concomitantemente, fotografias infravermelhas foram tiradas para avaliação da temperatura da cauda e da região do dorso dos animais. Posteriormente, avaliaram-se o tempo de permanência no labirinto em T-elevado (LTE) e o número de quadrantes percorridos no campo aberto (CA) em animais CE e OE. O RNA dos tecidos do HDM de todos os animais foram extraídos, seguido de RT-PCR e qPCR para análise da expressão gênica da subunidade delta do receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA). A DH foi eficiente em induzir a obesidade, por meio do aumento significativo no ganho de peso, massa gorda, índice de adiposidade, tecidos adiposos brancos epididimal, retroperitoneal, inguinal e no tecido adiposo marrom dos animais obesos em comparação aos animais do grupo controle. Os resultados mostraram que animais obesos submetidos ao estresse apresentaram aumento de FC, TCI, temperatura da cauda. Nos testes comportamentais, o animal obeso apresentou um aumento na primeira exposição ao braço fechado (comportamento do tipo ansiogênico). Os grupos não diferiram em relação ao comportamento do tipo pânico e ao teste CA. O nível de expressão gênica da subunidade delta do receptor do ácido gama-aminobutírico não se mostrou alterado entre os grupos. O presente estudo colabora com a literatura por investigar simultaneamente os parâmetros da FC, TCI,

temperatura da cauda, temperatura do dorso e comportamentais em animais obesos submetidos ao estresse.

Palavras-chave: obesidade, hipotálamo dorsomedial, GABA, estresse.

## ABSTRACT

Obesity and stress are directly related to cardiovascular diseases. During stress there is an increase in cardiac output, blood pressure and body temperature. The dorsomedial hypothalamus (DMH) is essential for the integration of physiological and behavioral responses to emotional stress and anxiety disorders. The involvement of DHM in anxiety disorders and stress is related to hypothalamic reduction in GABAergic neurotransmission. However, the mechanism that causes neurotransmission impairment in obese rats is not known. Thus, the objective was to evaluate the effects of obesity on acute stress response in rats in the variables heart rate(HR), internal body temperature (IBT), anxiety and panic state, and level of GABA<sub>A</sub> receptor gene expression compared to non-obese rats. For this, Wistar rats were fed a control diet (Nuvilab®) or Hyperlipid Diet (HD) 45% Kcal / g lipid, both for nine weeks. Then, sensors were implanted to obtain values of HR and IBT. After seven days of recovery, values were recorded for 20 min of baseline time of all animals, 30 min during social stress by intruding rat in the animals of the control group submitted to stress (CE) and obese subject to stress (OE) , 30 min in animals that were not submitted to stress, control not submitted to stress (CNE) and obese without stress (ONE) and 30 min final for all. At the same time, infrared photographs were taken to evaluate the temperature of the tail and the back region of the animals. Subsequently, the time of stay in the elevated t- maze (ETM) and the number of quadrants traveled in the open field (OF) in CS and OS animals were evaluated. RNA from the DHM tissues of all animals were extracted, followed by RT-PCR and qPCR for analysis of the gamma-aminobutyric acid receptor (GABA) delta subunit gene expression. DH was efficient in inducing obesity through a significant increase in weight gain, fat mass, adiposity index, white adipose tissue epididimal, retroperitoneal, inguinal and brown adipose tissue of obese animals compared to control animals. The results showed that obese animals submitted to stress showed increased HR, IBT, tail temperature. In the behavioral tests, the obese animal showed an increase in the first exposure to the closed arm (anxiety-like behavior). The groups did not differ in relation to the panic-like behavior and the CA test. The level of gene expression of the delta subunit of the gamma-aminobutyric acid receptor was not altered between the groups. The present study collaborates with the literature investigating simultaneously the parameters of the HR, IBT, tail temperature, temperature of the back and behavioral in obese animals submitted to stress.

Key-words: obesity, dorsomedial hypothalamus, GABA, stress.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Imagem ilustrando a base utilizada para confecção dos sensores e suas respectivas ligações para Frequência cardíaca (FC) e Temperatura corporal interna (TCI).....	30
<b>Figura 2:</b> Imagem ilustrando os sensores de Frequência cardíaca (FC) e Temperatura corporal interna (TCI).....	30
<b>Figura 3:</b> Imagem ilustrativa das regiões tricotomizadas e de alojamento dos sensores de Frequência cardíaca (FC) e Temperatura corporal interna (TCI).....	32
<b>Figura 4:</b> Imagem ilustrativa demonstrando a região onde fica localizada a base dos sensores.....	32
<b>Figura 5:</b> Escala temporal do protocolo de registro dos animais submetidos ou não ao estresse.....	34
<b>Figura 6:</b> Desenho esquemático do procedimento de estresse social por “rato intruso”. O animal analisado em questão é colocado em uma caixa na qual está alojado outro animal, mas sem contato direto, já que o segundo se encontra dentro de uma gaiola.....	34
<b>Figura 7:</b> Imagem ilustrativa do Labirinto em T-Elevado. O aparato é obtido por meio da selagem de um dos braços fechados do Labirinto em Cruz, resultando assim em um braço fechado perpendicular a dois braços abertos.....	36
<b>Figura 8:</b> Imagem ilustrativa do Campo Aberto. A arena possui quatro paredes perpendiculares e a superfície é subdividida em dezesseis quadrantes.....	38
<b>Figura 9:</b> Representação aproximada dos cortes e região do hipotálamo dorsomedial removida por método de micro punch.....	40
<b>Figura 10:</b> Desenho esquemático do fluxo experimental 1.....	42
<b>Figura 11:</b> Desenho esquemático do fluxo experimental 2.....	43
<b>Figura 12:</b> Desenho esquemático do fluxo experimental 3.....	44
<b>Figura 13:</b> Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse no parâmetro cardiovascular de Frequência Cardíaca (FC). (A) Representa médias de FC (bpm: Batimentos	

por minuto) obtidas nos animais não submetidos ao estresse dos grupos controle e obeso. (B) Representa as médias de FC dos animais pertencentes aos grupos controle e obeso submetidos ao estresse. N: Número de animais por grupo. Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. \*Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).....47

**Figura 14:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse no parâmetro cardiovascular de Frequência Cardíaca (FC). (A) Delta de maior variação de FC que corresponde o pico do estresse subtraído pela média dos valores de estabilização inicial (seis minutos). (B) Delta dos seis minutos finais de FC que corresponde à média dos seis minutos finais subtraído pela média dos valores basais. Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. \*Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).....48

**Figura 15:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse no parâmetro cardiovascular de Frequência Cardíaca (FC). Valores da FC sobre a área sob a curva dos animais que foram submetidos ao estresse. P: Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).....49

**Figura 16:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse na Temperatura Corporal Interna (TCI). (A) Representa médias da TCI obtidas nos animais não submetidos ao estresse dos grupos controle e obeso. (B) Representa as médias da TCI dos animais pertencentes aos grupos controle e obeso submetidos ao estresse. N: Número de animais por grupo. Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. \*Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).....50

**Figura 17:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura corporal interna (TCI). (A) Delta de maior variação da TCI que corresponde o pico do estresse subtraído pela média dos valores de estabilização inicial (seis minutos). (B) Delta dos seis minutos finais da TCI que corresponde à média dos seis minutos finais subtraído pela média dos valores basais. Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. \*Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).....52

**Figura 18:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura corporal interna (TCI). Valores da TCI sobre a área sob a curva dos animais que foram submetidos ao estresse. P: Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).....53

**Figura 19:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura da cauda. (A) Representa médias obtidas da temperatura da cauda dos animais não submetidos ao estresse dos grupos controle e obeso. N: Número de animais por grupo. Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM). Em (B) animais do grupo controle e em (C) animais do grupo obesos. As fotos são originais com luz infravermelha mostrando as alterações da temperatura da cauda em animais não submetidos ao estresse durante os experimentos. Sp1: Marcador do local mensurado de temperatura e valor obtido no momento da fotografia.....55

**Figura 20:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura da cauda. (A) Representa médias obtidas da temperatura da cauda dos animais submetidos ao estresse dos grupos controle e obeso. N: Número de animais por grupo. Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM). \*Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Em (B) animais do grupo controle e em (C) animais do grupo obeso. As fotos são originais com luz infravermelha mostrando as alterações da temperatura da cauda em animais submetidos ao estresse durante os experimentos. Sp1: Marcador do local mensurado de temperatura e valor obtido no momento da fotografia.....56

**Figura 21:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura da cauda. (A) Delta de maior variação da temperatura da cauda que corresponde o pico do estresse subtraído pela média dos valores de estabilização inicial (seis minutos). (B) Delta dos seis minutos finais da temperatura da cauda que corresponde à média dos seis minutos finais subtraído pela média dos valores basais. Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. \*Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).....57

**Figura 22:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura da cauda sobre a área sob a curva dos animais que foram submetidos ao estresse. P: Diferença

significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).....58

**Figura 23:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura do dorso dos animais. (A) Representa médias obtidas da temperatura do dorso dos animais não submetidos ao estresse dos grupos controle e obeso. N: Número de animais por grupo. Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. \*Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM). Em (B) animais do grupo controle e em (C) animais do grupo obesos. As fotos são originais com luz infravermelha mostrando as alterações da temperatura do dorso dos animais não submetidos ao estresse durante os experimentos. Sp1: Marcador do local mensurado de temperatura e valor obtido no momento da fotografia.....59

**Figura 24:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura do dorso dos animais. (A) Representa médias obtidas da temperatura do dorso dos animais submetidos ao estresse dos grupos controle e obeso. N: Número de animais por grupo. Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM). Em (B) animais do grupo controle e em (C) animais do grupo obesos. As fotos são originais com luz infravermelha mostrando as alterações da temperatura do dorso dos animais submetidos ao estresse durante os experimentos. Sp1: Marcador do local mensurado de temperatura e valor obtido no momento da fotografia.....60

**Figura 25:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura do dorso (A) Delta de maior variação da temperatura da cauda que corresponde o pico do estresse subtraído pela média dos valores de estabilização inicial (seis minutos). (B) Delta dos seis minutos finais da temperatura da cauda que corresponde à média dos seis minutos finais subtraído pela média dos valores basais. Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. \*Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).....62

**Figura 26:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura do dorso sobre a área sob a curva dos animais que foram submetidos ao estresse. P: Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).....63

**Figura 27:** Resultados dos experimentos que mediram o tempo de latência das tentativas de esquiva inibitória e fuga nos animais dos grupos Controle sob estresse (CE) e Obeso sob estresse (OE. N: Número de animais por grupo. LB: Linha de base. E: Esquiva. F: Fuga. Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. \*Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).....64

**Figura 28:** Resultado do número de quadrantes percorridos pelos animais dos grupos Controle sob estresse (CE) e obeso submetido ao estresse (OE) no campo aberto. N: Número de animais por grupo. Analisados pelo teste estatístico t de Student – não pareado. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).....65

**Figura 29:** Resultados da expressão relativa GABA<sub>A</sub>. Método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).....65

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Dados do Gene avaliado para níveis de expressão gênica.....	40
<b>Tabela 2:</b> Efeito da dieta hiperlipídica sobre o perfil nutricional de ratos Wistar após realização do protocolo nutricional de nove semanas.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

(BPM)	Batimentos por minuto
(BMI)	Metiodeto de Bicuculina
(CA)	Campo Aberto
(cDNA)	DNA complementar
(CE)	Controle submetido ao Estresse
(CNE)	Controle não submetido ao Estresse
(DH)	Dieta Hiperlipídica
(DNA)	Ácido Desoxirribonucleico
(FC)	Frequência Cardíaca
(GABA)	Ácido Gama-Amino-Butírico
(GAD)	Enzima Ácido Glutâmico Descarboxilase
(HDM)	Hipotálamo Dorsomedial
(HPA)	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
(IA)	Índice de adiposidade
(Kcal/g)	Quilocaloria/Grama
(IL)	Índice de Lee
(LCE)	Labirinto em Cruz
(LTE)	Labirinto em T-elevado
(MG)	Massa Gorda Total
(OE)	Obeso submetido ao Estresse
(ONE)	Obeso não submetido ao Estresse
(OMS)	Organização Mundial da Saúde
(qPCR)	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
(PA)	Pressão arterial
(PAM)	Pressão arterial média
(PVN)	Núcleohipotalâmico paraventricular
(RID)	Região interescapular dorsal
(RNA)	Ácido ribonucleico
(RT-PCR)	Transcriptase reversa – Reação em cadeia da polimerase
(SNAS)	Sistema nervoso autonômico simpático
(SNC)	Sistema nervoso central
(TCI)	Temperatura corporal interna

(VIGITEL) Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por  
Inquérito Telefônico

(VMH) Núcleo hipotalâmico ventromedial

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1 Obesidade.....	19
1.2 Estresse.....	20
1.3 Estresse e obesidade.....	21
1.4 Estresse, hipotálamo dorsomedial e obesidade.....	22
<b>2 OBJETIVO.....</b>	<b>26</b>
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>27</b>
3.1 Modelo animal.....	27
3.2 Dieta.....	27
3.3 Desenvolvimento da obesidade induzida por dieta hiperlipídica.....	27
3.4 Drogas e soluções utilizadas durante a experimentação animal.....	28
3.5 Confeção dos sensores.....	29
3.6 Procedimentos cirúrgicos.....	31
3.7 Cuidados pós-operatórios.....	32
3.8 Registro do parâmetro cardiovascular de frequência cardíaca (FC) e temperatura corporal interna (TCI).....	33
3.9 Registro de temperatura da cauda e região interescapular dorsal.....	33
3.10 Modelo de estresse por animal intruso.....	33
3.11 Testes comportamentais.....	34
3.11.1 Labirinto em T-Elevado (LTE).....	35
3.11.2 Teste de atividade locomotora.....	37
3.12 Avaliação dos níveis de Expressão gênica no HDM.....	38
3.12.1 Extrações de RNA.....	38

3.12.2 Síntese de cDNA.....	39
3.12.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real – qPCR.....	39
3.13 Análises de dados e estatística.....	40
3.14 Fluxogramas experimentais.....	42
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
4.1 Desenvolvimento da obesidade induzida por dieta hiperlipídica.....	45
4.2 Efeito da obesidade em resposta ao estresse no parâmetro cardiovascular de frequência cardíaca.....	46
4.3 Efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura corporal interna.....	49
4.4 Efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura da cauda.....	53
4.5 Efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura da região interescapular dorsal.....	58
4.6 Testes comportamentais.....	63
4.6.1 Labirinto em T-Elevado (LTE).....	63
4.6.2 Teste de atividade locomotora.....	64
4.7 Expressão gênica.....	65
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Obesidade

A obesidade é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como o acúmulo excessivo de gordura, podendo ter como causa o desequilíbrio energético entre calorias consumidas e calorias gastas, resultando em graves problemas de saúde (OMS 2017). É considerada uma doença crônica, de etiologia multifatorial, envolvendo fatores genéticos, ambientais, socioeconômicos, psicossociais e culturais (ABALLAY *et al.*, 2013; SINHA; JASTREBOFF, 2013; WANDERLEY; FERREIR; 2010).

A prevalência da obesidade e do sobrepeso vem atingindo proporções alarmantes em muitos países. Dados da OMS, relataram que em 2016, mais de 1,9 bilhões de adultos com 18 anos ou mais, estavam acima do peso e mais de 650 milhões eram indivíduos obesos. Além disso, a obesidade mundial quase triplicou desde 1975 (OMS, 2017). Projeções recentes indicam que a prevalência global da obesidade atingirá 18% nos homens e ultrapassará 21% nas mulheres até 2025 (NCD RiskFactorCollaboration, 2016).

No Brasil, o Ministério da Saúde realizou um estudo onde mais da metade da população brasileira encontrava-se acima do peso. Segundo a pesquisa, a população com excesso de peso cresceu 26,3% em dez anos. No ano de 2006, 42,6% da população estava acima do peso. Esse número passou para 53,8% em 2016. Além disso, o número de pessoas que estava na faixa de obesidade, cresceu 60% em dez anos, passando de 11,8% em 2006 para 18,9% em 2016. Os dados foram coletados pela Vigitel (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), levantamento realizado em 26 capitais brasileiras e no Distrito Federal (BRASIL, 2017).

A obesidade, especialmente o tipo central ou visceral, é um desafio global para saúde pública, estando relacionada a uma grande diversidade de doenças. Alterações na função cardíaca, hipertensão arterial, dislipidemia e diabetes estão presentes em grande proporção em indivíduos com sobrepeso (ABALLAY *et al.*, 2013; BARROSO *et al.*, 2018). Essas disfunções, além de aumentar a morbi-mortalidade, também geram altos custos aos sistemas de saúde (OMS, 2017).

## 1.2 Estresse

O corpo mantém seu equilíbrio dinâmico por meio de vários mecanismos de regulação da homeostase. Mudanças internas e externas são sempre proporcionadas para manter ou restabelecê-la. O estresse pode ser definido como a resposta a qualquer fator que ameace e/ou sobrecarregue as habilidades compensatórias do corpo para manter a homeostase (FOSS; DYRSTAD, 2011; PACÁK; PALKOVITS, 2001; TORRES; NOWSON, 2007).

Os seguintes agentes agressores podem induzir uma resposta: estressores físicos (trauma, cirurgia e calor intenso ou frio); estressores químicos (oferta reduzida de oxigênio e desequilíbrio ácido-base); estressores fisiológicos (exercício pesado, choque hemorrágico e dor); estressores psicológicos ou emocionais (ansiedade, medo e tristeza); e estressores sociais (conflitos pessoais e mudança de estilo de vida) (PACÁK; PALKOVITS, 2001; TORRES; NOWSON, 2007; VRIENDT; MORENO; HENAUW, 2009;).

Os estressores podem ser de curta duração (estresse agudo) ou ocorrer cronicamente (TORRES; NOWSON, 2007). As reações aos estressores envolvem um mecanismo fisiológico complexo, ainda não completamente entendido, que consiste, em parte, na ativação do sistema nervoso autonômico simpático (SNAS), importante para o mecanismo de luta ou fuga (FOSS; DYRSTAD, 2011). Ocorre um aumento no débito cardíaco assim como da pressão arterial e temperatura corporal; e a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), que libera glicocorticoides, secretados pelo córtex da adrenal, exercendo efeitos sobre o metabolismo da glicose estimulando a quebra das proteínas e convertendo-as em glicose, disponibilizando os estoques de nutrientes dos músculos a fim de fornecer energia necessária ao organismo quando este se encontra diante de uma situação estressora (ABREU *et al.*, 2014; FOSS; DYRSTAD, 2011; SINHA, R; JASTREBOFF, A 2013; TORRES; NOWSON, 2007).

Um dos mecanismos que ocorre nos mamíferos durante o estresse é aumento da temperatura corporal (GORDON, 1990). A temperatura é estritamente regulada em organismos homeotérmicos, já que todas as reações bioquímicas e funções fisiológicas são amplamente dependentes da sua constância (AIHARA *et al.*, 2001; WASSERTROM, J; VITES, A. 1999; WENISCH *et al.*, 1996). O aumento da temperatura corporal durante o estresse é denominado de hipertermia induzida por estresse ou hipertermia emocional (REIS, 2018). Em ratos, esse fenômeno ocorre por meio de mecanismos ainda não totalmente elucidados, mediados pela combinação da termogênese do tecido adiposo marrom e da cauda do animal (BLESSING *et*

*al.*, 2016; KATAOKA *et al.*, 2016; MOHAMMED *et al.*, 2013; NAKAMURA *et al.*, 2015;). A cauda do rato possui um tecido altamente vascularizado que permite a alteração do fluxo sanguíneo durante situações de estresse. A cauda é caracterizada por ausência de pelos, grande razão superfície/volume, densa rede de vasos sanguíneos e presença de anastomoses arteriovenosas, sendo importante para a troca de calor com o meio ambiente, contribuindo com a dissipação do calor produzido (ROMANOVSKY *et al.*, 2002).

Outros mecanismos importantes acerca do estresse são o aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial (ABREU *et al.*, 2014). Em virtude principalmente a essas alterações, o estresse tem sido correlacionado ao risco cardiovascular e determinados estressores tornaram-se presentes de forma contínua na sociedade moderna. Devido a isso, há uma constante ativação das vias neuronais para adaptação compensatória, o que compromete a integridade fisiológica do organismo (MESQUITA *et al.*, 2016).

### **1.3 Estresse e obesidade**

A exposição aguda ou crônica ao estresse evoca respostas fisiológicas e comportamentais que alteram significativamente o estado metabólico e comportamental em humanos e animais (DALLMAN *et al.*, 2003; SINHA, R; JASTREBOFF, A 2013).

Estudos realizados com modelo de estresse agudo, relataram algumas alterações fisiológicas em animais roedores (DE MENEZES *et al.*, 2008 ; DIMICCO *et al.*, 2002; STOTZ-POTTER; MORIN; DIMICCO, 1996; MESQUITA *et al.*, 2017). Isso também foi demonstrado em roedores obesos (ABREU *et al.*, 2014).

A ativação induzida pelo estresse do eixo neuroendócrino (HPA) aumenta a síntese de glicocorticóides e a disponibilidade de glicose para suprir as demandas metabólicas de outras respostas de estresse fisiológico e comportamental (SINHA, R; JASTREBOFF, A 2013). Contudo, os glicocorticóides também regulam o acúmulo e o armazenamento de gordura corporal e podem aumentar o apetite, a ingestão de alimentos e o ganho de peso corporal, especialmente quando seu aumento ocorre por longo período. Além disso, o estresse pode alterar tanto a quantidade quanto a qualidade das calorias consumidas, e as alterações induzidas pelo estresse na ingestão alimentar e no balanço energético podem interagir com o estado emocional do indivíduo (EPEL *et al.*, 2001; GROESZ *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2013; LAUGERO *et al.*, 2011).

Embora as associações funcionais entre estresse emocional, ingestão de alimentos/balço energético sejam prontamente aparentes, os mecanismos que os ligam não são totalmente compreendidos. Estudos apoiam a tese de que o estresse pode aumentar ou diminuir a ingestão calórica (BAZHAN; ZELENÁ, 2013; MIKOLAJCZYK; ANSARI; MAXWELL, 2009). Outros estudos indicam ainda que a exposição ao estresse crônico pode promover a obesidade em certos ambientes alimentares (HABHAB; SHELDON; LOEB, 2009; SERLACHIUS; HAMER; WARDLE, 2007; SINHA, R; JASTREBOFF, A 2013; TRYON *et al.*, 2013; ZELLNER *et al.*, 2006).

Embora importante para a sobrevivência do indivíduo, no sentido de propiciar, pelo sistema nervoso central (SNC), mudanças em diversas variáveis fisiológicas, a exposição crônica a situações estressantes pode levar a alterações sustentadas no aumento da pressão arterial (PA) e no aumento da frequência cardíaca (FC), resultando em doenças cardiovasculares, como hipertensão, arritmias cardíacas e infarto do miocárdio (ABREU *et al.*, 2014; TORRES; NOWSON, 2007; LAMPERT *et al.*, 2016). Este aumento na ativação simpática tem sido considerado um fator chave no desenvolvimento da hipertensão em pacientes obesos (MASUO *et al.*, 2001).

A obesidade, assim como o estresse, estão relacionados a alterações fisiopatológicas no sistema cardiovascular. Indivíduos obesos ou sob estresse emocional têm maior predisposição ao desenvolvimento de hipertensão arterial, arritmias cardíacas e infarto do miocárdio em comparação a indivíduos não obesos ou não sujeitos a estresse crônico (ALBERT *et al.*, 2017; PÉREZ *et al.*, 2007; STEPTOE; KIVIMÄKI, 2012). Interessantemente, a obesidade está relacionada a maior ativação das vias neurais responsáveis pelas respostas ao estresse (ABREU *et al.*, 2014), embora essa relação ainda não seja bem compreendida.

Recente estudo indica que a obesidade também é fator contribuinte para o desenvolvimento de ansiedade em ratos (NORONHA, 2017).

#### **1.4 Estresse, hipotálamo dorsomedial e obesidade**

A ingestão de alimentos e o apetite são regulados por conexões neuronais entre as regiões do hipotálamo, tronco cerebral e centros corticais. O hipotálamo regula diretamente a percepção da fome, o comportamento relativo à ingestão de alimento e o balanço energético do

organismo (JAUCH-CHARA; OLTMANN, 2014; SUZUKI *et al.*, 2010). Além disso, evidências científicas demonstraram que o hipotálamo é uma região importante na integração das respostas autonômicas e comportamentais ao estresse emocional (BERNARDIS; BELLINGER, 1998; PACÁK; PALKOVITS, 2001).

O hipotálamo é dividido em vários sub-núcleos que apresentam relações e funções muitas vezes distintas (SAPER; LOWELL, 2014). Dentre eles, alguns têm sido apontados como mediadores da resposta fisiológica ao estresse, como o hipotálamo dorsomedial (HDM) (DIMICCO *et al.*, 2002; STOTZ-POTTER; MORIN; DIMICCO, 1996). O HDM se encontra adjacente ao terceiro ventrículo, caudalmente ao núcleo hipotalâmico paraventricular (PVN), dorsalmente ao núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH) e ventralmente ao trato mamilotalâmico. Lateralmente é delimitado pelo fórnix e pela área hipotalâmica lateral (THOMPSON *et al.*, 1996).

