

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ANDRÉ CARLOS PEREIRA DE MATOS

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA-3 EM COMPORTAMENTO
RELACIONADO À ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM
DIETA RICA EM CARBOIDRATOS**

PATOS DE MINAS – MG

MARÇO DE 2022

ANDRÉ CARLOS PEREIRA DE MATOS

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA-3 EM COMPORTAMENTO
RELACIONADO À ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM
DIETA RICA EM CARBOIDRATOS**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia

**Prof.^a Dr.^a Júlia Ariana de Souza Gomes
Lenzi**

PATOS DE MINAS – MG

MARÇO DE 2022

ANDRÉ CARLOS PEREIRA DE MATOS

Efeito da suplementação com ômega-3 em comportamento relacionado à ansiedade em camundongos alimentados com dieta rica em carboidratos

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Júlia Ariana de Souza Gomes Lenzi – UFU
Presidente

Prof.^a Dr.^a Joyce Ferreira da Costa Guerra – UFU
Membro

Prof.^a Dr.^a Ana Clara Garcia Guimarães – UNIPAM
Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.

Patos de Minas, MG – 25 de Março de 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Júlia Gomes por ter sido uma professora tão boa quanto nem parecia ser possível e pelo zelo nobre em auxiliar seus alunos. Sua habilidade, dedicação e profissionalismo serão sempre lembrados, além de ser uma orientadora amiga e agradável.

Agradeço aos meus pais por prestarem tão dedicado apoio e por serem tão confiantes com as minhas escolhas.

Agradeço à minha irmã, Luana, por ser uma amiga em tantos momentos de dificuldades e minha companhia frequente de muitos momentos importantes.

Agradeço ao meu irmão mais recente, Murilo, por alegrar meus dias com sua inocência de criança que tanto disputou minha atenção enquanto escrevi este.

Agradeço aos meus familiares que se importaram comigo e fizeram questão de estimular meus estudos.

Agradeço ao meu grupo de estudos, Laura e Thais, pela paz duradoura que foi nossa harmônica colaboração, além da amizade para todos os momentos.

Agradeço aos meus amigos Pedro, Geovanna e Esther por terem sido tão presentes.

Agradeço à minha prima Maísa, foi pelo exemplo dela que achei que tudo isto valeria a pena.

Agradeço à professora Patrícia Saldanha que prestou apoio tão maternal e por ter me guiado para oportunidades decisivas.

Agradeço à professora Joyce Guerra por suas brilhantes aulas e por ser uma inspiração científica, sua presença foi luz e motivação.

Agradeço ao IFTM Patos de Minas e seus funcionários pela excelente formação que me proporcionou tudo mais que ainda viria.

Agradeço à UNIPAM pelo espaço usado durante a graduação e pelo uso do biotério durante os experimentos. Também aos técnicos do biotério, Tuenne, Ana e Marcos, por serem tão acolhedores no meu início.

Agradeço à UFU por ser uma instituição tão completa, sempre atentando à sua razão de ser pública, gratuita e de qualidade.

Agradeço ao cidadão trabalhador contribuinte que financiou meus estudos.

Agradeço ao CNPq pela bolsa de fomento dada à minha pesquisa.

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos”.

(Marie Curie)

RESUMO

O consumo de alimentos ricos em carboidratos cresce a cada ano e, conseqüentemente, a obesidade, condição associada à inflamação sistêmica de baixo grau e estresse oxidativo, assim como à maior ocorrência de transtornos de humor. Evidências apontam para o papel do ômega-3 em limitar a inflamação e o estresse oxidativo não só em tecidos periféricos, mas também no sistema nervoso central. Além disso, a suplementação com ômega-3 parece ser eficaz no tratamento de transtornos de humor e ansiedade. Assim, o objetivo do estudo foi verificar o efeito da administração de ômega-3 em comportamento tipo-ansioso em animais alimentados cronicamente com dieta rica em carboidratos (DHC). Camundongos balb/C foram divididos em quatro grupos: i) ração padrão e tratamento com ômega-3; ii) ração padrão e veículo; iii) dieta rica em carboidratos e tratamento com ômega-3; iv) dieta rica em carboidratos e veículo. Os animais foram expostos à DHC por 12 semanas e o tratamento com ômega-3 foi realizado entre a 9ª e a 12ª semana. Os animais foram submetidos ao teste de alimentação suprimida pela novidade para avaliação de comportamento tipo-ansioso e, em seguida, foram eutanasiados e o tecido adiposo dissecado e pesado. Os animais tratados com DHC aumentaram significativamente o índice de adiposidade. Entretanto, o teste de comportamento não revelou diferença entre os grupos. Os resultados do estudo corroboram com diversos trabalhos que indicam risco elevado de obesidade induzida por dieta rica em carboidratos. Conclui-se que trabalhos utilizando diferentes modelos de comportamento são necessários para avaliação do efeito do ômega-3.

Palavras-chave: ansiedade, obesidade, neuroinflamação, estresse oxidativo, sacarose.

ABSTRACT

The consumption of high-calorie foods is increasing every year, and consequently, overweight and obesity. Recent pre-clinical studies have shown that chronic consumption of a high-carbohydrate diet increases lipid deposition and induces anxiety-related behaviors in mice. Clinical and pre-clinical studies show that omega-3 supplementation appears to be effective in treating mood and anxiety disorders. Several evidences also point to the role of omega-3 in limiting inflammation and oxidative stress in peripheral tissues and the central nervous system and, therefore, the aim of the study was to verify if its neuroprotection can prevent anxiety-like behavior. Balb/C mice were divided into four groups: i) standard chow and omega-3 treatment; ii) standard chow and vehicle; iii) obesogenic chow and omega-3 treatment; iv) obesogenic chow and vehicle; all diets for 12 weeks and treatments on the last 3 weeks. The animals were subjected to the novelty-suppressed feeding test to assess anxiety-related behavior and were also euthanized and the adipose tissue dissected and weighed. Animals chronically fed a high-carbohydrate diet significantly increased their adiposity index. However, the anxiety-related test revealed no significant difference between the groups treated with the different diets used. The results of the study corroborate with several clinical and preclinical papers indicating the high risk of high carbohydrate diet-induced obesity. It is concluded that further work using different models for obesity induction is needed to evaluate the effect of omega-3.

Keywords: anxiety, obesity, neuroinflammation, oxidative stress, sucrose.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
OBJETIVOS.....	10
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	10
2.1 Epidemiologia.....	10
2.2 Efeitos de dietas ricas em carboidratos.....	11
2.3 Metabolismo da sacarose.....	12
2.4 Cadeia inflamatória da obesidade.....	12
2.6 Estresse oxidativo sistêmico.....	13
2.7 Cadeia neuroinflamatória.....	14
2.8 Circuitarias neurais da ansiedade.....	15
2.9 Antioxidantes como fatores neuroprotetores.....