Estudos sugerem que o HDM é essencial para a integração das respostas fisiológicas e comportamentais ao estresse emocional (FONTES *et al.*, 2006; FONTES *et al.*, 2011), respostas defensivas, integração de respostas inatas, formação de memória ao medo (BERGADO-ACOSTA *et al.*, 2014), e nos transtornos de ansiedade (JOHNSON; SHEKHAR, 2006; NASCIMENTO; ZANGROSSI JUNIOR; VIANA, 2010).

O SNC, bem como os núcleos hipotalâmicos, são tonicamente inibidos pelo ácido gama-amino-butírico (GABA) (DIMICCO *et al.*, 2002; MÖHLER, 2012). O GABA, é produzido a partir do glutamato pela enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD). Este parece desempenhar um papel fundamental na formação das respostas de medo, incluindo sua aquisição, tempo de armazenamento e subsequente modulação (BERGADO-ACOSTA *et al.*, 2014). Alguns estudos mostram que a resposta ao estresse é resultado da retirada do tônus GABAérgico da região hipotalâmica, em especial o HDM. Experimentalmente, microinjeções no HDM de ratos do antagonista do receptor GABA<sub>A</sub>, metiodeto de bicuculina (BMI), produzem uma resposta cardiovascular e comportamental semelhante à observada durante reações de estresse. De maneira contrária, a utilização do agonista GABA<sub>A</sub>, muscimol, nessa mesma região inibe a resposta cardiovascular e comportamental produzidas durante a indução de estresse emocional em ratos (DA SILVA, *et al.* 2011; DE MENEZES *et al.*, 2008). Os neurônios gabaérgicos estão diretamente envolvidos nos circuitos relacionados à resposta de medo durante o estresse emocional/ambiental, e o comprometimento deste mecanismo parece

estar envolvido em transtornos de ansiedade, tanto em roedores quanto em humanos (BERGADO-ACOSTA *et al.*, 2014).

Abreu *et al.* (2014) analisaram se as alterações na composição da dieta poderiam ter relação com as alterações neuroendócrinas, e ainda se a obesidade induzida por uma dieta hiperlipídica (DH) (45% de gordura) seria capaz de comprometer os mecanismos de controle da reatividade neuronal do HDM na regulação de respostas cardiovasculares ao estresse emocional. Neste estudo, a inibição química bilateral do HDM por meio da microinjeção do agonista GABA<sub>A</sub> muscimol mostrou-se ineficiente em conter o aumento da pressão arterial média (PAM), bem como de sustentar a resposta inicial de redução da frequência cardíaca (FC) em ratos obesos submetidos ao estresse por jato de ar. Por outro lado, a desinibição química dos receptores no HDM, realizado por meio de microinjeção do antagonista GABA<sub>A</sub> BMI, foi eficiente em aumentar a PAM e a FC. Entretanto, este aumento foi exacerbado e de curta duração em animais obesos. Contudo, observou-se que os animais induzidos à obesidade por DH apresentaram um maior aumento da resposta taquicárdica à BMI. Os dados demonstraram um possível efeito do comprometimento gerado pela obesidade na regulação GABAérgica do HDM nestes animais.

De Menezes *et al.* (2009) demonstraram que a estimulação química de neurônios na coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal, além de aumentar a FC e a PAM, também aumentou a temperatura corporal em ratos, e que essas mudanças dependiam da atividade neuronal no HDM. Além disso, no estudo realizado por Reis (2018) animais submetidos ao estresse apresentaram um aumento da temperatura corporal. Nesse sentido, questiona-se como seria a resposta da termorregulação em animais obesos submetidos ao estresse e o nível de expressão gênica do receptor GABA<sub>A</sub> nesses animais.

Além disso, diversos estudos sugerem que as anormalidades encefálicas dos neurotransmissores GABA são de extrema relevância na fisiopatologia do desenvolvimento de transtornos de ansiedade (SHEKHAR, 2006). Evidências demonstram que o aumento nos níveis de GABA no HDM relacionam-se com a diminuição da ansiedade, e contrariamente, o comprometimento da síntese deste neurotransmissor gera um aumento do comportamento de pânico, decorrente do predomínio excitatório da via glutamatérgica nesta região. Este contraste comportamental gerado pelas alterações GABAérgicas, seja por bloqueio e/ou inibição GABA, ou por indução da disfunção do HDM sugere um envolvimento crítico deste núcleo na

modulação dos comportamentos do tipo ansiedade generalizada e do tipo pânico nos diferentes modelos animais (FREITAS *et al.*, 2009; SHEKHAR, 1993).

No estudo realizado por Noronha *et al.* (2017), os animais foram tratados aleatoriamente com muscimol e BMI. O comportamento do tipo ansiedade foi analisado usando o aparato Labirinto em T- Elevado. Os resultados revelaram que a obesidade facilitou a aquisição de esquiva inibitória, sugerindo uma relação positiva entre a obesidade e o desenvolvimento de um estado de ansiedade. A injeção de muscimol no HDM aumentou a latência de esquiva inibitória em animais obesos (efeito ansiogênico). Além disso, o muscimol prolongou a latência de fuga e controlou o possível comportamento de pânico nesses animais. A injeção de BMI no HDM foi ineficaz em produzir um efeito semelhante à ansiedade em animais obesos, opondo-se aos resultados observados em animais não obesos. Estes resultados sustentam a hipótese de que os animais obesos são suscetíveis de desenvolver comportamentos semelhantes à ansiedade, provavelmente por alterações na neurotransmissão GABAérgica no HDM.

O GABA é considerado o mais importante neurotransmissor inibitório do SNC de mamíferos (VARDYA *et al.*, 2012). Os receptores GABA<sub>A</sub> são estruturas pentâmeras que possuem sua ação inibitória devido ao seu acoplamento a canais de Cl<sup>-</sup>, e são formados por diferentes subunidades, dentre elas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  (BRIONES-ARANDA; ROCHA; PICAZO, 2005). Estudos evidenciam que déficits na neurotransmissão mediada pelo GABA<sub>A</sub>R estão envolvidos na epilepsia, ansiedade, depressão, esquizofrenia e autismo (WU *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2019) e que a subunidade delta dos receptores GABA<sub>A</sub> é um alvo para modificar a atividade neuronal em uma série de distúrbios cerebrais (VARDYA *et al.*, 2012). Além disso, os receptores GABA<sub>A</sub> que contêm a subunidade delta são considerados fisiologicamente importantes em estudos realizados em várias regiões do cérebro (BRICKLEY *et al.*, 2001; CHANDRA *et al.*, 2006; VARDYA *et al.*, 2008; WAFFORD *et al.*, 2009).

Embora os recentes estudos tenham apontado a disfunção GABAérgica no HDM como promotora de estados de ansiedade e da exacerbação das alterações cardiovasculares em animais obesos, não se conhece o mecanismo que gera o comprometimento dessa neurotransmissão. Uma hipótese é que a obesidade poderia causar uma hiper-reatividade ao estresse devido a alteração da expressão do receptor GABA<sub>A</sub> em animais obesos.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos da obesidade na resposta ao estresse agudo em ratos nas variáveis frequência cardíaca, temperatura corporal, estado de ansiedade e pânico e nível de expressão gênica do receptor GABA<sub>A</sub> em comparação com ratos não obesos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar e comparar a sensibilidade dos animais obesos e não obesos nas respostas de frequência cardíaca, temperatura interna, temperatura da cauda e temperatura do dorso ao modelo de estresse emocional.
- Avaliar e comparar a sensibilidade dos animais obesos submetidos ao estresse e não obesos submetidos ao estresse nas respostas de latência nos braços fechados do labirinto em T (avaliação de ansiedade), tempo de saída do braço aberto do labirinto em T (avaliação de pânico) e atividade locomotora.
- Avaliar e comparar a mudança de expressão gênica da subunidade delta do Receptor do Ácido Gama-aminobutírico no HDM em ratos obesos submetidos ao estresse, em ratos obesos não submetidos ao estresse; ratos não obesos submetidos ao estresse e ratos não obesos não submetidos ao estresse.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Modelo animal**

Foram utilizados 59 ratos *Wistar*, com aproximadamente  $100 \pm 10$ g e com cinco semanas de idade provenientes do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA/UFOP). Todos os animais foram alojados coletivamente em caixas de acrílico com dimensões de 41x34x17cm. Estes animais permaneceram no CCA/UFOP durante nove semanas (relativas ao protocolo nutricional) e após este período foram transferidos para o Biotério de Experimentação do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFOP. Os procedimentos cirúrgicos e os testes comportamentais foram realizados no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFOP. Os animais, durante todo o período, foram mantidos sob temperatura controlada ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ), ciclo claro/escuro de 12 horas e acesso *ad libitum* à água e sua respectiva ração. O número de animais utilizados, bem como os procedimentos neles aplicados foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética da UFOP sob o protocolo CEUA/UFOP nº 2016/66, de acordo com as diretrizes da Lei 11.794, e regulamentadas pelo Guia de Uso e Cuidado de Animais de Laboratório do *National Research Council, EUA*.

#### **3.2 Dieta**

Os animais foram separados, aleatoriamente, em dois grupos dietéticos. Um dos grupos denominado grupo controle foi alimentado com ração comercial NUVILAB® (11% kcal/g de lipídio), com um total de calorias 339kcal/100g. O outro grupo composto por animais induzidos à obesidade foi alimentado com Dieta Hiperlipídica (DH) (45% Kcal/g de lipídio), desenvolvida pela equipe de pesquisadores do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFOP, com base na fórmula D12451 do laboratório *Research Diets, Inc*. O total de calorias da composição dessa dieta foi equivalente a 481 kcal/100g (ABREU *et al.*, 2014). A dieta foi produzida pela empresa *Prag Soluções Biociências, Comércio & Serviços Ltda.*, de acordo com a composição química e nutricional pré-estabelecidas.

Após protocolo nutricional de nove semanas, os animais foram submetidos à fase experimental, alojados individualmente após procedimento cirúrgico e continuaram a receber o mesmo tipo de ração.

#### **3.3 Desenvolvimento da obesidade induzida por dieta hiperlipídica**

Os animais submetidos à ingestão de DH com 45% de gordura foram comparados aos animais submetidos ao protocolo nutricional padrão para determinar a eficiência da indução da obesidade por essa dieta. Após o protocolo experimental, todos os animais (controle e obeso) foram pesados e sacrificados por decapitação.

Os tecidos adiposo branco epididimal, retroperitoneal e inguinal foram pesados para a determinação do índice de adiposidade (IA). A soma destes três tecidos representa a Massa Gorda total (MG) dos animais. Também foi pesado o tecido adiposo marrom.

Para determinar se os animais foram induzidos eficientemente à obesidade, utilizou-se o IA, determinado pela multiplicação da MG x 100 dividido pelo peso corporal final (MGx100/PCF), e o índice de Lee (ABREU *et al.*, 2014), que mensura o grau de obesidade por meio da divisão da raiz cúbica do PCF em gramas pelo comprimento naso-anal em milímetros e multiplicando-se por dez ( $[\sqrt[3]{\text{PCF}(\text{g}) \times \text{CNA}(\text{mm})}] \times 10$ ).

Todos os tecidos, após removidos e pesados, foram congelados imediatamente por meio de nitrogênio líquido e armazenados a -80°C em freezer.

### **3.4 Drogas e soluções utilizadas durante a experimentação animal**

**PBS (salina tamponada com fosfato; pH7,2):** a solução foi preparada a partir da diluição de 8,18g de NaCl P.A (SIGMA-ALDRICH, USA), 1,98g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O P.A. (Vetec Química Fina – SIGMA-ALDRICH, Brasil) e 0,26g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O P.A. (Vetec Química Fina – SIGMA-ALDRICH, Brasil) em água ultra-purificada (Milli – Q®) para um volume final de 1000mL. O pH (Sensoglass, Sensores Analíticos – Modelo SC02) da solução foi ajustado para 7,2 com soluções de HCl e NaOH. A solução foi esterilizada por autoclavação a 120°C e 1,0 Kg/cm<sup>2</sup> durante 20 minutos.

**Anestésico (Solução de Cetamina + Xilazina):** preparado por meio de adição de 3mL de Xilazina (Dopaser - Solução Injetável; Laboratórios Caller AS, Barcelona/Espanha) 3% (p/v) a 10mL de Cetamina (Cloridrato de Cetamina 10%; Syntec do Brasil Ltda, Fabricante: Rhobifarma Industria Farmacêutica Ltda, Hortolândia/São Paulo) 10% (p/v). O anestésico preparado foi utilizado da seguinte forma: dose (Cetamina: 80mg/kg; Xilazina: 7mg/kg) e volume (0,1mL/100g de animal; intramuscular (i.m)).

**Anestésico Local (Cloridrato de Lidocaína 2%):** no momento da utilização, diluíram-se 0,1mL do Cloridrato de Lidocaína 2% (Rhubifarma Indústria Farmacêutica LTDA, Hortolândia/São Paulo) em 0,2mL de PBS.

**Antibiótico (Pentabiótico Veterinário):** Constituído de Fortecilin Pequeno Porte, Penicilinas + Estreptomicina (Laboratório Bio-Vet S/A) e utilizado na prevenção de infecções no pós-operatório, na dose equivalente a 48.000UI de penicilina, 20mg de estreptomicina e 20mg de diidroestreptomicina/kg. Volume injetado: 0,1 mL/100g de animal por via intraintra-muscular (i.m).

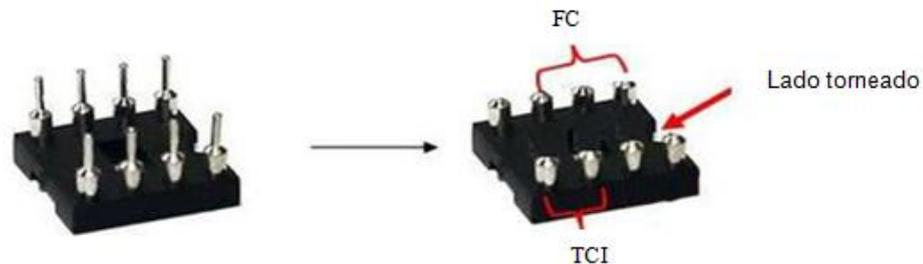
**Anti-inflamatório [Ketoflex 1% p/v (Cetoprofeno)]:** Anti-inflamatório à base de Cetoprofeno (Mundo Animal Veterinário Ltda.) utilizado com o objetivo de reduzir a inflamação e a dor decorrente dos procedimentos cirúrgicos. Utilizou-se o anti-inflamatório da seguinte forma: dose 4mg/Kg e volume 0,1 mL/100g de animal por via i.m.

### 3.5 Confeção dos sensores

Para realização dos sensores, utilizou-se o modelo de Ootsuka *et al.* (2009) com adaptações. Para confecção do sensor de temperatura utilizou-se um fio de aço inoxidável (New England Wire– N12-50F + 00006-0) duplo, trançado manualmente para temperatura corporal interna (TCI), acoplado a um termistor NTC 10KOhms (Fabricante Murata – série NCP). A capa de plástico protetora do fio foi retirada com auxílio de uma lâmina de bisturi e cada fio foi fixado respectivamente nas extremidades do termistor. Após o término do processo de soldagem, esses cabos foram testados com ajuda de um voltímetro, para análise de corrente elétrica. Os cabos foram revestidos com cola silicone em gel (Dow Corning 3145 RTV) de forma que este termistor ficasse bem protegido.

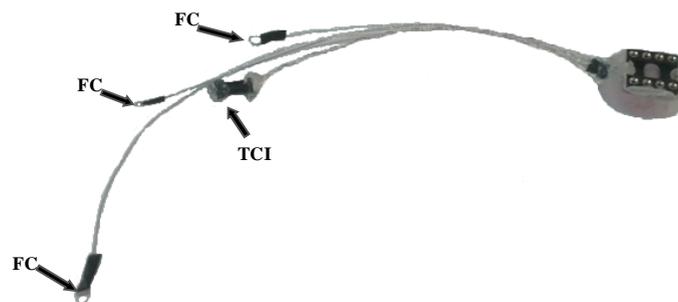
Para confecção do sensor de frequência cardíaca (FC) foi utilizado o mesmo fio de aço inox porém, não trançado. Para cada animal foi necessária a confecção de três fios de tamanhos diferentes. Sendo um fio para inserção no processo xifoide, outro na traqueia e por fim no dorso do animal. Esses fios foram soldados em uma base denominada soquete torneado de oito pinos (modelo CPT 008-BA). Nesta base foram cortadas as pontas dos pinos com ajuda de um alicate

e então soldado os sensores, sendo os de FC de um lado e de TCI de outro como ilustrado na Figura 1.



**Figura 1:** Imagem ilustrando a base utilizada para confecção dos sensores e suas respectivas ligações para Frequência cardíaca (FC) e Temperatura corporal interna (TCI).

Após a soldagem dos respectivos sensores na base do soquete, aplicou-se esmalte nas soldas, protegendo-as para que não soltassem. Foi preparada uma mistura de acrílico odontológico em pó e solvente para revestir toda a parte dos pinos, fazendo uma proteção, finalizando com cola silicone em gel para impermeabilizar entre a saída dos fios e a base de acrílico, impossibilitando assim a passagem de água.



**Figura 2:** Imagem ilustrando os sensores de Frequência cardíaca (FC) e Temperatura corporal interna (TCI).

Após a finalização e a secagem (Figura 2), foram realizadas calibrações dos pontos 33°C e 42°C de todos os sensores para confirmação dos valores de temperatura por meio de termômetro.

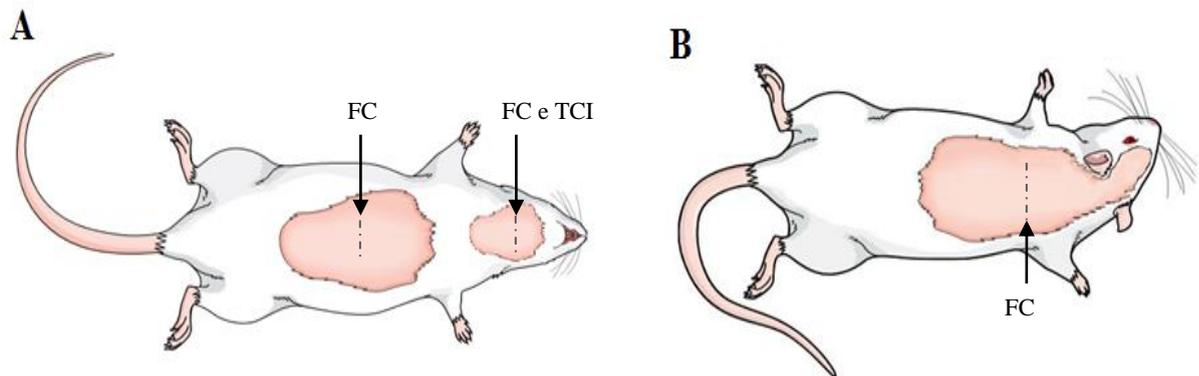
### 3.6 Procedimentos Cirúrgicos

Para os próximos procedimentos, os animais foram divididos em quatro grupos, sendo um grupo controle submetido ao estresse (CE) e outro grupo controle não submetido (CNE), um grupo obeso submetido ao estresse (OE) e outro grupo obeso não submetido (ONE). Todos os animais foram previamente submetidos a procedimento cirúrgico para implante de eletrodos conforme protocolo, adaptado de Ootsuka *et al.* (2009).

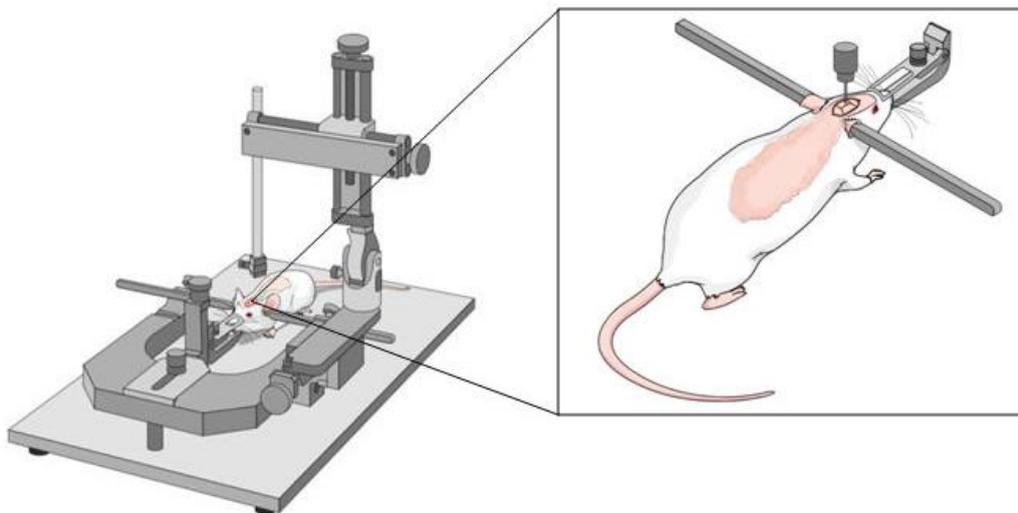
Após anestesia, foi realizada tricotomia da pele que recobre o crânio até o dorso e na região ventral, do apêndice xifoide e da região próxima à traqueia (Figura 3). Em seguida, os animais foram acomodados e fixados a um aparelho estereotáxico (Stoelting Co., Illinois, EUA) para a fixação do sensor na região superior do crânio entre os pavilhões auditivos. A região superior do crânio foi exposta a partir de uma incisão mediana. Dois orifícios foram feitos para a fixação de parafusos de aço inoxidável no crânio dos animais de modo a auxiliar na fixação do acrílico para sustentação do sensor (Figura 4). Foi feita uma pequena incisão na região próxima à escápula, por onde foi passado, no sentido crânio caudal, todos os fios do sensor. A base do sensor foi posicionada no centro da incisão realizada no crânio e fixada com acrílico odontológico e auxílio da torre do estereotáxico exercendo uma pressão em cima desta base. Com a base do sensor fixada, o animal foi retirado do aparelho estereotáxico e acomodado novamente na placa de suporte cirúrgico para dar continuidade aos procedimentos seguintes.

Para inserção do sensor de TCI e FC na traquéia, foi feita uma incisão para sua exposição. Com o auxílio de um trocáter e uma pinça hemostática, os sensores foram passados pelo tecido subcutâneo do animal, da região interescapular até sua exteriorização na região da traqueia. O sensor de temperatura foi alocado paralelamente à musculatura que protege a traqueia e o sensor de FC foi fixado ao músculo onde realizou-se a incisão para exposição da mesma.

Realizou-se uma pequena incisão na região do processo xifoide que foi exposto para fixação do sensor de FC. Com o auxílio do trocáter e da pinça hemostática, o sensor foi passado pelo tecido subcutâneo do animal da região interescapular até sua exteriorização na região do processo xifoide. O sensor foi fixado à cartilagem do processo xifoide.



**Figura 3:** Imagem ilustrativa das regiões tricotomizadas e de alocação dos sensores de Frequência cardíaca (FC) e Temperatura corporal interna (TCI).



**Figura 4:** Imagem ilustrativa demonstrando a região onde fica localizada a base dos sensores.

Por fim, o sensor de FC (terra) foi fixado no dorso do animal, mais precisamente na região interescapular. Ao final de cada implantação de sensor, todos os locais de incisões foram suturados.

### 3.7 Cuidados pós-operatórios

Após o término dos procedimentos cirúrgicos, os animais receberam injeção *i.m.* de cetoprofeno (Ketoflex®) e uma dose de antibiótico (Pentabiótico veterinário), para prevenção

de inflamação e infecção e foram mantidos sob manta térmica até o final do efeito anestésico. Essas injeções também foram administradas três dias após a cirurgia. Posteriormente, os animais foram mantidos na sala de experimentos sob condições controladas de temperatura, luminosidade e níveis de ruído com comida e água *ad libitum*.

### **3.8 Registro do parâmetro cardiovascular de frequência cardíaca (FC) e temperatura corporal interna (TCI)**

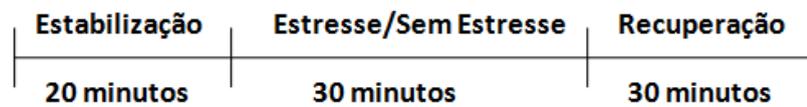
Para obtenção dos registros do parâmetro cardiovascular de FC e TCI, a base do sensor fixada na cabeça do animal foi conectada a um sistema de aquisição de dados e conversão analógico / digital) (Power Lab 4/20 ADInstruments), que possibilitou os registros de batimentos por minuto (bpm) e da temperatura em graus Celsius (°C). O software de leitura LabChart 7 - Windows realizou uma coleta contínua dos dados durante o experimento.

### **3.9 Registro de temperatura da cauda e região interescapular dorsal**

Com o propósito de mensurar e registrar os valores da temperatura da cauda e da região interescapular dorsal do animal (RID), as imagens termais foram obtidas com intervalos de um minuto simultaneamente aos registros. Foi utilizada a câmera de infravermelho FLIR modelo E40 e as análises das imagens foram realizadas pelo software FLIR. Durante todos experimentos a temperatura ambiente foi controlada e mantida em  $25\pm 1^\circ\text{C}$ .

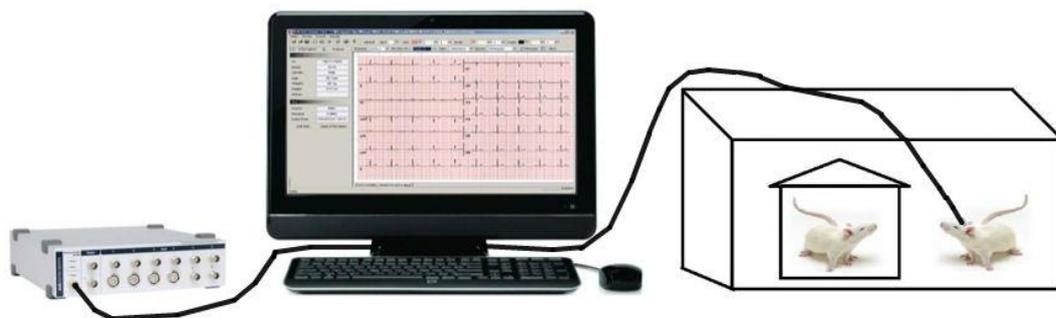
### **3.10 Modelo de estresse por animal intruso**

No protocolo experimental de estresse por animal intruso, os animais passaram por um período de estabilização para dar início aos registros da FC e da TCI. Em seguida, todos os animais tiveram 20 minutos de registro para medida de parâmetros basais. Os animais dos grupos CE e OE foram submetidos a 30 minutos de estresse, enquanto os dos grupos CNE e ONE, não foram submetidos ao estresse. Ao final, todos os animais seguiram por mais 30 minutos de registro para recuperação da FC e da TCI (Figura 5).



**Figura 5:** Escala temporal do protocolo de registro dos animais submetidos ou não ao estresse.

Após o período de estabilização, os animais dos grupos CE e OE foram submetidos ao procedimento de estresse social por meio da sua inserção em uma caixa de outro animal não familiar por 30 minutos, tornando-se um “rato intruso” em tal situação. Este protocolo foi adaptado a partir do modelo de Mesquita *et al.*, 2016. Neste modelo o animal analisado foi introduzido em uma caixa na qual estava alojado um animal não familiar, o qual não teve nenhum tipo de treinamento agressivo. Esses ratos não tiveram contato direto entre eles, já que o animal residente se encontrava dentro de uma gaiola, como mostrado na Figura 6. Tal procedimento se tornou estressante ao animal, uma vez que, os ratos são territoriais e nessa situação poderiam ver, ouvir e sentir o cheiro do outro.



(Adaptado de <https://www.adinstruments.com/products/powerlab> . Acesso: 10 de maio de 2018 )

**Figura 6:** Desenho esquemático do procedimento de estresse social por “rato intruso”. O animal analisado em questão foi colocado em uma caixa na qual estava alojado outro animal, mas sem contato direto, já que o segundo se encontrava dentro de uma gaiola.

### 3.11 Testes comportamentais

Os animais dos grupos CE e OE foram submetidos aos testes comportamentais relatados a seguir.

### 3.11.1 Labirinto em T-Elevado (LTE)

O modelo comportamental que foi utilizado neste estudo foi o LTE, previamente padronizado por Viana, Tomaz e Graeff (1994). O LTE é uma derivação do Labirinto em Cruz (LCE), que é muito utilizado para modelo de teste para avaliação da ansiedade. O LCE é um aparato constituído por dois braços fechados com laterais altas perpendiculares a dois braços aberto, não circundados por paredes. Todo o aparato encontra-se elevado 50 cm em relação ao chão. O LTE foi obtido por meio da exclusão e/ou da selagem de uma das entradas aos braços fechados do LCE (Figura 7), resultando assim em um aparato composto por três braços de iguais dimensões (50 cm de comprimento x 12 cm de largura).

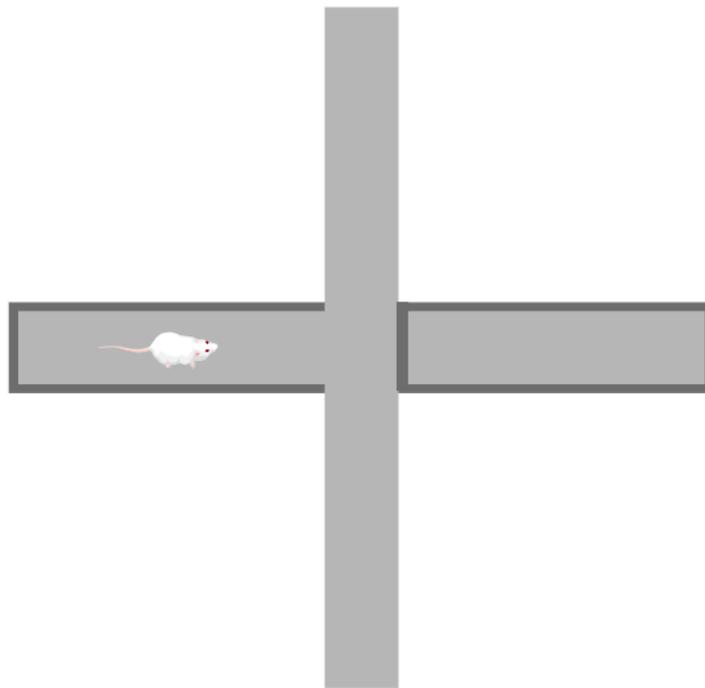
Assim como descrito no LCE, no LTE o braço fechado é circundado por uma parede de 40 cm de altura e encontra-se perpendicular a dois braços abertos, que possuem apenas uma moldura acrílica de 1 cm de altura em sua borda (importante recurso que evita quedas dos animais durante as exposições).

Os animais foram acomodados na sala de experimentação por 30 minutos antes da realização do pré teste e do teste para reconhecimento da sala de experimentação e ambientação (CHÍRICO, 2017).

O modelo foi desenvolvido para acessar dois diferentes tipos de comportamentos, esquiva e fuga, que vem sendo relacionados à ansiedade e ao pânico, respectivamente. O teste é realizado da seguinte maneira: quando o animal é colocado na extremidade distal do braço fechado, em relação ao eixo central, ele perde o alcance e a capacidade visual de ver além das paredes que o circundam, ou seja, o animal não é capaz de ver os braços abertos, a menos que se direcione até a plataforma central e explore o aparato além destas paredes. Em contrapartida, quando o animal é exposto ao braço aberto, ele tem ampla visibilidade (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI JUNIOR, 1998).

Estudos demonstraram que o rato possui uma aversão inata a locais sem proteção e abertos, e neste sentido os braços abertos do LTE simulam um ambiente de aversão que remete a este contexto, o que torna os braços abertos do LTE um local extremamente desagradável. Quando o animal é repetidamente colocado no braço fechado ele é capaz de aprender um tipo de comportamento de aversão a exploração e/ou saída do braço fechado, descrito como um comportamento de esquiva inibitória. Com este aprendizado o tempo gasto pelo animal (latência) ao longo das tentativas tende a aumentar, ou seja, a exploração (saída do braço fechado) no aparato diminui ou cessa por completo. Por outro lado, quando o animal é colocado

na extremidade distal de um dos braços abertos, ele tende a se mover rapidamente para dentro do braço fechado, local que lhe garante uma sensação de segurança. Os animais não apresentam no comportamento de fuga um perfil tão característico e direto com a capacidade de aprendizado, como ocorre na esquiiva inibitória, possivelmente por este tipo de comportamento (fuga) relacionar-se fortemente a uma aversão intrínseca (ou inata) de determinadas espécies de animais (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI, 1998; ZANGROSSI; GRAEFF, 2014).



**Figura 7:** Imagem ilustrativa do Labirinto em T-Elevado. O aparato foi obtido por meio da selagem de um dos braços fechados do Labirinto em Cruz, resultando assim em um braço fechado perpendicular a dois braços abertos.

Um fator importante para execução do teste é garantir que estes animais sejam pré-expostos a um dos braços abertos (adequadamente isolado dos demais braços por uma parede de madeira) 24 horas antes do teste no LTE, por um período de 30 minutos. Estudos demonstraram que a exposição prévia dos animais ao braço aberto é capaz de incitar e potencializar a reação ao comportamento de fuga, por reduzir o comportamento exploratório relacionado com a novidade, sendo capaz de promover uma diminuição no tempo de latência no braço aberto (SERGIO; SPIACCI; ZANGROSSI, 2014).

Assim, os animais foram pré-expostos a um dos braços abertos do LTE durante 30 minutos e, no dia seguinte, foram submetidos ao teste padrão no LTE que foi realizado a partir de três exposições (tentativas) consecutivas ao braço fechado.

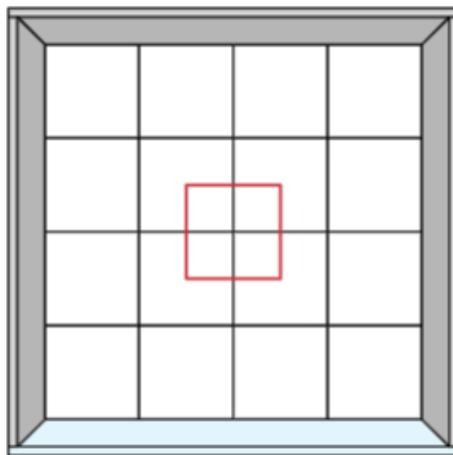
Inicialmente, o animal foi colocado na extremidade distal do braço fechado, e foram cronometrados o tempo gasto (latência) em cada tentativa pelo animal para explorar o LTE e ultrapassar o limite proximal da plataforma central com as quatro patas.. As tentativas foram separadas por intervalos curtos de 30 segundos, e cada uma delas teve como tempo limite 300 segundos para que o animal explorasse o LTE. Em situações em que o animal permaneceu no mesmo braço durante uma tentativa (300 segundos), a exposição foi interrompida e o animal foi gentilmente retirado do aparato e recolocado em sua caixa para o intervalo de 30 segundos. Um aumento no tempo de latência entre as três exposições do animal ao braço fechado do LTE está relacionado com a sua capacidade de aprendizado em evitar o perigo, ou realizar a esquivas inibitória, que vem sendo associado a um comportamento mais ansiogênico (ou do tipo ansiedade) (POBBE *et al.*, 2014).

Para acessar o comportamento do tipo pânico, que também pode ser avaliado no LTE, após 30s da realização das três tentativas da esquivas inibitória, o mesmo animal também foi submetido a três tentativas de fuga. Para tal esse animal foi exposto à extremidade distal de um dos braços abertos, usualmente no mesmo braço ao qual ele foi previamente exposto há 24 horas antes. Da mesma forma como foi realizado na esquivas inibitória, a latência gasta pelo animal para fugir do braço aberto ultrapassando a extremidade proximal da plataforma central com as quatro patas foi cronometrada, e o limite máximo de latência para cada tentativa também foi de 300s.

O LTE, também gera dados acerca do desempenho da atividade locomotora em suas diferentes tarefas, o que serve para controle dos efeitos não específicos das diferentes abordagens pesquisadas (ex.: drogas, lesões encefálicas, manipulações genéticas, dentre outras) na atividade motora. Entretanto, quando observa uma igualdade nas variações relativas à esquivas inibitória e à fuga, faz-se necessário o uso de um aparato para avaliação independente desta atividade locomotora, como as obtidas por meio do uso do campo aberto (SERGIO; SPIACCI; ZANGROSSI, 2014; ZANGROSSI; GRAEFF, 2014).

### **3.11.2 Teste de atividade locomotora**

Para avaliar a atividade locomotora dos animais, o teste padrão mais utilizado é o Campo Aberto (CA) (Figura 8), que é determinado por meio do número de vezes que o animal cruza os segmentos (linhas) da arena. Este teste foi realizado em uma arena com superfície subdividida em dezesseis quadrantes, onde o animal foi colocado ao centro. Durante o teste foi cronometrado o tempo de 300 segundos e o número de quadrados percorridos pelos animais foi base para determinar sua atividade locomotora (SERGIO; SPIACCI; ZANGROSSI, 2014; CHÍRICO, 2017).



**Figura 8:** Imagem ilustrativa do Campo Aberto. A arena possui quatro paredes perpendiculares e a superfície é subdividida em dezesseis quadrantes.

### **3.12 Avaliação dos níveis de Expressão gênica no HDM**

#### **3.12.1 Extrações de RNA**

Após os testes comportamentais, todos os animais, incluindo os grupos não submetidos ao estresse, foram sacrificados por decapitação. O cérebro foi removido e congelado em solução de isopentano pré-congelado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para obtenção da região do HDM para as análises de expressão gênica, lâminas foram tratadas com água DEPEC (dietilpirocarbonato) autoclavada, com intuito de inibir RNAses. Em seguida, cortes coronais próximos a região de análise foram feitos com  $350\mu\text{m}$  de espessura com o auxílio de um aparelho criostato, montados nas lâminas, e posteriormente, o HDM foi removido pelo método de punch. O punch ocorreu bilateral, tendo como referência o bregma  $-2,04$  até o bregma  $-3,96$  (Figura 9), utilizando caneta

de micro punch EMS-Core, Electron Microscopy Sciences, PA, USA, #69039-10, de 1 mm de diâmetro. Durante todo o procedimento, as amostras foram mantidas em gelo seco garantindo-se assim, a integridade das amostras.

Para a extração do RNA do tecido foi utilizado o reagente Trizol (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. A concentração e a qualidade do RNA foram estimadas pelas medidas de absorvância 260nm e 280 nm no espectrofotômetro NanoDrop 2000. A razão das densidades ópticas a 260nm/280nm acima de 1,8 foram aceitas como de boa qualidade do RNA.

### 3.12.2 Síntese de cDNA

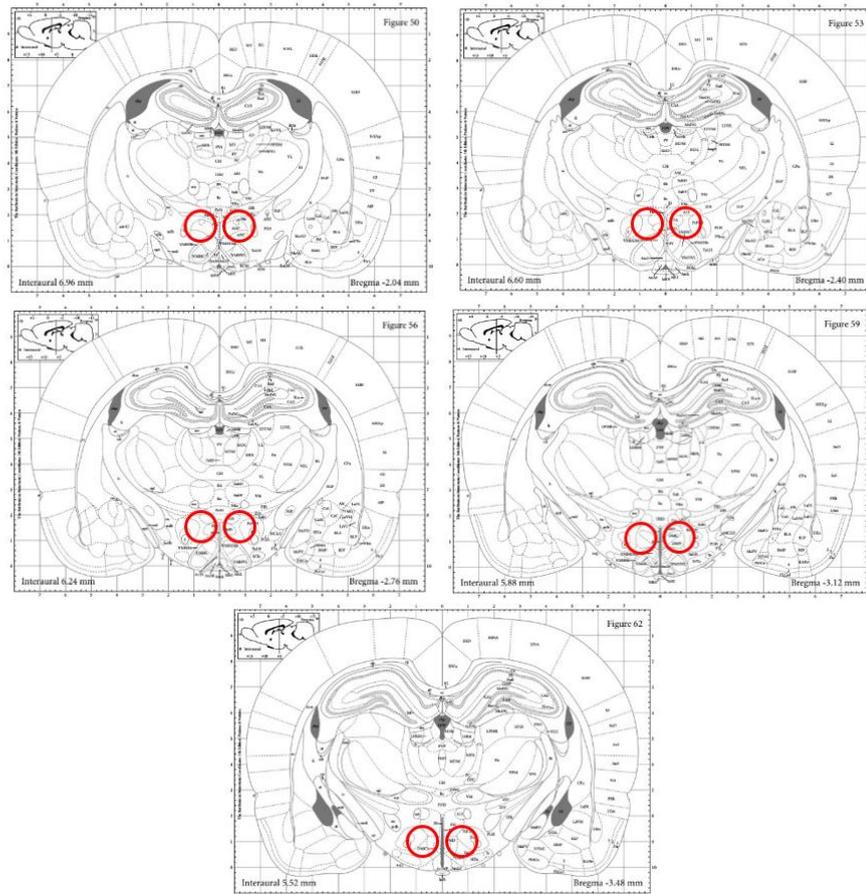
A reação de transcrição reversa (RT-PCR) para obtenção do DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando 1 µg de RNA total, utilizando o kit High Capacity Reverse Transcription (Applied biosystems,USA). A ordem e as etapas de incubação foram realizadas de acordo com as recomendações de tempo e temperaturas do fabricante.

### 3.12.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real - qPCR

As amplificações por qPCR para análise da expressão gênica do gene *GABRD* foram realizadas em triplicatas. As reações foram preparadas de acordo com as especificações do fabricante com reagentes padronizados, customizados e validados *TaqMan Gene Expression* (Applied Biosystems). O sistema TaqMan foi escolhido, por ser de maior especificidade e sensibilidade.

Os conjuntos de *primers* e sonda específicos para o gene *GABRD* (Tabela 1) foram adquiridos da ThermoFisher (referência Rn01517017\_g1).

Os valores relativos a amplificação do mRNA referentes a cada gene foram avaliados pela mensuração da fluorescência, quantificados por sistema de detecção ABI PRISM *ViiA™ 7 Real-Time PCR*(Applied biosystems,USA). O gene *RN45S* (Rn03928990\_g1) foi selecionado para corrigir a variabilidade nas amplificações. Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX para correção de flutuações na leitura decorrentes das variações de volume e da evaporação ao longo da reação.



**Figura 9:** Representação aproximada dos cortes e região do hipotálamo dorsomedial removida por método de micro punch.

**Tabela 1.** Dados do Gene avaliado para níveis de expressão gênica.

Símbolo do Gene/ID e localização cromossômica	Produto do Gene	Tamanho do amplicon (pb)
<i>GABRD</i> ( <i>Rattus norvegicus</i> ); ID: 29689; cromossomo 5 NC_005104.4 (região cromossômica: 172797478...172809374)	Subunidade delta do Receptor do Ácido Gama- aminobutírico(GABA)	72

Fonte: NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29689>)

### 3.13 Análises de dados e estatística

Nos gráficos de linha, foram denominados período de estabilização os tempos -6,-4,-2, iniciado estresse ou sem estresse tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 e fim do estresse tempos 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60.

Para as análises FC e TCI, calcularam-se as médias de dez segundos a cada dois minutos do registro completo de todos os animais.

Para as análises da temperatura do dorso e da cauda do animal, realizaram-se médias a cada dois minutos dos registros fotográficos.

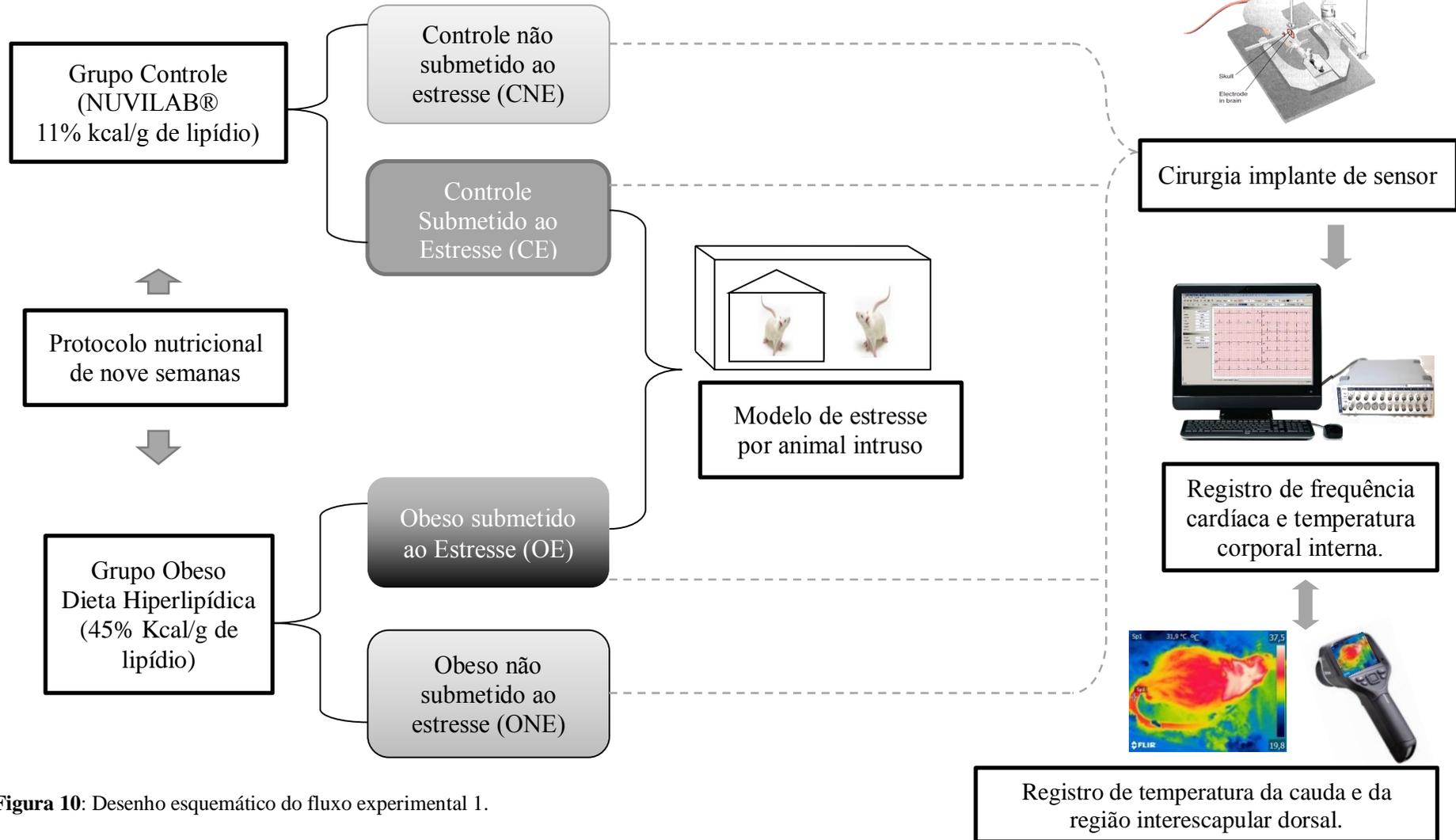
Para as análises dos gráficos de delta de maior variação para as variáveis dieta (controle e obeso) e condição (sem estresse e estresse) calcularam-se delta igual o pico do estresse subtraído pela média dos valores basais (seis minutos iniciais pré-estresse) e os valores de delta dos seis minutos finais, que corresponde à média dos seis minutos finais subtraído pela média dos valores basais (seis minutos iniciais pré-estresse).

Para realização das análises de esQUIVA inibitória e fuga foram utilizados os tempos de latência (em segundos) previamente cronometrados, durante o experimento no LTE. Para análise da atividade locomotora foi registrado o número de vezes que o animal mudou de quadrado na arena utilizada no teste do CA, durante 300s.

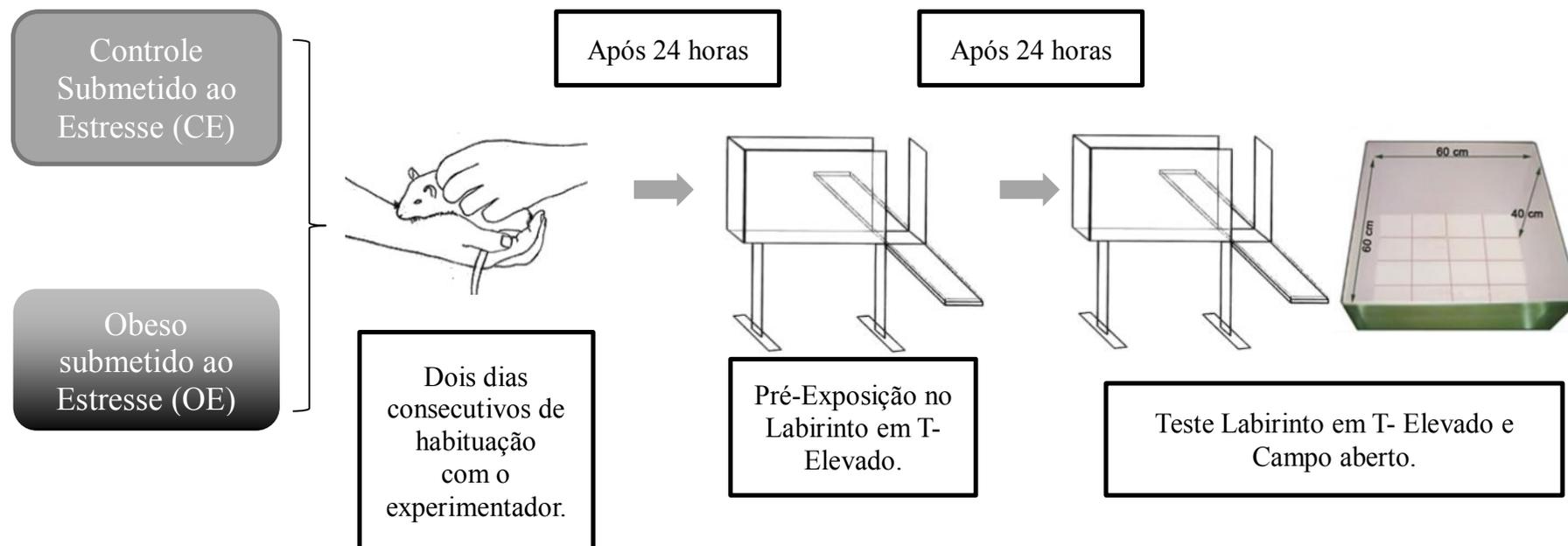
Os dados da expressão gênica foram obtidos e analisados por meio da plataforma *Thermo Fisher Cloud*. Utilizou-se o método de quantificação relativa  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

Realizaram-se as análises estatísticas com o auxílio do programa *GraphPad Prism 7.0*. a fim de verificar normalidade e homocedasticidade dos dados em estudo, utilizamos os testes Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov e D'Agostino-Pearson. Todas as variáveis foram aceitas pelos testes. Para as análises dos registros de FC, temperaturas, LTE e expressão gênica utilizou-se análise de variância de acordo com o modelo fatorial ANOVA two-way, considerando os fatores Dieta (Hiperlipídica 45% kcal/g de lipídio e Comum 11% kcal/g de lipídio) e Condição (Sem estresse e Estresse), seguido de pós-teste Holm-Sidak. Utilizou-se o teste t de Student – não pareado com intuito de identificar diferenças entre as dietas. As variáveis analisadas foram: ganho de peso, massa gorda, índice de Lee, índice de adiposidade, tecido adiposo retroperitoneal, tecido adiposo inguinal, tecido adiposo marrom e campo aberto. Estabeleceu-se o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).

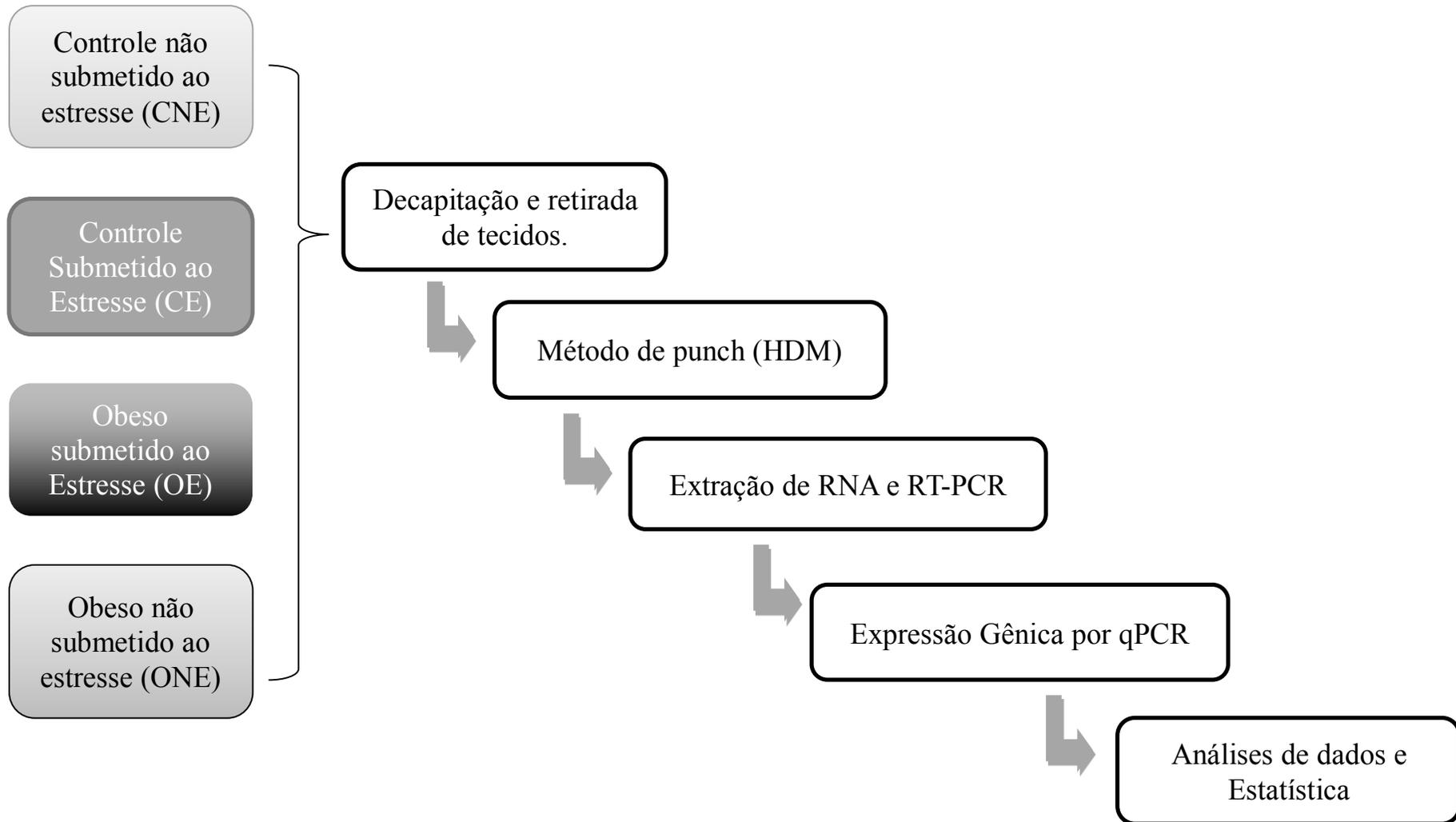
### 3.14 Fluxogramas Experimentais



**Figura 10:** Desenho esquemático do fluxo experimental 1.



**Figura 11:** Desenho esquemático do fluxo experimental 2.



**Figura 12:** Desenho esquemático do fluxo experimental 3.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Desenvolvimento da obesidade induzida por dieta hiperlipídica

Após o protocolo nutricional de nove semanas, os resultados mostraram que os animais que receberam a DH 45 % de gordura (grupo obeso), apresentaram um aumento significativo no ganho de peso ( $p < 0,0001$ ) correspondente ao peso final, subtraído pelo peso inicial; na MG (soma dos três tecidos) ( $p < 0,0001$ ); no IA (multiplicação da MG x 100 dividido pelo peso corporal final) ( $p < 0,0001$ ) e no IL (divisão da raiz cúbica do PCF em gramas pelo comprimento naso-anal em milímetros e multiplicando-se por dez) ( $p < 0,0001$ ). Além disso, a DH promoveu um aumento significativo no peso dos tecidos adiposos brancos epididimal ( $p < 0,0001$ ), retroperitoneal ( $p < 0,0001$ ), inguinal ( $p < 0,0001$ ) e no tecido adiposo marrom ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2:** Efeito da dieta hiperlipídica sobre o perfil nutricional de ratos Wistar após realização do protocolo nutricional de nove semanas.

Parâmetros	Controle (N :29)	Obeso (N:30)	P valor
Ganho de peso (g)	289,3 ± 6,286	350,6 ± 8,123	P<0,0001
Massa gorda (g)	7,192 ± 0,3684	19,09 ± 1,092	P<0,0001
Índice de Adiposidade	1,798 ± 0,08394	4,124 ± 0,1847	P<0,0001
Índice de Lee	0,2924 ± 0,001071	0,3003 ± 0,001477	P<0,0001
Tecido adiposo branco epididimal	2,826 ± 0,1478	7,05 ± 0,448	P<0,0001
Tecido adiposo branco retroperitoneal	2,131 ± 0,1595	6,841 ± 0,3933	P<0,0001
Tecido adiposo branco inguinal	2,235 ± 0,1252	5,368 ± 0,3466	P<0,0001
Tecido adiposo marrom	0,1141 ± 0,006327	0,2176 ± 0,01064	P<0,0001

N: Número de animais por grupo.

P: Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ).

Os resultados foram expressos em Média ± Erro Padrão da Média (Média ± EPM).

Analizados pelo teste estatístico t de Student – não pareado.

Massa gorda: corresponde à soma dos três tecidos adiposos retroperitoneal, inguinal e epididimal.

Índice de Adiposidade: multiplicação da Massa Gorda x 100 dividido pelo peso corporal final.

Índice de Lee: divisão da raiz cúbica do peso corporal final em gramas pelo comprimento naso-anal em milímetros e multiplicando-se por dez.

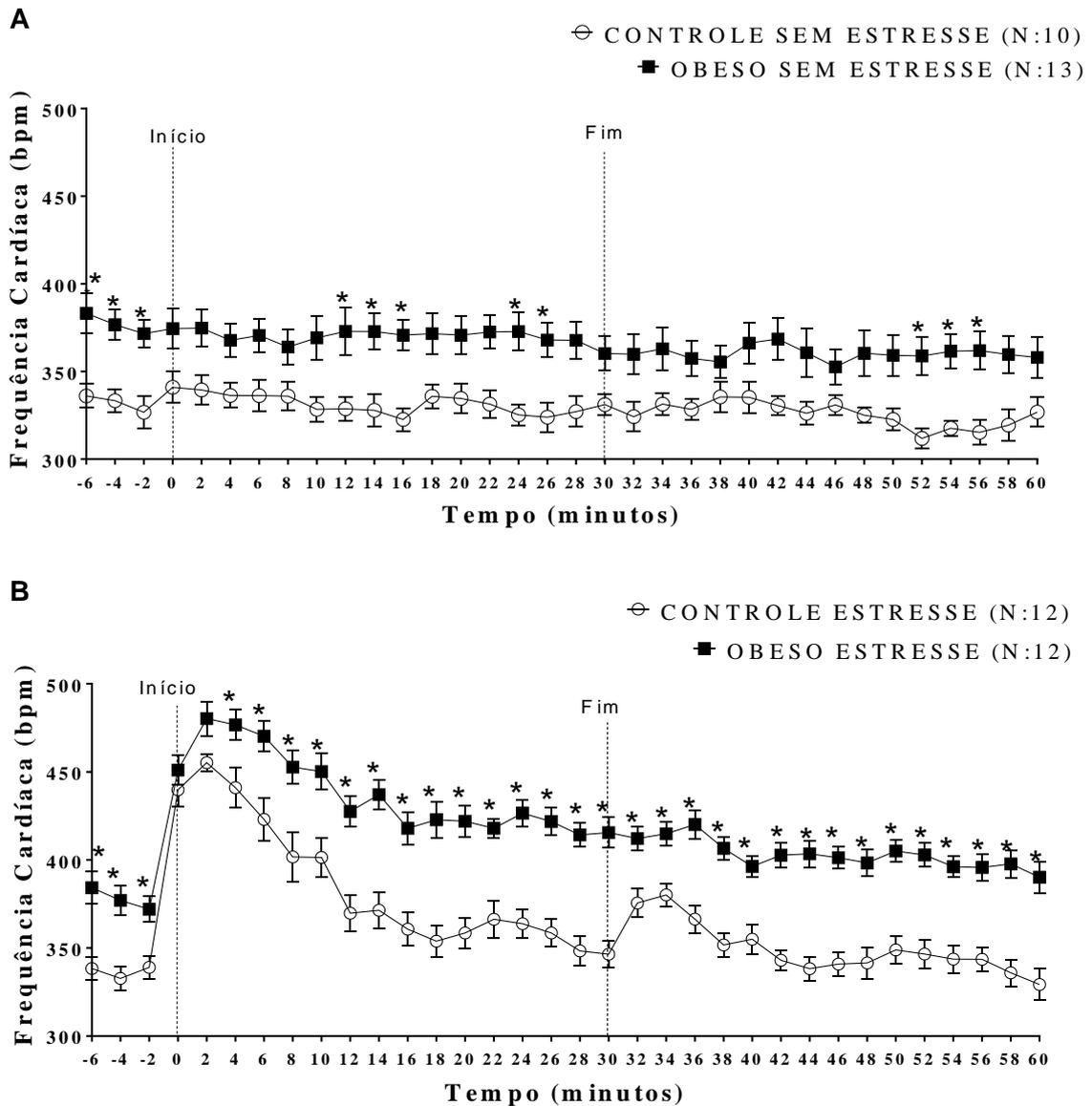
## 4.2 Efeito da obesidade em resposta ao estresse no parâmetro cardiovascular de frequência cardíaca

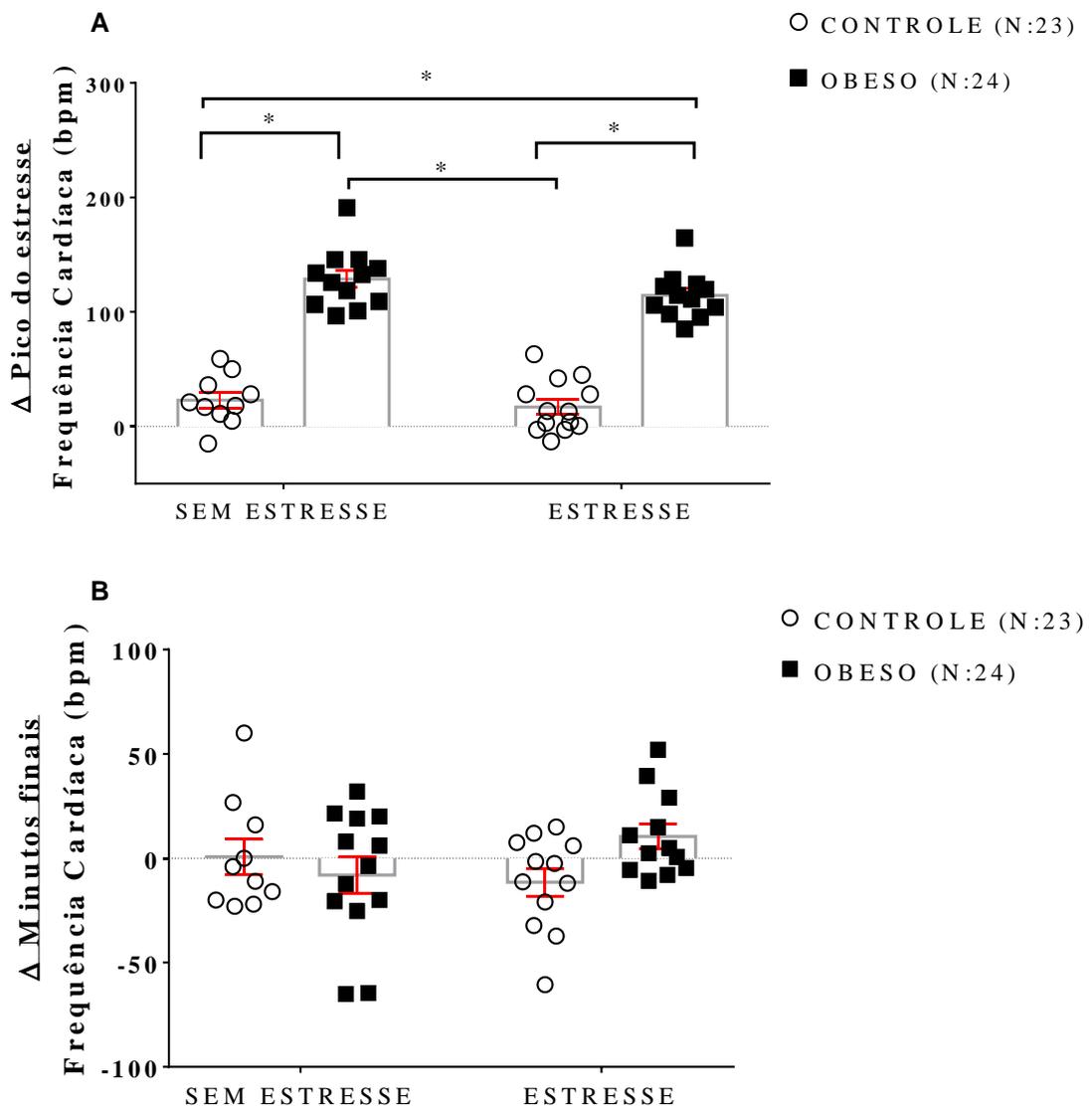
A Figura 13A representa as médias dos valores registrados para FC dos animais que não foram submetidos ao estresse. Os animais do grupos controle sem estresse (CNE) e obeso sem estresse (ONE) são mostrados em linhas tracejadas (Figura 13A), para comparações com os grupos submetidos ao estresse (CE e OE) (Figura 13B). O teste Two-way ANOVA mostrou diferença significativa da FC entre os grupos CNE e ONE nas variáveis tempo (F (33, 693);  $p < 0,0001$ ) e dieta (F (1, 21);  $p = 0,005$ ). Entretanto, não houve diferença significativa da FC na interação tempo x dieta (F (33, 693);  $p = 0,54$ ). Os resultados pós-teste Holm-Sidak apresentaram diferenças significativas da FC durante todo o período de estabilização e nos tempos 12, 14, 16, 24 e 26 minutos durante o estresse e nos tempos 52, 54 e 56 minutos após o estresse (Figura 13A).

De maneira ilustrativa, a Figura 13B apresenta os diferentes valores para FC, antes, durante e após a indução do estresse pelo modelo do rato intruso. As linhas tracejadas representam o início do estresse e o fim do estresse. Os resultados com o teste Two-way ANOVA mostraram que houve diferença significativa da FC entre os grupos CE e OE nas variáveis tempo (F (33, 726);  $p < 0,0001$ ), dieta (F (1, 22);  $p < 0,0001$ ) e na interação tempo x dieta (F (33, 726);  $p = 0,0003$ ). O resultado do pós-teste Holm-Sidak apresentou diferenças significativas na FC durante todo período do teste, com exceção dos dois primeiros tempos do período de estresse, tempos 0 e 2 min.

A figura 14A apresenta os valores de maior variação de FC que corresponde ao pico do estresse subtraídos da média dos valores do tempo de estabilização inicial (seis minutos), sendo que foram analisadas as variáveis dieta (grupo controle e obeso) e condição (sem estresse e estresse). Os resultados do teste Two-way Anova mostraram diferença significativa da variação da FC entre os grupos somente na variável dieta (F (1, 43);  $P < 0,0001$ ). Não apresentou diferença significativa nas variáveis condição (F (1, 43);  $p = 0,1$ ) e interação dieta x condição (F (1, 43);  $p = 0,5$ ). Os resultados pós-teste Holm-Sidak apresentaram diferenças significativas da variação da FC entre os grupos CNE vs ONE; CNE vs OE; ONE vs CE; CE vs OE com  $p < 0,0001$ . A figura 14B apresenta os valores de delta dos seis minutos finais de FC que corresponde à média dos seis minutos finais subtraída da média dos valores da estabilização. Os resultados do teste Two-way Anova mostraram diferença significativa dos valores de delta da FC entre os grupos somente na variável interação (dieta x condição) (F (1, 43);  $p < 0,05$ ). Não houve diferença

significativa nas variáveis dieta ( $F(1, 43)$ ;  $p=0,04$ ) e condição ( $F(1, 43)$ ;  $p=0,6$ ). Os resultados do pós-teste Holm-Sidak não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

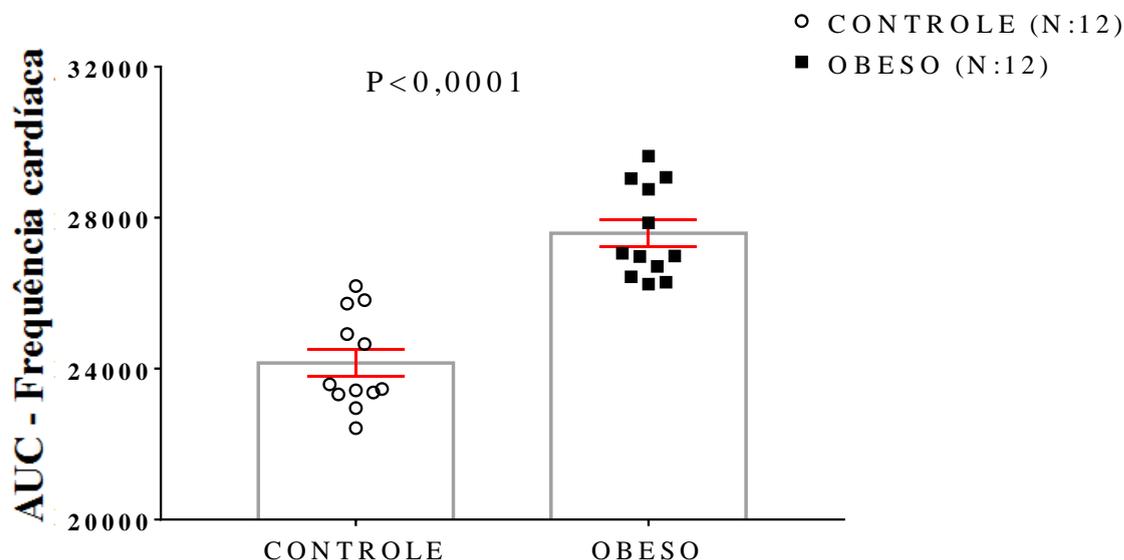




**Figura 14:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse no parâmetro cardiovascular de Frequência Cardíaca (FC). (A) Delta de maior variação de FC que corresponde o pico do estresse subtraído da média dos valores do tempo estabilização inicial (seis minutos). (B) Delta dos seis minutos finais de FC que corresponde à média dos seis minutos finais subtraído do valor médio dos valores dos tempos da estabilização. Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. N: Número de animais por grupo. \*Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).

A figura 15 apresenta dados dos animais que foram submetidos ao estresse referentes aos valores da área sob a curva em relação ao efeito do estresse na FC. Os resultados mostraram que a magnitude do estresse na FC foi significativamente potencializada nos animais do grupo obeso. Destaca-se que o grupo obeso [ $27587 \pm 354,3$ ; (IC95% = 27149 – 28024)] apresentou

frequência cardíaca em torno de 12,5 % mais elevada em comparação com o grupo controle [24152 ± 361,6; (IC95% = 23674 – 24631) p<0,0001].



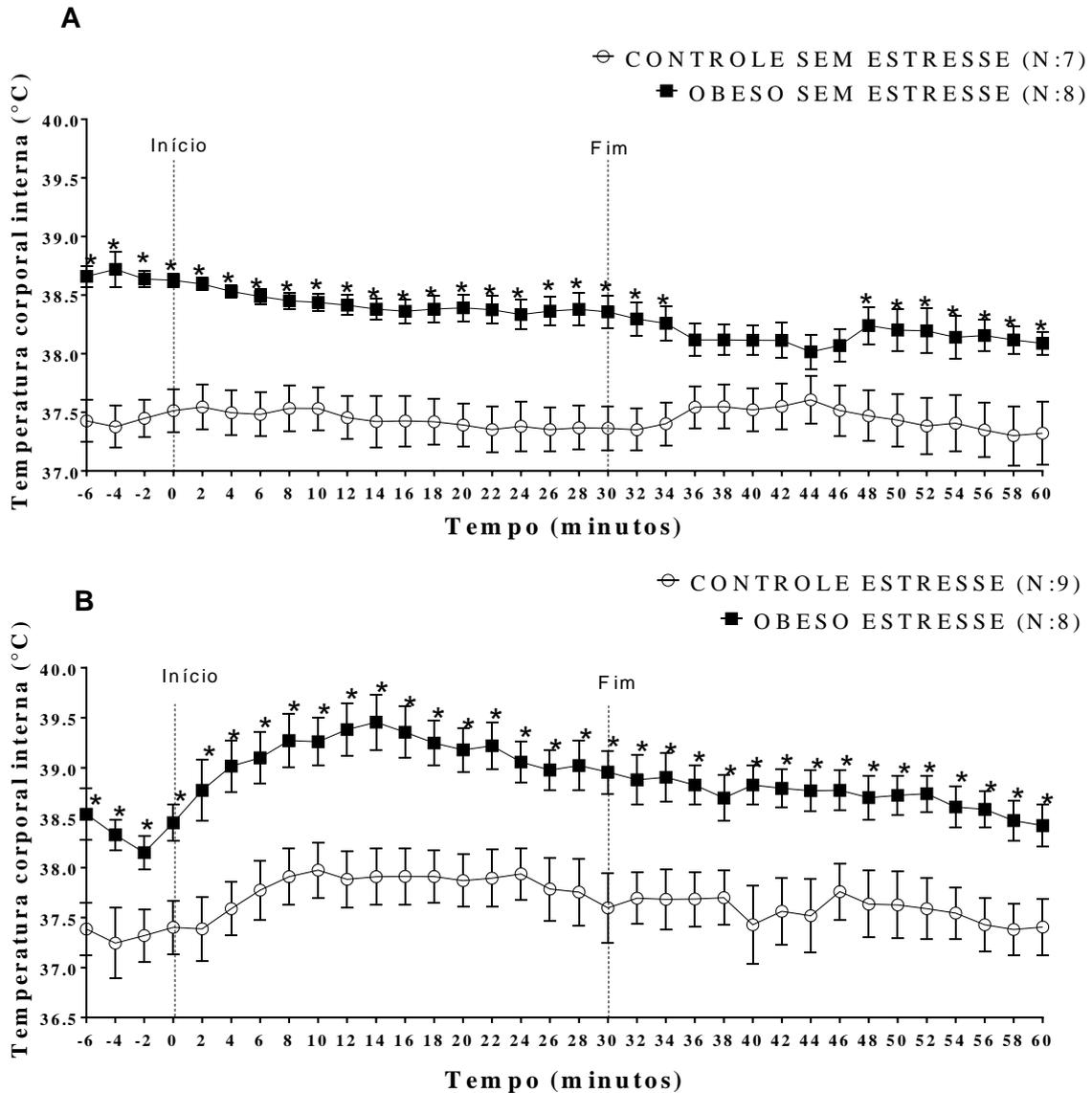
**Figura 15:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse no parâmetro cardiovascular de Frequência Cardíaca (FC). Valores da FC da área sob a curva dos animais que foram submetidos ao estresse. P: Diferença significativa estatística de 5% (p<0,05). N: Número de animais por grupo. Os resultados foram expressos em Média ± Erro Padrão da Média (Média ± EPM).

### 4.3 Efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura corporal interna

A figura 16A apresenta as médias dos diferentes valores da TCI dos animais que não foram submetidos ao estresse. Os animais dos grupos CNE e ONE (Figura 16A), foram representados com linhas tracejadas para comparações com os grupos submetidos ao estresse (Figura 16B). Os resultados do teste Two-way ANOVA mostraram diferenças significativas da TCI entre os grupos CNE e ONE nas variáveis tempo (F (33, 429); p<0,0001), dieta (F (1, 13); p<0,0005) e interação tempo x dieta (F (33, 429); p<0,0001). Os resultados do pós-teste Holm-Sidak apresentaram diferenças significativas da TCI em todos os tempos com exceção dos tempos 36 a 46 min.

A figura 16B representa as médias dos diferentes valores da TCI dos animais dos grupos submetidos ao estresse, CE e OE. Os resultados do teste Two-way ANOVA mostraram diferenças significativas das médias dos valores da TCI entre os grupos CE e OE nas variáveis tempo (F (33,495); p<0,0001) e dieta (F (1, 15); p<0,002). Entretanto, não houve diferença

significativa na variável interação tempo x dieta ( $F(33, 495)$ ;  $p=0,87$ ). Os resultados do pós-teste Holm-Sidak mostraram diferenças significativas das médias dos valores da TCI em todo período de estabilização, durante o estresse e após o estresse.



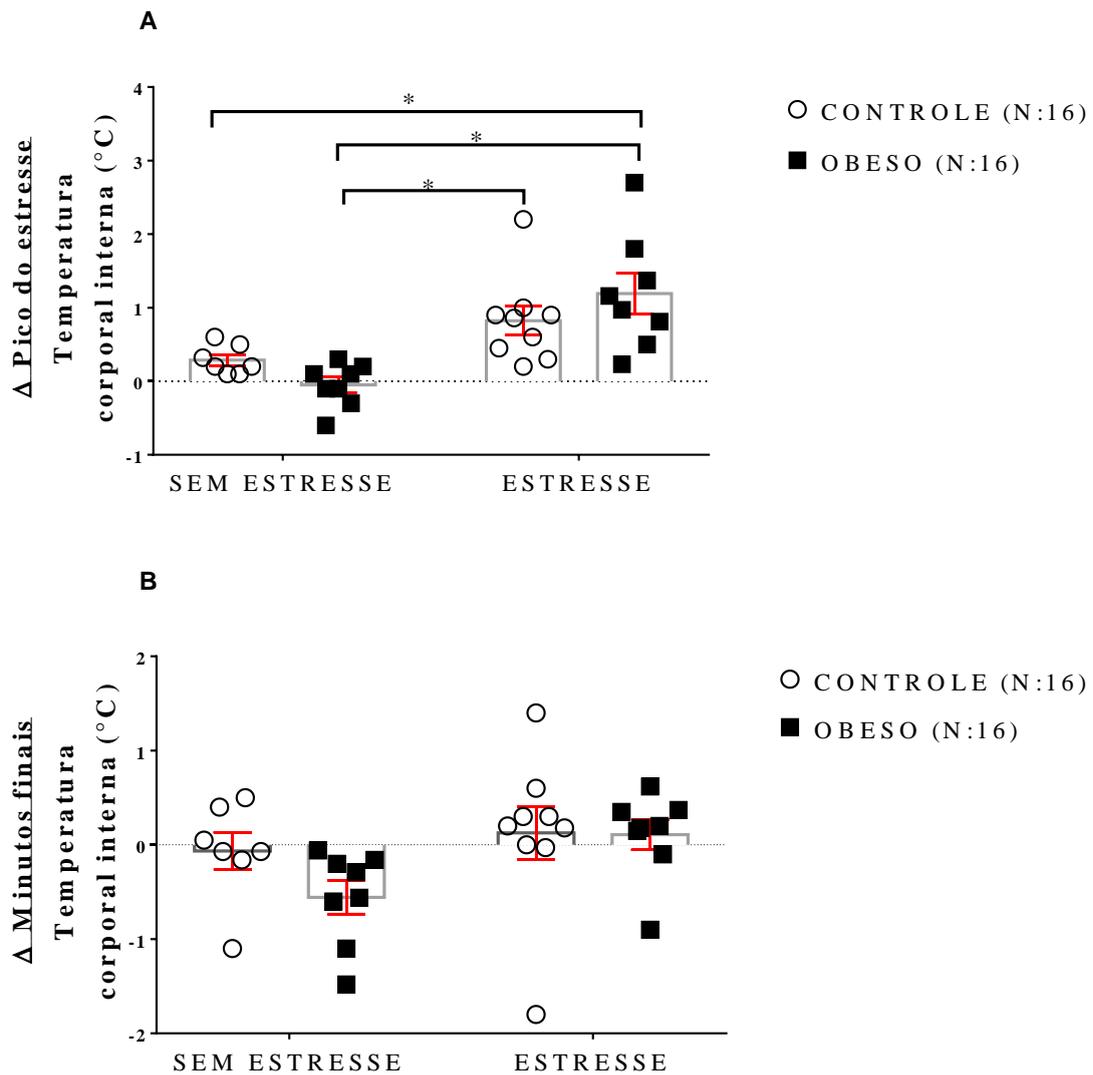
**Figura 16:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse na Temperatura Corporal Interna (TCI). (A) Representa médias da TCI obtidas nos animais não submetidos ao estresse dos grupos controle e obeso. (B) Representa as médias da TCI dos animais pertencentes aos grupos controle e obeso submetidos ao estresse. N: Número de animais por grupo. Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. \*Diferença significativa estatística de 5% ( $p<0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).

A Figura 17A apresenta os valores de delta de maior variação da TCI que corresponde ao pico do estresse subtraído pela média dos valores de estabilização inicial (seis minutos),

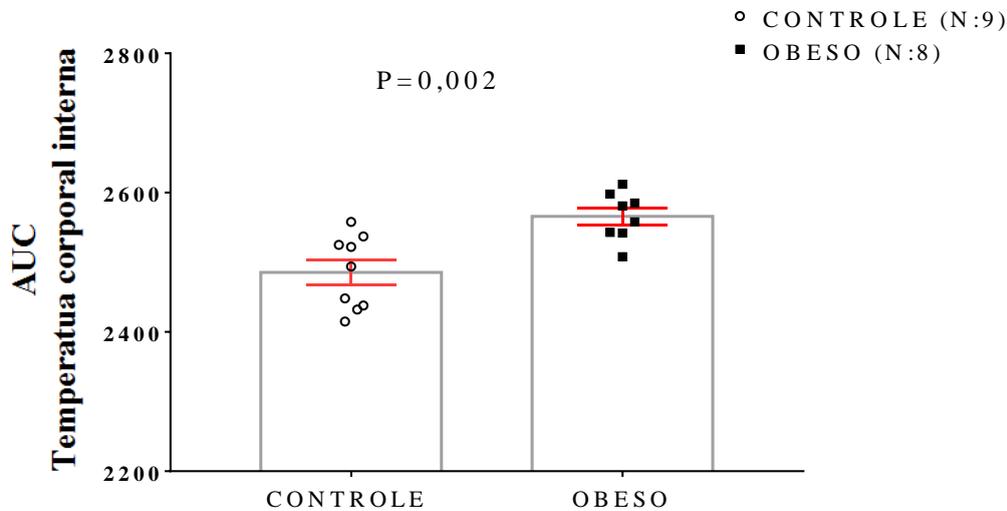
sendo que foram analisadas as variáveis dieta (grupo controle e obeso) e condição (sem estresse e estresse). Os resultados com o teste Two-way Anova mostraram que há diferença significativa nos valores de delta de maior variação da TCI entre os grupos somente na variável condição (F (1, 28);  $P < 0,0001$ ). Não houve diferença significativa nas variáveis dieta (F (1, 28);  $p = 0,9$ ) e interação dieta x condição (F (1, 28);  $p = 0,07$ ). Os resultados do pós-teste Holm-Sidak mostraram que houve diferenças significativas nos valores de delta de maior variação da TCI entre os grupos CNE vs OE; ONE vs CE; ONE vs OE com  $P < 0,005$ .

A Figura 17B apresenta os valores de delta dos seis minutos finais da TCI que correspondem à média dos seis minutos finais subtraídos da média dos valores da estabilização. Os resultados com o teste Two-way Anova não mostraram diferenças significativas nos valores de delta da TCI entre os grupos para nenhuma das variáveis.

Os valores da área sob a curva relacionados ao efeito do estresse na TCI dos animais que foram submetidos ao estresse estão apresentados na Figura 18. Os resultados mostraram que a magnitude do estresse na TCI foi potencializada nos animais do grupo obeso. Sendo que o grupo obeso [ $2566 \pm 12,14$ ; (IC95% = 2556 – 2576)] apresentou TCI em torno de 3,2 % mais elevada em comparação com o grupo controle [ $2485 \pm 17,63$ ; (IC95% = 2471 – 2500);  $p = 0,002$ ].



**Figura 17:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura corporal interna (TCI). (A) Delta de maior variação da TCI que corresponde o pico do estresse subtraído pela média dos valores de estabilização inicial (seis minutos). (B) Delta dos seis minutos finais da TCI que corresponde à média dos seis minutos finais subtraído pela média dos valores da estabilização. Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. N: Número de animais por grupo. \*Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).



**Figura 18:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse da temperatura corporal interna (TCI). Valores da TCI sobre a área sob a curva dos animais que foram submetidos ao estresse. N: Número de animais por grupo. P: Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).

#### 4.4 Efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura da cauda

A figura 19A apresenta as médias obtidas da temperatura da cauda dos animais CNE e ONE, que não foram submetidos ao estresse. Os resultados do teste Two-way ANOVA mostraram diferenças significativas das médias da temperatura da cauda nas variáveis interação tempo x dieta ( $F(33, 660)$ ;  $p < 0,0001$ ) e dieta ( $F(1, 20)$ ;  $p = 0,01$ ). Entretanto, houve diferença significativa das médias da temperatura da cauda na variável tempo ( $F(33, 660)$   $p = 0,9$ ). O resultado do pós-teste Holm-Sidak não mostrou diferença significativa em relação a nenhum período. As Figuras 19B e 19C apresentam fotos originais representativas da temperatura da cauda desses animais.

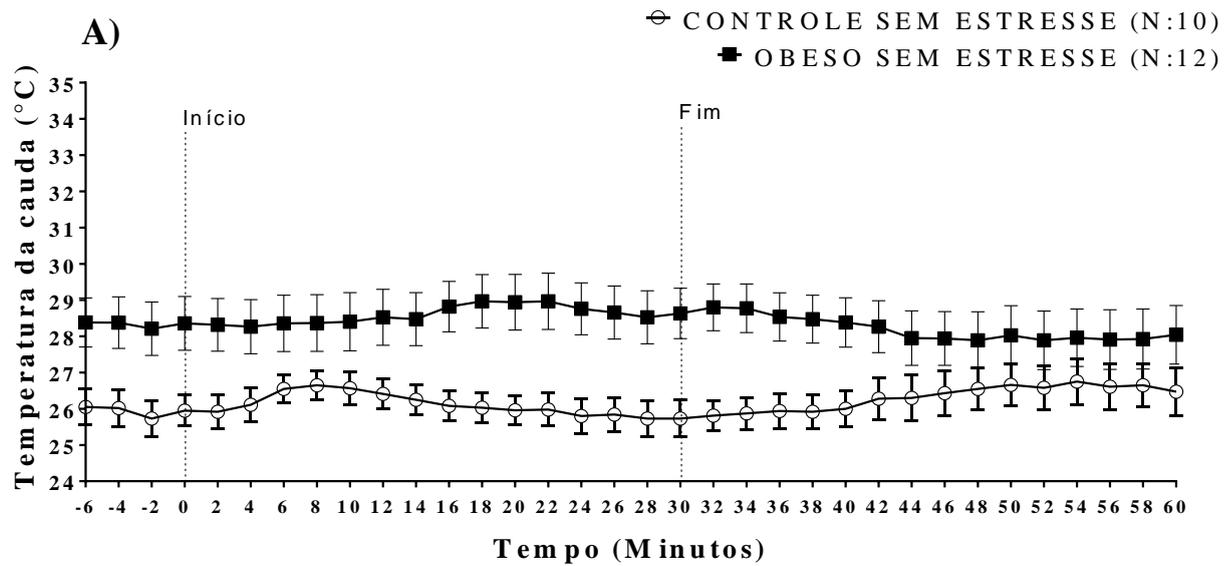
A figura 20A representa os valores das médias obtidas da média da temperatura da cauda dos animais CE e OE, que foram expostos ao estresse. Os resultados do teste Two-way ANOVA apresentaram diferenças significativas nos valores das médias obtidas da temperatura da cauda nas variáveis tempo ( $F(33, 825)$ ;  $p < 0,0001$ ) e dieta ( $F(1, 25)$ ;  $p = 0,0002$ ). No entanto, não houve diferença significativa para interação tempo x dieta ( $F(33, 825)$ ;  $p = 0,9$ ). Os resultados do pós-teste Holm-Sidak mostraram diferenças significativas nos valores das médias obtidas da temperatura da cauda em todo período de estabilização, durante o estresse e após o estresse. As

Figuras 20B e 20C mostram fotos originais com luz infravermelha que indica a temperatura da cauda dos animais expostos ao estresse.

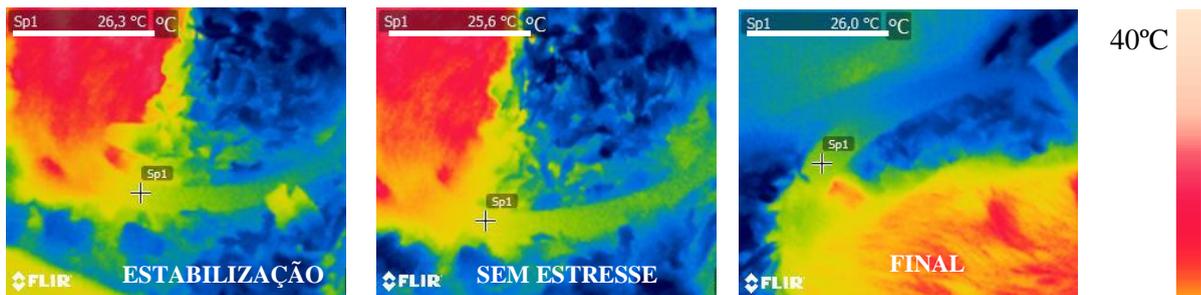
A figura 21A apresenta os valores de delta de maior variação da média da temperatura da cauda que corresponde ao pico do estresse subtraído da média dos valores de temperatura de estabilização inicial (seis minutos), sendo que foram analisadas as variáveis dieta (grupo controle e obeso) e condição (sem estresse e estresse). O teste Two-way Anova mostrou diferença significativa nos valores de delta de maior variação da temperatura da cauda entre os grupos somente na variável dieta ( $F(1, 43)$ ;  $P < 0,0001$ ). Não houve diferença significativa nas variáveis condição ( $F(1, 45)$ ;  $p = 0,9$ ) e interação dieta x condição ( $F(1, 45)$ ;  $p = 0,9$ ). Os resultados do pós-teste Holm-Sidak apresentaram diferenças significativas dos valores de delta de maior variação da temperatura da cauda entre os grupos CNE vs CE; CNE vs OE; ONE vs CE; ONE vs OE com  $P < 0,001$ .

A figura 21B apresenta os valores de delta dos seis minutos finais da temperatura da cauda que corresponde à média dos seis minutos finais subtraído pela média dos valores basais. Os resultados do teste Two-way Anova mostraram diferença significativa nos valores de delta da temperatura da cauda entre os grupos somente na variável condição ( $F(1, 45)$ ;  $p = 0,009$ ). Não houve diferença significativa nas variáveis dieta ( $F(1, 45)$ ;  $p = 0,2$ ) e interação dieta x condição ( $F(1, 45)$ ;  $p = 0,6$ ). O resultado do pós-teste Holm-Sidak mostrou diferença significativa entre os grupos ONE vs CE com  $p < 0,05$ .

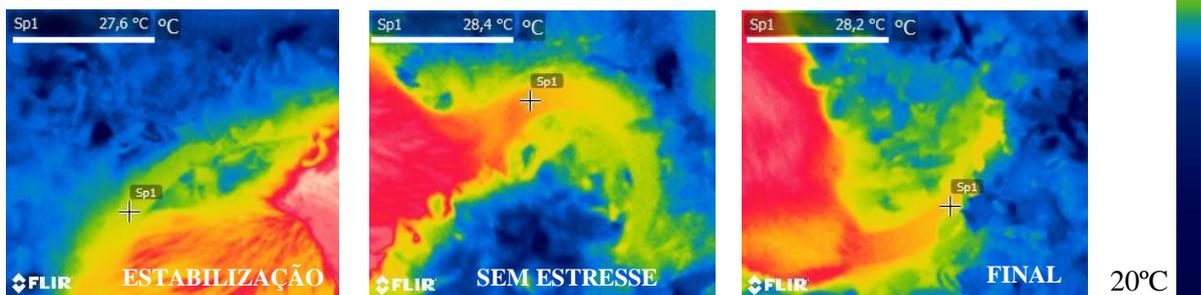
A Figura 22 apresenta dados dos animais que foram submetidos ao estresse, referentes aos valores da área sob a curva em relação ao efeito do estresse na temperatura da cauda. Os resultados mostraram que a magnitude do estresse na temperatura da cauda foi potencializada nos animais do grupo obeso. Desse modo, o grupo obeso [ $2092 \pm 29,57$ ; (IC95% = 2059 – 2124)] apresentou temperatura da cauda em torno de 10,6 % mais elevada em comparação com o grupo controle [ $1872 \pm 39,02$ ; (IC95% = 1829 – 1915)  $p = 0,0002$ ].



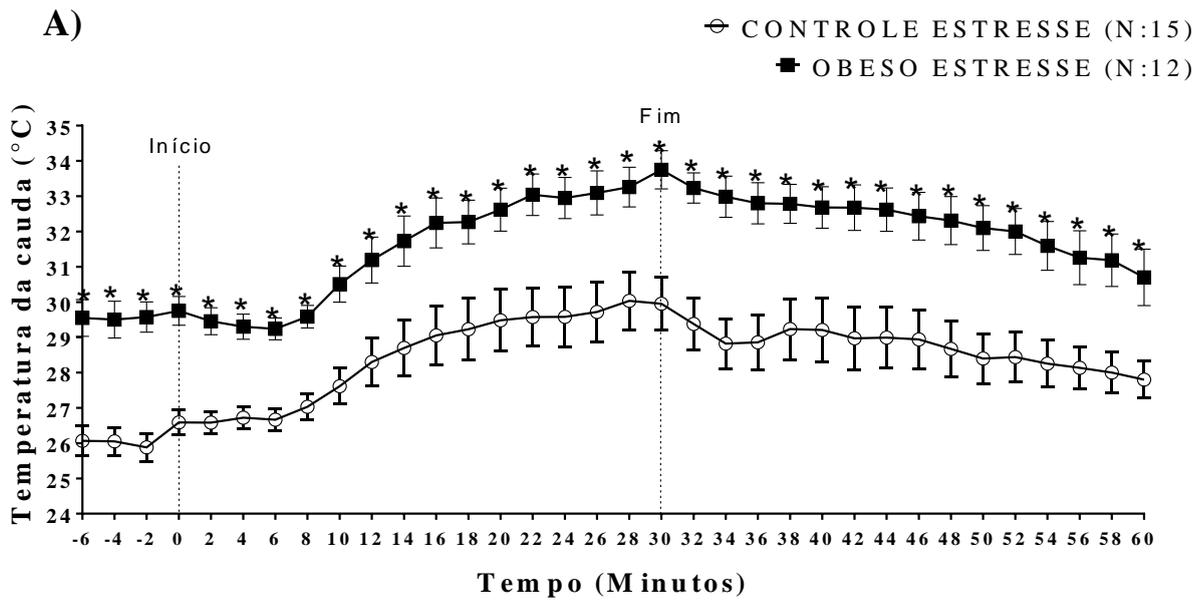
**B)**



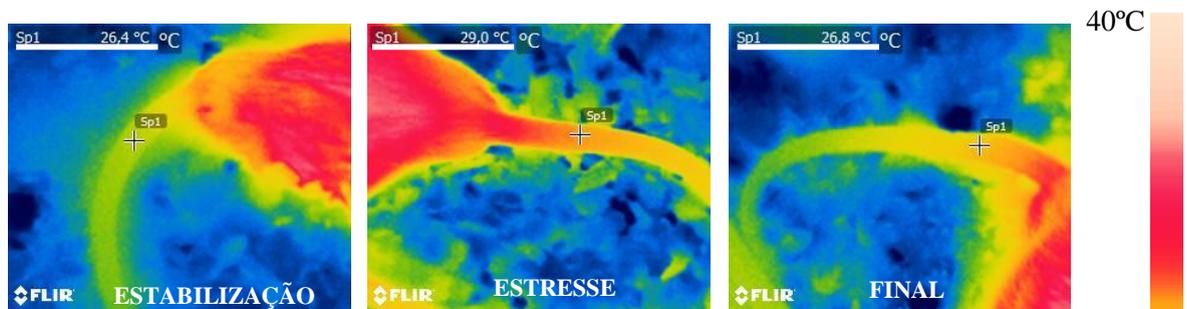
**C)**



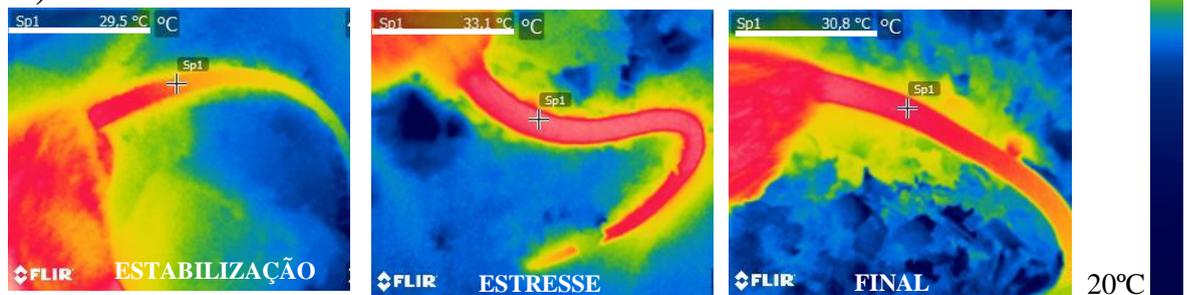
**Figura 19:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura da cauda. (A) Representa médias obtidas da temperatura da cauda dos animais não submetidos ao estresse dos grupos controle e obeso. N: Número de animais por grupo. Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM). Em (B) animais do grupo controle e em (C) animais do grupo obesos. As fotos são originais com luz infravermelha mostrando as alterações da temperatura da cauda em animais não submetidos ao estresse durante os experimentos. Sp1: Marcador do local mensurado de temperatura e valor obtido no momento da fotografia.



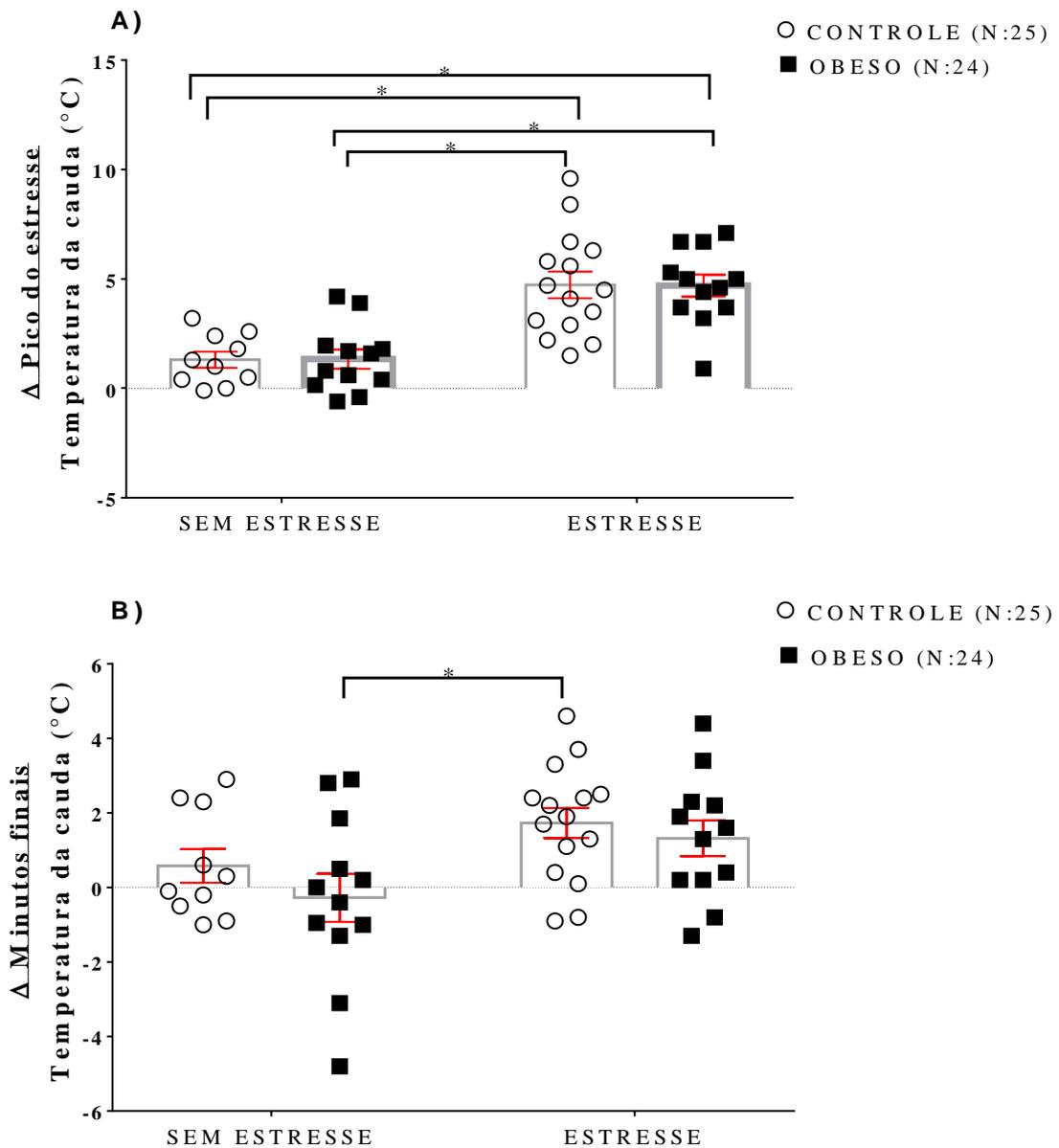
**B)**



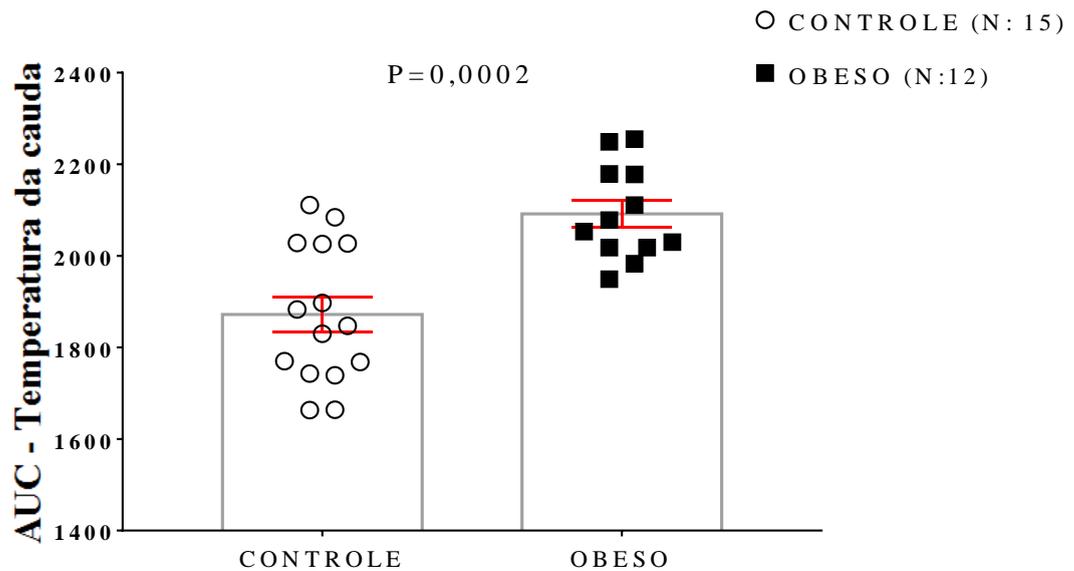
**C)**



**Figura 20:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura da cauda. (A) Representa médias obtidas da temperatura da cauda dos animais submetidos ao estresse dos grupos controle e obeso. N: Número de animais por grupo. Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM). \*Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Em (B) animais do grupo controle e em (C) animais do grupo obeso. As fotos são originais com luz infravermelha mostrando as alterações da temperatura da cauda em animais submetidos ao estresse durante os experimentos. Sp1: Marcador do local mensurado de temperatura e valor obtido no momento da fotografia.



**Figura 21:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura da cauda. (A) Delta de maior variação da temperatura da cauda que corresponde o pico do estresse subtraído da média dos valores de estabilização inicial (seis minutos). (B) Delta dos seis minutos finais da temperatura da cauda que corresponde à média dos seis minutos finais subtraído da média dos valores da estabilização. Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. N: Número de animais por grupo. \*Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).

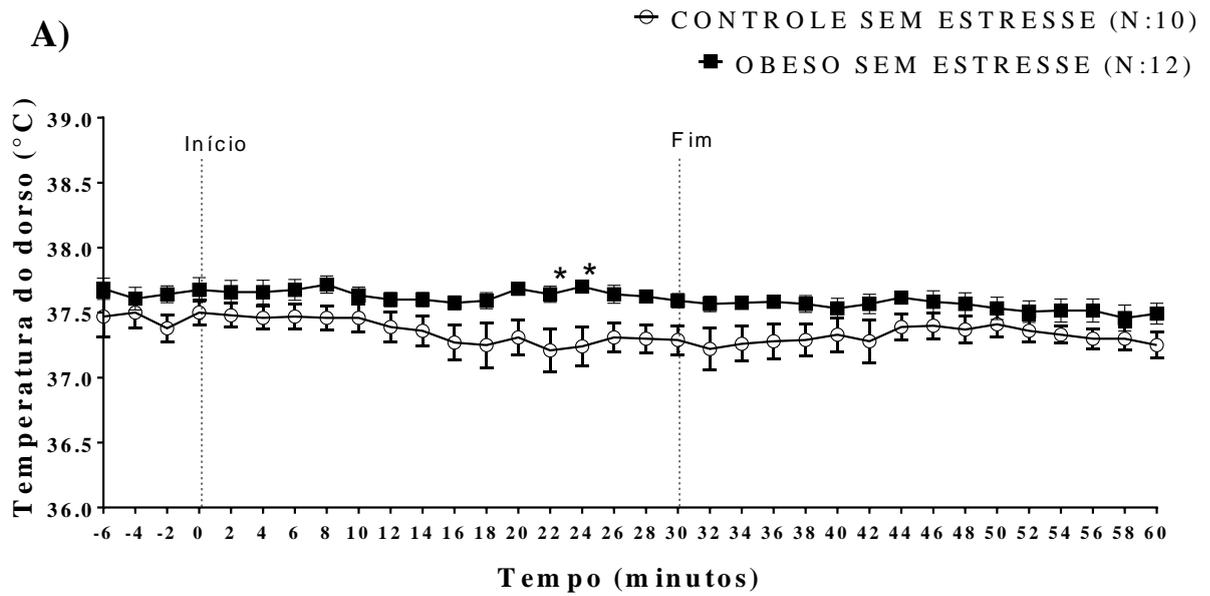


**Figura 22:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura da cauda sobre a área sob a curva dos animais que foram submetidos ao estresse. N: Número de animais por grupo. P: Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).

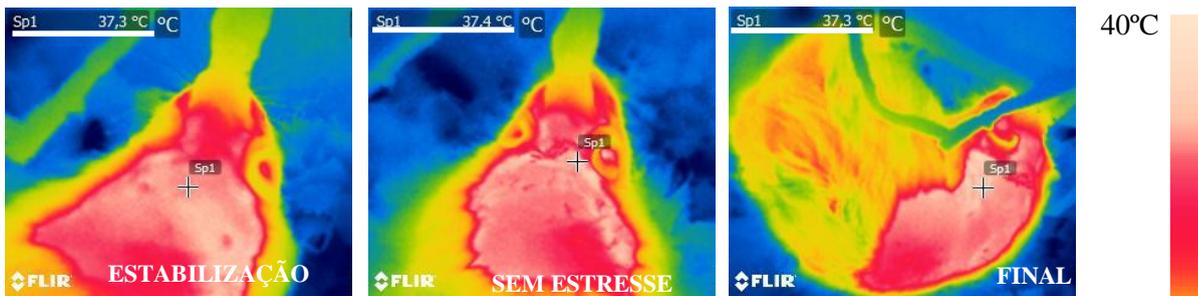
#### 4.5 Efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura da região interescapular dorsal

A Figura 23A apresenta as médias das temperaturas obtidas da RID dos animais CNE e ONE que não foram submetidos ao estresse. O resultado do teste Two-way ANOVA mostrou diferença significativa nessas médias apenas nas variáveis tempo ( $F(33, 660)$ ;  $p < 0,0001$ ) e dieta ( $F(1, 20)$ ;  $p = 0,03$ ). Entretanto, não houve diferença significativa na variável interação tempo x dieta ( $F(33, 660)$ ;  $p = 0,2$ ). O resultado do pós-teste Holm-Sidak mostrou que houve diferenças significativas somente nos tempos 22 e 24 min. As Figuras 23B e 23C apresentam fotos originais representativas da temperatura apresentada nesses animais.

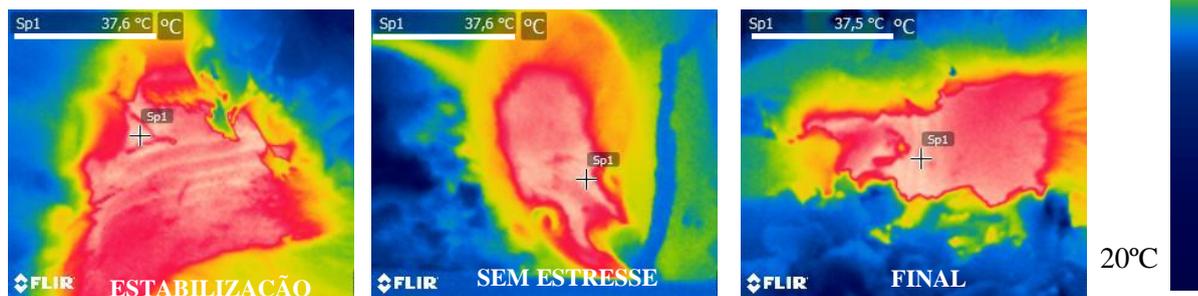
A Figura 24A mostra as médias das temperaturas da RID dos animais CE e OE, antes, durante e após o estresse. Os resultados do teste Two-way ANOVA apresentaram diferenças significativas nas médias das temperaturas da RID para as variáveis interação tempo x dieta ( $F(33, 330)$ ;  $p = 0,02$ ) e tempo ( $F(33, 330)$ ). Entretanto, não houve diferença significativa para o fator dieta ( $F(1, 10)$ ;  $p = 0,1$ ). O resultado do pós-teste Holm-Sidak mostrou que houve diferença significativamente no tempo -2 min do período de estabilização. As Figuras 24B e 24C contém fotos originais com luz infravermelha representativas da temperatura da RID dos animais, que foram submetidos ao estresse.



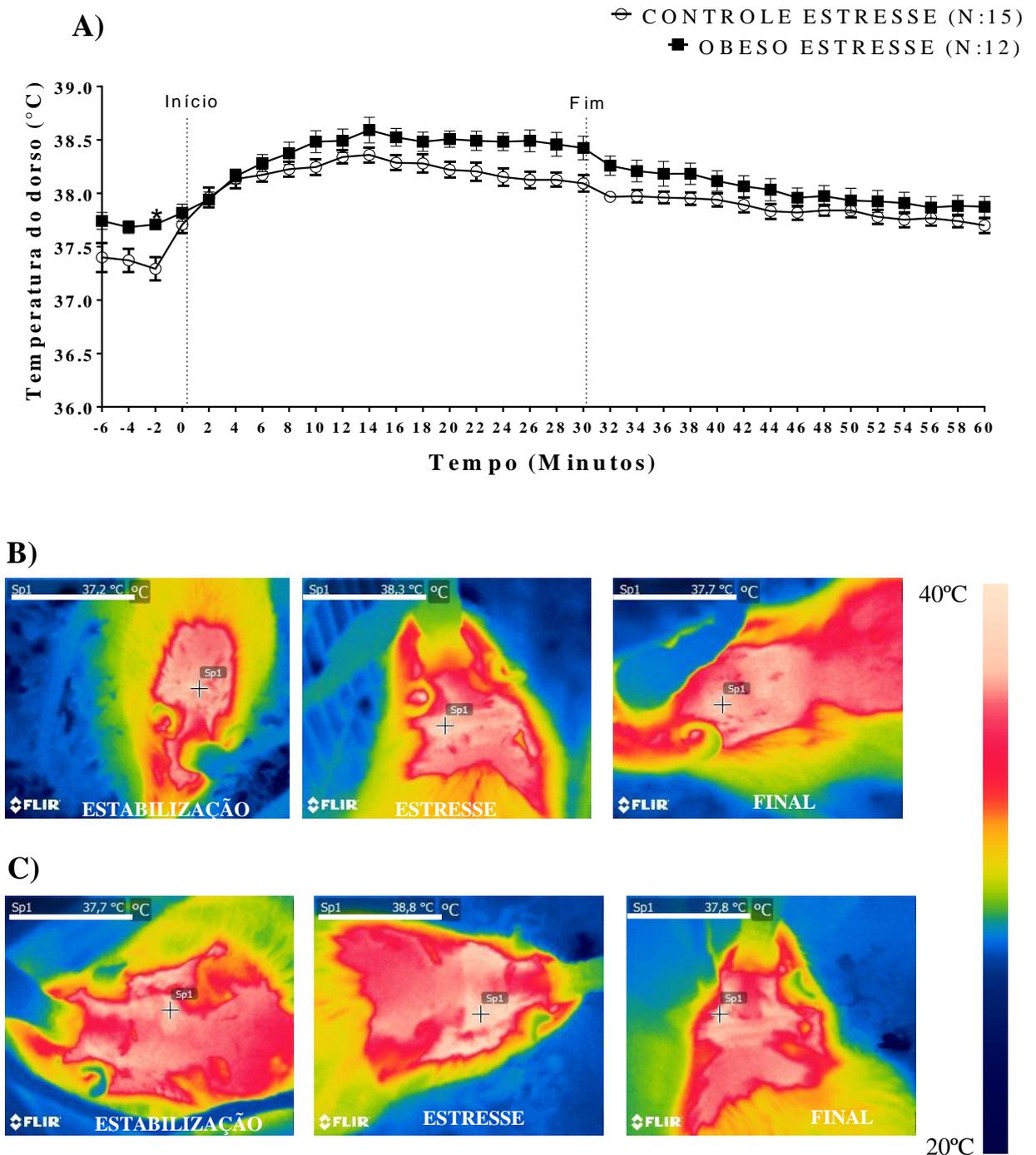
**B)**



**C)**



**Figura 23:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura do dorso dos animais. (A) Representa médias obtidas da temperatura do dorso dos animais não submetidos ao estresse dos grupos controle e obeso. N: Número de animais por grupo. Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. \*Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM). Em (B) animais do grupo controle e em (C) animais do grupo obesos. As fotos são originais com luz infravermelha mostrando as alterações da temperatura do dorso dos animais não submetidos ao estresse durante os experimentos. Sp1: Marcador do local mensurado de temperatura e valor obtido no momento da fotografia.

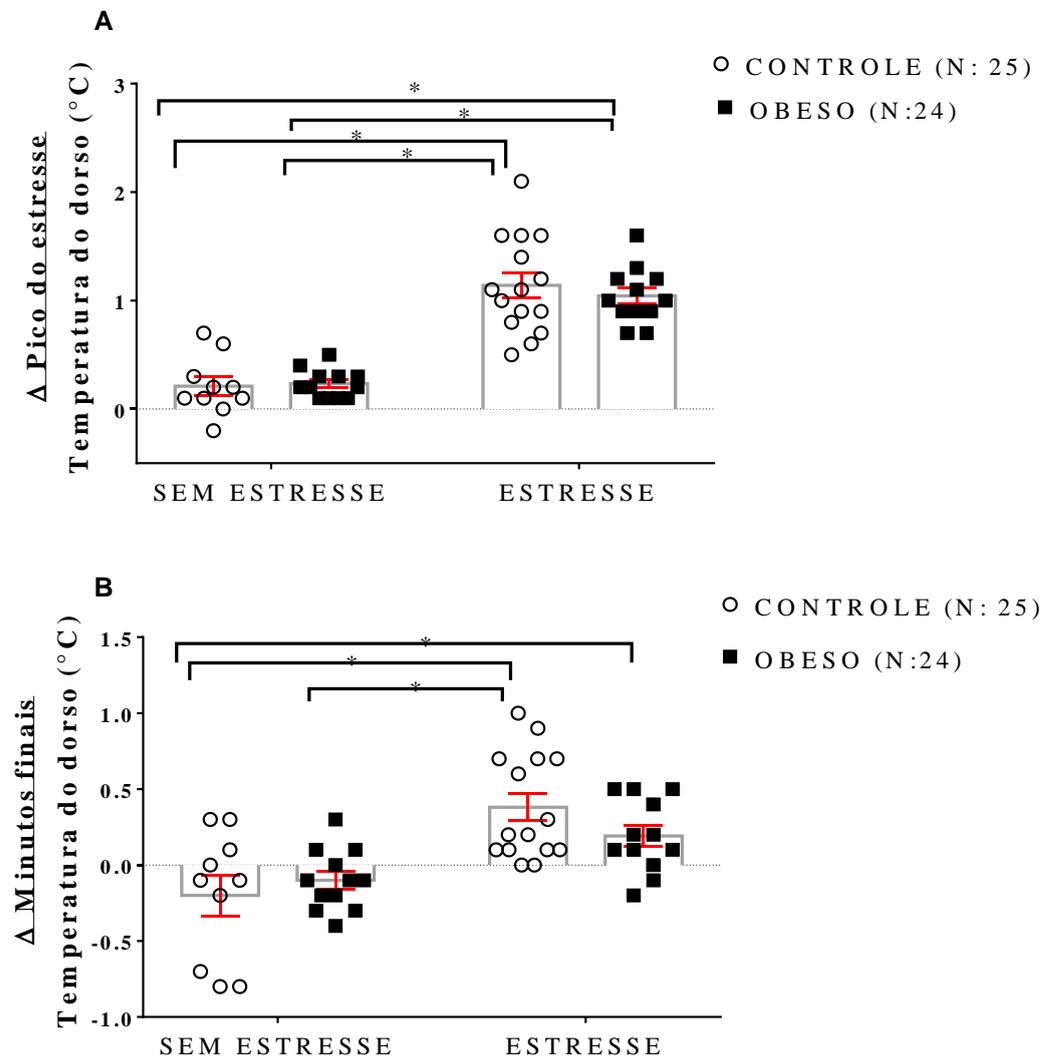


**Figura 24:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura do dorso dos animais. (A) Representa médias obtidas da temperatura do dorso dos animais submetidos ao estresse dos grupos controle e obeso. N: Número de animais por grupo. Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM). Em (B) animais do grupo controle e em (C) animais do grupo obesos. As fotos são originais com luz infravermelha mostrando as alterações da temperatura do dorso dos animais submetidos ao estresse durante os experimentos. Sp1: Marcador do local mensurado de temperatura e valor obtido no momento da fotografia.

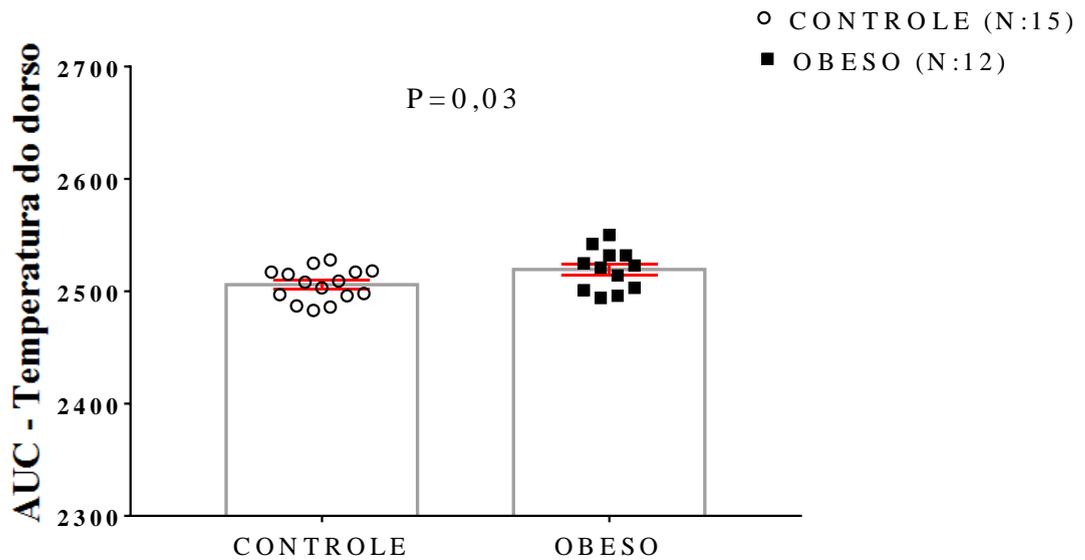
A Figura 25A apresenta os valores de delta de maior variação da temperatura do dorso que corresponde ao pico do estresse subtraído da média dos valores de estabilização inicial (seis minutos), sendo que foram analisadas as variáveis dieta (grupo controle e obeso) e condição (sem estresse e estresse). Os resultados do teste Two-way Anova mostrou diferença significativa nos valores de delta de maior variação da temperatura do dorso entre os grupos somente na variável condição ( $F(1, 45)$ ;  $P < 0,0001$ ). Não houve diferença significativa nas variáveis dieta ( $F(1, 45)$ ;  $p = 0,6$ ) e interação dieta x condição ( $F(1, 45)$ ;  $p = 0,5$ ). O resultado do pós-teste Holm-Sidak apresentou diferenças significativas entre os grupos CNE vs CE; CNE vs OE; ONE vs CE; ONE vs OE com  $P < 0,0001$ .

A Figura 25B apresenta os valores de delta dos seis minutos finais da temperatura do dorso que corresponde à média dos seis minutos finais subtraído da média dos valores basais. O resultado do teste Two-way Anova mostrou diferença significativa nos valores de delta da temperatura do dorso entre os grupos somente na variável condição ( $F(1, 45)$ ;  $p = 0,0001$ ). Não se observou diferença significativa nas variáveis dieta ( $F(1, 45)$ ;  $p = 0,6$ ) e interação dieta x condição ( $F(1, 45)$ ;  $p = 0,1$ ). O resultado do pós-teste Holm-Sidak mostrou diferença significativa entre os grupos CNE vs CE; CNE vs OE; ONE vs CE com  $p < 0,05$ .

Os valores da área sob a curva relacionados ao efeito do estresse na temperatura do dorso dos animais que foram submetidos ao estresse estão apresentados na figura 26. Sendo que o grupo obeso [ $2519 \pm 5,252$ ; (IC95% = 2514 – 2525)] apresentou temperatura do dorso em torno de 0,4 % mais elevada em comparação com o grupo controle [ $2506 \pm 3,696$ ; (IC95% = 2501 – 2510)];  $p = 0,03$ .



**Figura 25:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura do dorso (A) Delta de maior variação da temperatura da cauda que corresponde ao pico do estresse subtraído da média dos valores de estabilização inicial (seis minutos). (B) Delta dos seis minutos finais da temperatura da cauda que corresponde à média dos seis minutos finais subtraído pela média dos valores da estabilização. Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. N: Número de animais por grupo. \*Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).



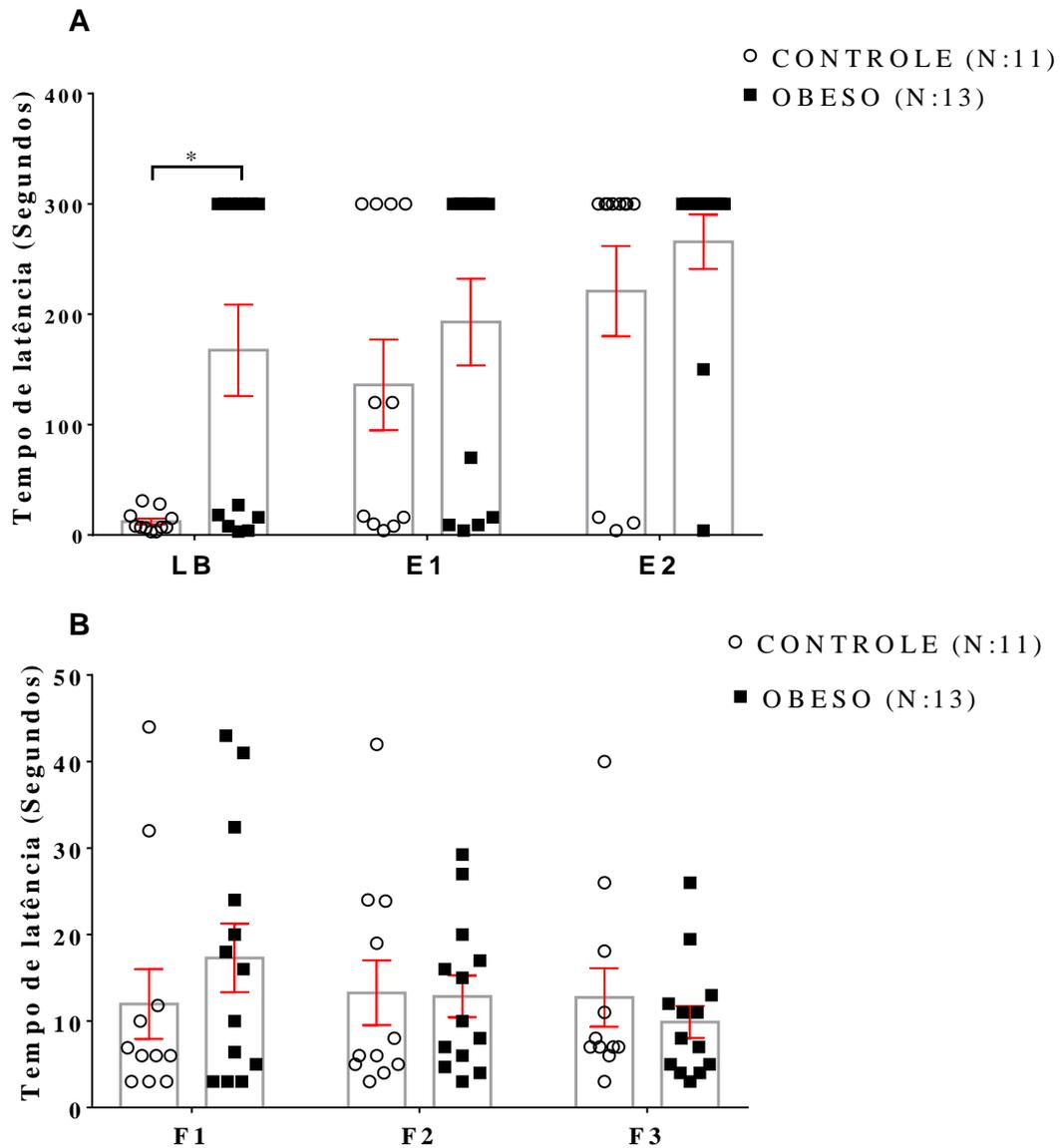
**Figura 26:** Resultados do efeito da obesidade em resposta ao estresse na temperatura do dorso sobre a área sob a curva dos animais que foram submetidos ao estresse. N: Número de animais por grupo. P: Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).

#### 4.6 Testes comportamentais

Os animais dos grupos CE e OE foram submetidos aos testes comportamentais e os resultados de cada um desses são apresentados a seguir.

##### 4.6.1 Labirinto em T-Elevado (LTE)

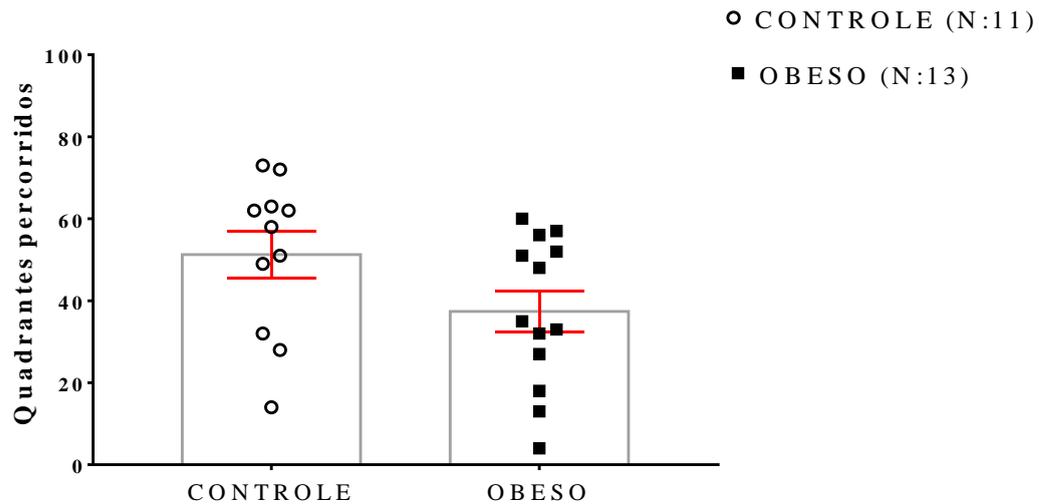
A Figura 27A ilustra os resultados obtidos pelos animais do grupo CE e OE no comportamento de esquiwa inibitória (LB= Linha de base; E1= Esquiwa 1; E2= Esquiwa 2). Enquanto a Figura 27B, apresenta os resultados obtidos do comportamento de fuga (F1= Fuga 1; F2= Fuga 2; F3= Fuga 3) nesses mesmos grupos de animais. No comportamento de esquiwa inibitória, o teste Two-way mostrou diferença significativa nas variáveis tempo (F (2, 44);  $p < 0,0001$ ) e dieta (F (1, 22);  $p = 0,03$ ). No entanto, não houve diferença significativa na variável interação tempo x dieta (F (2, 44);  $p = 0,08$ ). Ao passo que para o comportamento de fuga, o teste Two-way não alcançou diferença significativa para nenhuma variável.



**Figura 27:** Resultados dos experimentos que mediram o tempo de latência das tentativas de esQUIVA INIBITÓRIA e fuga nos animais dos grupos Controle sob estresse (CE) e Obeso sob estresse (OE). N: Número de animais por grupo. LB: Linha de base. E: EsQUIVA. F: Fuga. Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. \*Diferença significativa estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).

#### 4.6.2 Teste de atividade locomotora

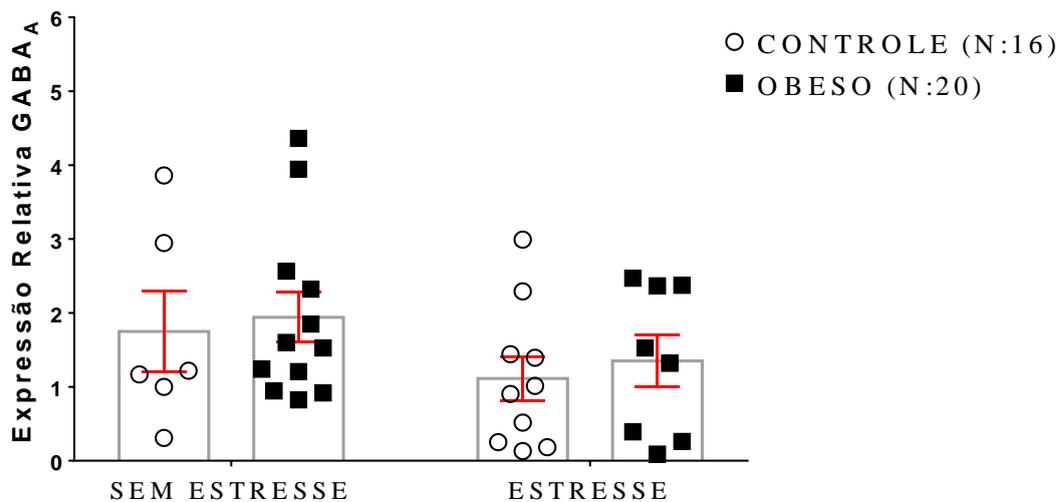
A Figura 28 apresenta os resultados obtidos em relação à atividade locomotora dos animais dos grupos CE e OE. O resultado do teste t de Student – não pareado não mostrou diferença significativa na atividade locomotora entre os grupos dietéticos ( $p = 0,08$ ).



**Figura 28:** Resultado do número de quadrantes percorridos pelos animais dos grupos Controle sob estresse (CE) e obeso submetido ao estresse (OE) no campo aberto. N: Número de animais por grupo. Analisados pelo teste estatístico t de Student – não pareado. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).

#### 4.7 Expressão gênica de *GABA*

Os resultados da expressão gênica relativa da Subunidade delta do Receptor do Ácido Gama-aminobutírico (GABA) estão apresentados na Figura 29. O teste Two-way ANOVA, mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos.



**Figura 29:** Resultados da expressão relativa GABA. Método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Teste Two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak. N: Número de animais por grupo. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM).

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que a dieta hiperlipídica DH foi capaz de alterar a composição corporal dos animais, induzindo de forma eficiente a obesidade, aumentou os níveis basais de FC, TCI e a temperatura da cauda nos animais que foram alimentados com a DH. Além disso, a obesidade promoveu os aumentos da FC, TCI e na temperatura da cauda dos animais que foram submetidos ao estresse. Em relação à temperatura do dorso dos animais, durante o período de estabilização não houve diferença significativa entre os grupos controle e obeso. Durante o estresse houve um aumento da temperatura do dorso em todos os animais. Entretanto, esse aumento não foi significativo entre os grupos controle e obeso submetidos ao estresse. Nos animais com obesidade houve alteração comportamental na esQUIVA inibitória, que corresponde o comportamento do tipo ansiedade. Os resultados expressão gênica da subunidade delta do Receptor do Ácido Gama-aminobutírico (GABA)<sub>A</sub> mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos controle e obeso.

Existem diversos modelos que induzem a obesidade em animais (ABREU *et al.*, 2014; MCNEILLY *et al.*, 2015; NORONHA *et al.*, 2017; SIVANATHAN *et al.*, 2015; SHARMA; FULTON, 2012) Nosso estudo induziu a obesidade por meio do protocolo nutricional padronizado por Abreu *et al.* (2014), no qual os animais foram alimentados com DH pelo período de nove semanas. Os nossos resultados corroboram com os estudos de Abreu *et al.* (2014) e Noronha *et al.* (2017) os quais demonstraram que a DH foi eficaz no desenvolvimento da obesidade.

A gravidade da obesidade não está diretamente ligada ao acúmulo de gordura total, mas principalmente do acúmulo do tecido adiposo visceral (DUTHEIL *et al.*, 2017). Esse tecido fica localizado na cavidade abdominal ao redor dos órgãos internos, como rins e intestinos; e sua acumulação induz inflamação crônica e distúrbios metabólicos, incluindo intolerância à glicose (NAGARETANI *et al.*, 2001), hiperlipidemia e hipertensão arterial resultando na síndrome metabólica (SERAVALLE; GRASSI, 2017). Estudos relatam que a síndrome metabólica está correlacionada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (BOUDET *et al.*, 2016; DUTHEIL *et al.*, 2013; NAKAMURA *et al.*, 1994).

Contudo, a obesidade pode ser avaliada em modelos animais, por meio da quantificação do tecido adiposo corporal, não levando em consideração somente o ganho de peso, mas também a quantificação de tecidos em compartimentos viscerais que representam uma medida capaz de refletir as alterações metabólicas (JUDEX *et al.*, 2010). Sendo assim, avaliamos a

indução da obesidade no modelo animal por meio da quantificação de três principais tecidos adiposos, sendo o tecido subcutâneo entre a parte inferior da caixa torácica e o meio da coxa, denominado tecido adiposo inguinal; o tecido ligado a parede abdominal posterior próxima aos rins e a porção abdominal dos ureteres denominado de tecido adiposo retroperitoneal; e o tecido abdominal na parte inferior do abdômen ligado ao epidídimo, chamado de tecido epididimal (CATTAPRETA *et al.*, 2012). Por meio dessas delimitações, quantificamos os valores da massa gorda, ganho de peso, IA, IL e o peso dos tecidos adiposos inguinal, retroperitoneal e epididimal, no qual todos apresentaram um aumento significativo nos animais do grupo obeso comparados aos do grupo controle, indicando a capacidade efetiva da DH em induzir a obesidade nos animais.

Estudos mostram que os neurônios da região do HDM participam da integração das respostas fisiológicas cardiovasculares (STOTZ-POTTER; WILLIS; DIMICCO, 1996), neuroendócrinas (BAILEY; DIMICCO, 2001) e comportamentais presentes durante o estresse emocional em ratos (DIMICCO *et al.*, 2002). Nesse sentido, o papel do HDM no controle autonômico ao estresse agudo vem sendo explorado principalmente, pelo modelo de estresse por jato de ar (ABREU *et al.*, 2014; SOLTIS; DIMICCO, 1992; XAVIER *et al.*, 2009). No nosso estudo utilizamos o modelo de animal intruso que é considerado um modelo de estresse emocional, tecnicamente simples, econômico e as alterações cardiovasculares são consideráveis e confiáveis (MESQUITA *et al.*, 2016).

Durante o período de estresse o aumento da FC foi evidenciado em todos os animais. Entretanto, os animais obesos apresentaram FC mais elevada em comparação com os animais do grupo controle, durante todo o experimento. Assim como no nosso estudo, evidências científicas com diferentes modelos experimentais já relataram que animais alimentados com dieta hipercalórica ou DH tiveram um aumento significativo no peso corporal e aumento da FC durante o período de estabilização (ABREU *et al.*, 2014; SILVA, 2018; TOIT; NABBEN; LOCHNER, 2005). Além disso, estudos mostraram que diferentes tipos de estresse agudo evocam um aumento de FC (ABREU *et al.*, 2014; MESQUITA *et al.*, 2016; DIMICCO *et al.*, 1996). Esse aumento ocorre devido à alteração da atividade barorreflexa (CRESTANI *et al.*, 2010).

Estudos mostram que o aumento da atividade simpática está correlacionada ao sobrepeso e a obesidade visceral (ESLER *et al.*, 2006; MASUO *et al.*, 1997 MASUO *et al.*, 2000). Esse aumento tem sido considerado um fator importante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares associada à obesidade. Exemplo disso, são estudos realizados em animais

obesos induzidos por dieta, que sugerem que o aumento da atividade do nervo simpático (ANS) é um importante mediador da hipertensão induzida pela obesidade como  $\alpha$  e  $\beta$  antagonistas dos receptores adrenérgicos e a deservação renal atenuarem significativamente no aumento na pressão sanguínea associado com ganho de peso (CARLYLE *et al.*, 2002; ESLER *et al.*, 2006). Além disso, em nosso estudo, os animais do grupo obeso não retornaram para os valores basais de FC após término do estresse. Em situações normais, as alterações cardiovasculares que ocorrem em mamíferos durante o estresse, retornam ao estado de estabilização após o término da situação estressora. Entretanto, situações prolongadas ou constantes de estresse podem levar a doenças cardiovasculares como arritmias cardíacas (LEOR; POOLE; KLONER, 1996), hipertensão arterial, infarto do miocárdio e até mesmo morte súbita (DIMICCO *et al.*, 2002).

Outro importante parâmetro relativo ao estresse que foi analisado foi a TCI. A TCI é o resultado do equilíbrio térmico entre a produção de calor metabólico e a sua dissipação, no qual é mantida por meio da associação de ajustes comportamentais e autonômicos, nomeados de atividade termofetora (CHEN *et al.*, 1998; MAICKEL *et al.*, 1991). Nossos resultados mostraram um aumento significativo na TCI dos animais obesos submetidos ao estresse e também um maior pico de variação da TCI desses animais. Após o término do estresse, não houve diferença significativa quando comparados ao retorno de estabilização entre os grupos. Entretanto, quando avaliado o efeito do estresse nos valores da área sob a curva da TCI, os animais do grupo obeso apresentaram aumento na TCI de 3,2% em relação aos do grupo controle. Esses achados reforçam os estudos que sugerem que o sistema termorregulatório pode ser afetado pelo estresse e por meio disso ocorre alterações na temperatura corporal (KATAOKA *et al.*, 2014; VINKERS *et al.*, 2013) e que os animais após serem expostos a diferentes situações de estresse apresentam um aumento de temperatura (REIS, 2018).

Os mamíferos necessitam reduzir ou aumentar as trocas de calor com o meio ambiente dependendo da temperatura a qual estão expostos. Em ratos, a cauda apresenta características típicas de janelas térmicas, a qual representa 7% da área de superfície corporal total. A cauda é constituída de um tecido altamente vascularizado, não apresenta pelos e permite uma rápida modificação do fluxo sanguíneo durante situações de estresse (ANDRADE, 2015; GORDON, 1990; ROMANOVSKY *et al.*, 2002). Em nosso estudo, os animais obesos apresentaram um aumento significativo da temperatura da cauda em relação aos animais do grupo controle, tanto naqueles que foram submetidos ao estresse, como também nos animais que não foram submetidos. A maior diferença de variação da temperatura da cauda somente apresentou diferença significativa em relação ao fator dieta. Por outro lado, a diferença de variação dos seis

minutos finais apresentou diferença significativa somente no fator condição estresse. Esses resultados mostram que os animais do grupo obeso apresentaram maiores picos de temperatura da cauda, mas que a dissipação de calor pela cauda ocorreu de forma similar aos animais do grupo controle. Entretanto, os valores da temperatura da cauda da área sob a curva no grupo obeso apresentaram valores 10,6% mais elevados em relação aos animais não obesos.

Os resultados da temperatura do dorso mostraram que durante o tempo de estabilização, não houve diferença significativa entre os grupos controle e obeso; e durante o estresse houve um aumento da temperatura do dorso em todos os animais. Entretanto, este aumento foi semelhante entre os grupos. Quando avaliado os valores da área sob a curva, os animais obesos apresentaram temperatura do dorso 0,4% mais elevada. Esses dados reforçam que em animais endotérmicos vários mecanismos são recrutados para regulação da temperatura (BÍCEGO *et al.*, 2007). Exemplos desses são as redes neurais independentes, controlada pela temperatura corporal e/ou temperatura da pele, que são detectadas por termorreceptores (MORRISON; NAKAMURA, 2011).

Esses dados mostram que a temperatura corporal durante o estresse é aumentada em ratos e em maior proporção em ratos obesos. Isso ocorre por meio da combinação da termogênese obrigatória (SILVA, 1995) e a termogênese facultativa (LOWELL; SPIEGELMAN, 2000). Além disso, o aumento da atividade simpática estimula o TAM por meio da noradrenalina, que atua nos receptores de membrana noradrenérgicos  $\beta_3$ , que por sua vez, ativa uma cascata de sinalização promovendo a regulação da proteína desacopladora-1 e dissipando a energia do gradiente eletroquímico em forma de calor, produzindo tal aumento (CANNON; NEDERGAARD, 2004; SEALE; KAJIMURA; SPIEGELMAN, 2009). É importante ressaltar que não foram encontradas pesquisas que relataram análises realizadas simultaneamente da TCI, temperatura da cauda e a temperatura do dorso de animais induzidos a obesidade e submetidos ao estresse. Além disso, esse estudo provavelmente é pioneiro a relacionar dados da TCI, temperatura da cauda e do dorso em animais induzidos a obesidade por DH e submetidos ao estresse.

Além de analisar os parâmetros fisiológicos frente à exacerbação das alterações cardiovasculares e das temperaturas, também foi nosso objetivo analisar o comportamento dos animais após o estresse. E, portanto, com o intuito de eliminar viés para análise de expressão gênica, realizamos os testes comportamentais somente nos animais que foram submetidos ao estresse. Desta forma, utilizamos os testes comportamentais de esquiava inibitória e fuga no LTE e o teste para avaliar a atividade locomotora no CA (ZANGROSSI; GRAEFF, 2014). O

LTE vem sendo muito utilizado como modelo de teste para avaliar o comportamento do tipo ansiedade (ABREU, 2016; CHÍRICO *et al.*, 2018; NORONHA *et al.*, 2017; ZANGROSSI; GRAEFF, 2014). O teste LTE, assim como também o LCE, baseia-se no comportamento exploratório de roedores e a sua aversão natural a espaços abertos, que normalmente causa o medo e a ansiedade (TREIT; MENARD; ROYAN, 1993; ZANGROSSI; GRAEFF, 2014).

Embora, não se possa excluir outros fatores ambientais não controláveis, a obesidade parece ser um fator que induz alteração comportamental observado na esquiiva inibitória no LTE que corresponde ao comportamento do tipo ansiedade. Houve aumento do tempo de latência da esquiiva inibitória na primeira exposição ao aparato (Linha de Base). Além disso, os animais tanto do grupo obeso quanto do grupo controle apresentaram um aumento gradativo no tempo de latência quando expostos ao braço fechado do LTE. Esses resultados sugerem que os animais obesos têm maior propensão ao comportamento do tipo ansiedade e que ambos os animais do grupo obeso e controle possuem capacidade de aprendizado ao evitar o ambiente aberto e alto (MORAIS *et al.*, 2016; CHÍRICO *et al.*, 2018).

Foi proposto por Shekhar *et al.* (1996) que a disfunção crônica da neurotransmissão GABAérgica do HDM seria promotora do transtorno de pânico, uma vez que as características comportamentais, cardiovasculares e respiratórias observadas durante o ataque de pânico, eram similares. Entretanto, no teste de fuga no comportamento do tipo pânico não houve diferença significativa tanto no tempo de latência entre as tentativas e nem em relação à dieta dos animais.

Nossos resultados estão em concordância com outros estudos que também demonstraram que a obesidade foi eficiente em promover o comportamento do tipo ansiedade no LTE, evidenciando aumento do tempo de latência dos animais quando expostos ao braço fechado do LTE, como também não apresentaram comportamento do tipo pânico (ABREU, 2016; NORONHA *et al.*, 2017). Além disso, outros estudos também mostraram que a obesidade ocasionou comportamento do tipo ansiedade por meio de diferentes testes comportamentais em ratos alimentados com dieta hiperlipídica (ASLANI, 2014; BILBO; TSANG, 2010; SASAKI *et al.*, 2013; SIVANATHAN *et al.*, 2015).

Após o teste no LTE, os animais foram submetidos ao teste de atividade locomotora, a fim de validar e confirmar a resposta comportamental do LTE por meio do CA. Os resultados mostraram que a obesidade não foi capaz de alterar a atividade locomotora, sugerindo que o comportamento do tipo ansiedade nos animais obesos não foi induzido por alterações da atividade locomotora.

Nosso estudo baseou-se em trabalhos que relataram a disfunção GABAérgica no HDM como promotora dos estados de ansiedade (NORONHA *et al.*, 2017) e da exacerbação das alterações cardiovasculares (ABREU *et al.*, 2014) em animais obesos por meio de análises com agonista e antagonista / GABA<sub>A</sub>. Diversas hipóteses foram sugeridas, dentre elas, que a diminuição hipotalâmica de GABA foi por comprometimento do influxo de cloreto, ou por redução da liberação de vesículas, ou por diminuição da afinidade de GABA pelo receptor GABA<sub>A</sub> ou ainda por comprometimento dos receptores (ABREU *et al.*, 2014; IMAMURA; PRASAD, 1998) como a redução dos níveis de mRNA das subunidades dos receptores GABA<sub>A</sub>. Desta forma, buscamos quantificar o nível de expressão gênica da subunidade delta do receptor GABA<sub>A</sub> no HDM utilizando a técnica de PCR em tempo real.

O nível de expressão gênica da subunidade delta do receptor GABA<sub>A</sub> não foi significativamente alterado entre os grupos avaliados. Esse achado, porém, não exclui a possibilidade de alterações na neurotransmissão GABAérgica no HDM. Uma das possibilidades pode ser o nível de expressão gênica da GAD desses animais, uma vez que, essa enzima é responsável pela síntese do GABA (BERGADO-ACOSTA *et al.*, 2014). Em um estudo realizado por Kramer *et al.* (2000) foi demonstrado que em ratos espontaneamente hipertensos a GAD estava reduzida. Outra possibilidade seria analisar o nível de expressão gênica dos componentes do sistema GABAérgico como diferentes subunidades do receptor GABA<sub>A</sub>, por meio da técnica de *microarrays* (NORIEGA *et al.*, 2010). Essa técnica permite analisar diversos genes de maneira simultânea (GUINDALINI; TUFIK, 2007), desta forma poderíamos investigar a expressão de outras subunidades que poderiam estar envolvidas na disfunção GABAérgica. Finalmente, alterações na expressão gênica poderiam ser analisadas sob condições de estresse crônico.

É importante considerar que existem vários aspectos ligados à complexidade não apenas dos efeitos da obesidade, como sendo promotora de estados de ansiedade e da exacerbação das alterações cardiovasculares, como também dos mecanismos do estresse sobre a homeostase do organismo, e sobre o mecanismo que gera o comprometimento da neurotransmissão GABAérgica, e ainda a sobreposição dos mesmos.

## 6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados e de acordo com as condições experimentais, pode-se concluir que a dieta hiperlipídica utilizada neste estudo, foi eficiente na indução da obesidade de ratos. Animais estressados e obesos apresentaram aumento de FC, TCI e na temperatura da cauda. Além disso, os animais obesos estressados se mostraram propensos ao comportamento do tipo ansiedade. A mudança no padrão de resposta local não foi associada a alteração da expressão gênica da subunidade delta do receptor GABA<sub>A</sub> nas condições avaliadas nesse estudo. O presente estudo colabora com a literatura sendo, provavelmente, um estudo pioneiro ao investigar simultaneamente os parâmetros da FC, TCI, temperatura da cauda, temperatura do dorso e dos achados comportamentais em animais obesos submetidos ao estresse.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALLAY, Laura R *et al.* Overweight and obesity: a review of their relationship to metabolic syndrome, cardiovascular disease, and cancer in South America. **Nutrition Reviews**, [s.l.], v. 71, n. 3, p.168-179, 7 jan. 2013.

ABREU, Aline Rezende Ribeiro de *et al.* Blunted GABA-mediated inhibition within the dorsomedial hypothalamus potentiates the cardiovascular response to emotional stress in rats fed a high-fat diet. **Neuroscience**, [s.l.], v. 262, p.21-30, mar. 2014.

ABREU, Aline Rezende Ribeiro de. **Avaliação da vulnerabilidade às respostas do tipo pânico em ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.** 107 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016.

AIHARA, H.; OKADA, Y.; TAMAKI, N. The effects of cooling and rewarming on the neuronal activity of pyramidal neurons in guinea pig hippocampal slices. **Brain Res.**, [s.l.], v. 893, p. 36–45. 2001.

ALBERT, Michelle A. *et al.* Cumulative psychological stress and cardiovascular disease risk in middle aged and older women: Rationale, design, and baseline characteristics. **American Heart Journal**, [s.l.], v. 192, p.1-12, out. 2017.

ANDRADE, D. V. Thermal windows and heat exchange. **Temperature**, [s.l.], v. 2, n. 4, p. 451 – 451, out. 2015.

ASLANI, S. **Dissecting the crosstalk between stress, depression and obesity.** Tese [Doutorado em Ciências da Saúde]. Braga, Universidade de Minho, 2014.

BAILEY, Timothy W.; DIMICCO, Joseph A. Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus elevates plasma ACTH in conscious rats. **American Journal of Physiology-regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, [s.l.], v. 280, n. 1, p.8-15, jan. 2001.

BARROSO, Maria *et al.* Interaction between cardiovascular risk factors and body mass index and 10-year incidence of cardiovascular disease, cancer death, and overall mortality. **Preventive Medicine**, [s.l.], v. 107, p.81-89, fev. 2018.

BAZHAN, Nadezhda; ZELENA, Dóra. Food-intake regulation during stress by the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Brain Research Bulletin**, [s.l.], v. 95, p.46-53, jun. 2013.

BERGADO-ACOSTA, JR. *et al.* The GABA-synthetic enzyme GAD65 controls circadian activation of conditioned fear pathways. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 260, p.92-100, mar. 2014.

BERNARDIS, L; BELLINGER, L. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1998 update. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, [s.l.], v. 8, n.4, p. 284-306, 1998.

BICEGO, K.C.; BARROS, R.C.; BRANCO, L.G. Physiology of temperature regulation: comparative aspects. **Comp BiochemPhysiolA Mol Integr Physiol.**, [s.l.], v. 147, p. 616–639, 2007.

BILBO, Staci D.; TSANG, Verne. Enduring consequences of maternal obesity for brain inflammation and behavior of offspring. **The FASEB Journal**, [s.l.], v. 24, n. 6, p.2104-2115, jun. 2010.

BLESSING, W. *et al.* Control of the cutaneous circulation by the central nervous system. **Comprehensive Physiology**, [s.l.], p. 1161-1197, 2016.

BRASIL, Vigitel. "**Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**". Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento

de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. –Brasília : Ministério da Saúde. 2017.

BRICKLEY, Stephen G. *et al.* Adaptive regulation of neuronal excitability by a voltage-independent potassium conductance. **Nature**, [s.l.],v. 409, n. 6816, p.88-92, jan. 2001.

BRIONES-ARANDA, Alfredo; ROCHA, Luisa; PICAZO, Ofir. Alterations in GABAergic function following forced swimming stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s.l.], v. 80, n. 3, p.463-470, mar. 2005.

BOUDET, Gil *et al.* Paradoxical dissociation between heart rate and heart rate variability following different modalities of exercise in individuals with metabolic syndrome: The RESOLVE study. **European Journal of Preventive Cardiology**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.281-296, 19 nov. 2016.

CANNON, Barbara; NEDERGAARD, Jan. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. **Physiological Reviews**, [s.l.],v. 84, n. 1, p.277-359, jan. 2004.

CARLYLE, Megan *et al.* Chronic Cardiovascular and Renal Actions of Leptin. **Hypertension**, [s.l.], v. 39, n. 2, p.496-501, fev. 2002.

CATTA-PRETA, Mariana *et al.* Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by different high-fat diets. **Nutrition**, [s.l.],v. 28, n. 2, p.212-219, fev. 2012.

CHANDRA, D. *et al.* GABA<sub>A</sub>receptor 4 subunits mediate extrasynaptic inhibition in thalamus and dentate gyrus and the action of gaboxadol. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.],v. 103, n. 41, p.15230-15235, 27 set. 2006.

CHEN, X. M. *et al.* New apparatus for studying behavioral thermoregulation in rats. **Physiology&behavior**, [s.l.], v. 64, n. 3, p. 419 – 424, jun, 1998.

CHÍRICO, Máira Tereza Talma *et al.* Tobacco-Free Cigarette Smoke Exposure Induces Anxiety and Panic-Related Behaviours in Male Wistar Rats. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-26, 21 mar. 2018.

CRESTANI, C. *et al.* N-Methyl-d-aspartate glutamate receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate cardiac component of the baroreflex in unanesthetized rats. **Neuroscience Research**, [s.l.], v. 67, n. 4, p.317-326, ago. 2010.

DALLMAN, M *et al.* Chronic stress and obesity: A new view of “comfort food.” **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 100, n. 20, p. 11696-11701, 2003.

DA SILVA, E *et al.* Facilitation of 5-HT<sub>2A/2C</sub>-mediated neurotransmission in the ventromedial hypothalamic nucleus decreases anxiety in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 216, n. 2, p.692-698, 20 jan. 2011.

DE MENEZES, *et al.* Microinjection of muscimol into caudal periaqueductal gray lowers body temperature and attenuates increases in temperature and activity evoked from the dorsomedial hypothalamus. **Brain Research**, [s.l.], v. 1092, n. 1, p.129-137, may. 2006.

DE MENEZES, *et al.* Microinjection of muscimol into the periaqueductal gray suppresses cardiovascular and neuroendocrine response to air jet stress in conscious rats. **American Journal of Physiology-regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, [s.l.], v. 295, n. 3, p.881-890, set. 2008.

DE MENEZES, *et al.* Cardiovascular and thermal responses evoked from the periaqueductal grey require neuronal activity in the hypothalamus. **The Journal of Physiology**, [s.l.], v. 587, n. 6, p.1201-1215, 13 mar. 2009.

DIMICCO, Joseph A. *et al.* The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s.l.], v. 71, n. 3, p.469-480, mar. 2002.

DUTHEIL, Frédéric *et al.* Different modalities of exercise to reduce visceral fat mass and cardiovascular risk in metabolic syndrome: the RESOLVE randomized trial. **International Journal of Cardiology**, [s.l.],v. 168, n. 4, p.3634-3642, out. 2013.

DUTHEIL, Frédéric *et al.* Cardiovascular risk of adipokines: a review. **Journal of International Medical Research**,[s.l.], v. 46, n. 6, p.2082-2095, set. 2017.

EPEL, E *et al.* Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. **Psychoneuroendocrinology**, [s.l.],v. 26, p. 37–49, 2001.

FREITAS, Renato Leonardo *et al.* GABA<sub>A</sub> receptor blockade in dorsomedial and ventromedial nuclei of the hypothalamus evokes panic-like elaborated defensive behaviour followed by innate fear-induced antinociception. **Brain Research**,[s.l.], v. 1305, p.118-131, dez. 2009.

FOSS, Brynjar; DYRSTAD, Sindre M. Stress in obesity: Cause or consequence?. **Medical Hypotheses**, [s.l.],v. 77, n. 1, p.7-10, jul. 2011.

FONTES, M *et al.* O hipotálamo dorsomedial e a organização da resposta cardiovascular ao estresse emocional: Uma perspectiva funcional. **Medicina Ribeirão Preto**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 1, p. 13-20, mar. 2006.

FONTES, M *et al.* The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress. **Neuroscience**,[s.l.], v. 184, p.64-74, jun. 2011.

GORDON, C.J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiology & Behavior**,[s.l.], v. 47, n. 5, p. 963- 991, mai. 1990.

GRAEFF, Frederico G; NETTO, Cristina Ferreira; ZANGROSSI JUNIOR, Hélio. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**,[s.l.],v. 23, n. 2, p.237-246, dez. 1998.

GROESZ, L *et al.* What is eating you? Stress and the drive to eat. **Appetite**, [s.l.], v. 58, p. 717–721, 2012.

GUINDALINI, Camila; TUFIK, Sergio. Uso de microarrays na busca de perfis de expressão gênica: aplicação no estudo de fenótipos complexos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [s.l.], v. 29, n. 4, p.370-374, dez. 2007.

HABHAB, Summar; SHELDON, Jane P.; LOEB, Roger C. The relationship between stress, dietary restraint, and food preferences in women. **Appetite**, v. 52, n. 2, p.437-444, abr. 2009.

IMAMURA, Makoto; PRASAD, Chandan. Modulation of GABA-Gated Chloride Ion Influx in the Brain by Dehydroepiandrosterone and Its Metabolites. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 243, n. 3, p.771-775, fev. 1998.

JAUCH-CHARA, Kamila; OLTMANNNS, Kerstin M. Obesity – A neuropsychological disease? Systematic review and neuropsychological model. **Progress in Neurobiology**, [s.l.], v. 114, p.84-101, mar. 2014.

JOHNSON, P. L.; SHEKHAR, A. Panic-Prone State Induced in Rats with GABA Dysfunction in the Dorsomedial Hypothalamus Is Mediated by NMDA Receptors. **Journal of Neuroscience**, [s.l.], v. 26, n. 26, p.7093-7104, 28 jun. 2006.

JUDEX, S. *et al.* Quantification of adiposity in small rodents using micro-CT. **Methods**, [s.l.], v. 50, n. 1, p.14-19, jan. 2010.

KATAOKA, N. and Nakamura, K. Direct pathway from ventral medial prefrontal cortex to dorsomedial hypothalamus drives psychological stress-induced hyperthermia. **The FASEB Journal**, [s.l.], v. 30, p. 994.992, 2016.

KATAOKA, Naoya *et al.* Psychological Stress Activates a Dorsomedial Hypothalamus-Medullary Raphe Circuit Driving Brown Adipose Tissue Thermogenesis and Hyperthermia. **Cell Metabolism**, [s.l.], v. 20, n. 2, p.346-358, ago. 2014.

KIM, Y *et al.* Academic stress levels were positively associated with sweet food consumption among Korean high-school students. **Nutrition**, [s.l.], v. 29, p, 213–218, 2013.

KRAMER, Jeffery M *et al.* Hypothalamus, hypertension, and exercise. **Brain Research Bulletin**, [s.l.], v. 53, n. 1, p.77-85, set. 2000.

LAMPERT, R *et al.* Cumulative stress and autonomic dysregulation in a community sample. **Stress**, [s.l.], v. 19, n. 3, p. 269-279, 2016.

LAUGERO, *et al.* Relationship between perceived stress and dietary and activity patterns in older adults participating in the Boston Puerto Rican Health Study. **Appetite**, [s.l.], v. 56, p, 194–204, 2011.

LEOR, Jonathan; POOLE, W. Kenneth; KLONER, Robert A.. Sudden Cardiac Death Triggered by an Earthquake. **New England Journal of Medicine**, [s.l.], v. 334, n. 7, p.413-419, 15 fev. 1996.

LOWELL, Bradford B.; SPIEGELMAN, Bruce M.. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. **Nature**, [s.l.], v. 404, n. 6778, p.652-660, abr. 2000.

MAICKEL, R. P. *et al.* Antagonism of physostigmine induced hypothermia and neuroendocrine changes following exposure to different environmental temperatures. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, [s.l.], v. 15, n. 6, p. 873 – 884, 1991.

MASUO, Kazuko *et al.* Sympathetic Nerve Hyperactivity Precedes Hyperinsulinemia and Blood Pressure Elevation in a Young, Nonobese Japanese Population. **American Journal of Hypertension**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.77-83, jan. 1997.

MASUO, Kazuko *et al.* Sympathetic Activity and Body Mass Index Contribute to Blood Pressure Levels. **Hypertension Research**, [s.l.], v. 23, n. 4, p.303-310, 2000.

MASUO, Kazuko *et al.* Familial Obesity, Sympathetic Activation and Blood Pressure Level. **Blood Pressure**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.199-204, jan. 2001.

MCNEILLY, Alison *et al.* High fat feeding is associated with stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and reduced anxiety in the rat. **Psychoneuroendocrinology**, [s.l.], v. 52, p.272-280, fev. 2015.

MESQUITA, Laura Tavares *et al.* New insights on amygdala: Basomedial amygdala regulates the physiological response to social novelty. **Neuroscience**, [s.l.], v. 330, p.181-190, ago. 2016.

MIKOLAJCZYK, Rafael T; ANSARI, Walid; MAXWELL, Annette e. Food consumption frequency and perceived stress and depressive symptoms among students in three European countries. **Nutrition Journal**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-8, 15 jul. 2009.

MOHAMMED, M. Inactivation of neuronal function in the amygdaloid region reduces tail artery blood flow alerting responses in conscious rats. **Neuroscience**, [s.l.], v. 228, p. 13–22, 2013.

MÖHLER, Hanns. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. **Neuropharmacology**, [s.l.], v. 62, n. 1, p.42-53, jan. 2012.

MORRISON, S.F.; NAKAMURA, K. Central neural pathways for thermoregulation. **Front Biosci.**, [s.l.], v. 16, p.74–104, 2011.

NAGARETANI, H. *et al.* Visceral Fat Is a Major Contributor for Multiple Risk Factor Clustering in Japanese Men With Impaired Glucose Tolerance. **Diabetes Care**, [s.l.], v. 24, n. 12, p.2127-2133, dez. 2001.

NASCIMENTO, J.; ZANGROSSI JUNIOR, H.; VIANA, M. Effects of reversible inactivation of the dorsomedial hypothalamus on panic- and anxiety-related responses in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s.l.], v. 43, n. 9, p.869-873, set. 2010.

NAKAMURA, K. Neural circuit for psychological stress-induced hyperthermia. **Temperature**, [s.l.], v. 2, p. 352–361, 2015.

NAKAMURA, Tadashi *et al.* Contribution of visceral fat accumulation to the development of coronary artery disease in non-obese men. **Atherosclerosis**, [s.l.], v. 107, n. 2, p.239-246, jun. 1994.

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants. **The Lancet**, [s.l.], v. 387, n. 10026, p.1377-1396, abr. 2016.

NORIEGA, Nigel C. *et al.* Influence of 17 $\beta$ -estradiol and progesterone on GABAergic gene expression in the arcuate nucleus, amygdala and hippocampus of the rhesus macaque. **Brain Research**, [s.l.], v. 1307, p.28-42, jan. 2010.

NORONHA, SylvanaRendeiro de *et al.* High fat diet induced-obesity facilitates anxiety-like behaviors due to GABAergic impairment within the dorsomedial hypothalamus in rats. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 316, p.38-46, jan. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. "**OverweightandObesity**". 2017. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acessoem: 05 de maio 2018.

OOTSUKA, Y. *et al.* Brown adipose tissue thermogenesis heats brain and body as part of the brain-coordinated ultradian basic rest-activity cycle. **Neuroscience**, [s.l.], v. 164, n. 2, p.849-861, dez. 2009.

PACÁK, Karel; PALKOVITS, Miklós. Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders. **Endocrine Reviews**, [s.l.], v. 22, n. 4, p.502-548, ago. 2001.

PÉREZ, Antonio Pérez *et al.* Obesity and cardiovascular disease. **Public Health Nutrition**, [s.l.], v. 10, n. 10, p.1156-1163, 28 set. 2007.

POBBE, Roger L.h. *et al.* Influence of procedural variables on rat inhibitory avoidance and escape behaviors generated by the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 273, p.45-51, out. 2014.

REIS, Thayane Oliveira. **Participação do receptor de potencial transitório vanilóide do tipo 1 (TRPV1) nas respostas termorregulatórias em ratos Wistar submetidos a estresse social.** 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

ROMANOVSKY, A.A.; IVANOV, A.I.; SHIMANSKY, Y.P. Selected contribution: Ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. **Journal of Applied Physiology**, [s.l.], v. 92, n. 6, p. 2667-2679, jun. 2002.

SASAKI, A. *et al.* Perinatal high fat diet alters glucocorticoid signaling and anxiety behavior in adulthood. **Neuroscience**, [s.l.], v. 240, p.1-12, jun. 2013.

SAPER, Clifford B.; LOWELL, Bradford B.. The hypothalamus. **Current Biology**, [s.l.], v. 24, n. 23, p.1111-1116, dez. 2014.

SEALE, P.; KAJIMURA, S.; SPIEGELMAN, B. M.. Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function--of mice and men. **Genes & Development**, [s.l.],v. 23, n. 7, p.788-797, 1 abr. 2009.

SERAVALLE, Gino; GRASSI, Guido. Obesity and hypertension. **Pharmacological Research**,[s.l.],v. 122, p.1-7, ago. 2017

SERGIO, Thatiane; SPIACCI, Jr; ZANGROSSI, Jr. Effects of dorsal periaqueductal gray CRF1-and CRF2-receptor stimulation in animal models of panic. **PSychoneuroendocrinology**,[s.l.],v. 49, p. 321-330, NOV 2014.

SERLACHIUS, Anna; HAMER, Mark; WARDLE, Jane. Stress and weight change in university students in the United Kingdom. **Physiology&Behavior**,[s.l.],v. 92, n. 4, p.548-553, nov. 2007.

SILVA, J. Enrique. Thyroid Hormone Control of Thermogenesis and Energy Balance. **Thyroid**, [s.l.],v. 5, n. 6, p.481-492, dez. 1995.

SILVA, Thais Marques da. **Avaliação de parâmetros bioquímicos e cardiovasculares em ratos alimentados com dieta do tipo cafeteria**. 2018. 142 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de São João del Rei, Divinópolis, 2018.

SINHA, Rajita; JASTREBOFF, Ania M. Stress as a Common Risk Factor for Obesity and Addiction. **Biological Psychiatry**, [s.l.],v. 73, n. 9, p.827-835, may. 2013.

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

SHARMA, S; FULTON, S. Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. **International Journal of Obesity**, [s.l.], v. 37, n. 3, p.382-389, 17 abr. 2012.

SHEKHAR, A. Angiotensin-II Is a Putative Neurotransmitter in Lactate-Induced Panic-Like Responses in Rats with Disruption of GABAergic Inhibition in the Dorsomedial Hypothalamus. **Journal of Neuroscience**, [s.l.], v. 26, n. 36, p.9205-9215, 6 set. 2006.

SHEKHAR, A. GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats regulate anxiety in the elevated plus-maze test. I. Behavioral measures. **Brain Research**, [s.l.], v. 627, n. 1, p.9-16, nov. 1993.

SHEKHAR, A. *et al.* Dorsomedial hypothalamic GABA dysfunction produces physiological arousal following sodium lactate infusions. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s.l.], v. 55, n. 2, p.249-256, out. 1996.

STEPTOE, Andrew; KIVIMÄKI, Mika. Stress and cardiovascular disease. **Nature Reviews Cardiology**, [s.l.], v. 9, n. 6, p.360-370, 3 abr. 2012.

STOTZ-POTTER, Elizabeth H; MORIN, Michelle; DIMICCO, Joseph. Effect of microinjection of muscimol into the dorsomedial or paraventricular hypothalamic nucleus on air stress-induced neuroendocrine and cardiovascular changes in rats. **Brain Research**, [s.l.], v. 742, n. 1-2, p.219-224, dez. 1996.

STOTZ-POTTER, Eh; WILLIS, Lr; DIMICCO, Ja. Muscimol acts in dorsomedial but not paraventricular hypothalamic nucleus to suppress cardiovascular effects of stress. **The Journal of Neuroscience**, [s.l.], v. 16, n. 3, p.1173-1179, 1 fev. 1996.

SUZUKI, Keisuke *et al.* The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. **Endocrine Journal**, [s.l.], v. 57, n. 5, p.359-372, 2010.

THOMPSON, R.H; CANTERAS, N.S; SWANSON, L.W. Organization of projections from the dorsomedial nucleus of hypothalamus: A PHA-L study in the rat. **J Comp Neurol**, [s.l.], v. 376, p.143-173, 1996.

TOIT, E. F.; NABBEN, M.; LOCHNER, A.. A potential role for angiotensin II in obesity induced cardiac hypertrophy and ischaemic/reperfusion injury. **Basic Research in Cardiology**, [s.l.], v. 100, n. 4, p.346-354, 14 abr. 2005.

TORRES, Susan J.; NOWSON, Caryl A. Relationship between stress, eating behavior, and obesity. **Nutrition**, [s.l.], v. 23, n. 11-12, p.887-894, nov. 2007.

TREIT, Dallas; MENARD, Janet; ROYAN, Cary. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s.l.], v. 44, n. 2, p.463-469, fev. 1993.

TRYON, M *et al.* Chronic stress exposure may affect the brain's response to high calorie food cues and predispose to obesogenic eating habits. **PhysiolBehav**, [s.l.], v. 120, p, 233–242, 2013.

VARDYA, Irina *et al.* Cell Type–Specific GABA<sub>A</sub> Receptor–Mediated Tonic Inhibition in Mouse Neocortex. **Journal of Neurophysiology**, [s.l.], v. 100, n. 1, p.526-532, jul. 2008.

VARDYA, Irina *et al.* Positive modulation of  $\delta$ -subunit containing GABA<sub>A</sub> receptors in mouse neurons. **Neuropharmacology**, [s.l.], v. 63, n. 3, p.469-479, set. 2012.

VIANA, M.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F. The elevated T-maze: A new animal model of anxiety and memory. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s.l.], v. 49, n. 3, p.549-554, nov. 1994.

VRIENDT, T. de; MORENO, L.; HENAUW, S. Chronic stress and obesity in adolescents: Scientific evidence and methodological issues for epidemiological research. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, [s.l.], v. 19, n. 7, p.511-519, set. 2009.

WAFFORD, K.a. *et al.* Novel compounds selectively enhance  $\delta$  subunit containing GABA<sub>A</sub> receptors and increase tonic currents in thalamus. **Neuropharmacology**, [s.l.], v. 56, n. 1, p.182-189, jan. 2009.

WANDERLEY, Emanuela Nogueira; FERREIRA, Vanessa Alves. Obesity: a plural perspective. **Ciência e Saúde Coletiva**, [s.l.], v. 1, n. 15, p.185-194, jan. 2010.

WASSERSTROM, J.A.; VITES, A.M. Activation of contraction in cat ventricular myocytes: effects of low Cd(2+) concentration and temperature. **Am J Physiol.**, [s.l.], v. 277, p. H488–H498, 1999.

WU, Xia *et al.* Homeostatic Competition between Phasic and Tonic Inhibition. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 288, n. 35, p.25053-25065, 9 jul. 2013.

XAVIER, C H *etal.* Functional asymmetry in the descending cardiovascular pathways from dorsomedial hypothalamic nucleus. **Neuroscience**, [s.l.], v. 164, p. 1360 – 1368, dez. 2019.

ZANGROSSI, Hélio; GRAEFF, Frederico. Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s.l.], v. 46, p.397-406, out. 2014.

ZELLNER, Debra A. *et al.* Food selection changes under stress. **Physiology & Behavior**, [s.l.], v. 87, n. 4, p.789-793, abr. 2006.

ZHOU, Li *et al.* Identification of transthyretin as a novel interacting partner for the  $\delta$  subunit of GABA<sub>A</sub> receptors. **Plos One**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.1-25, 7 jan. 2019.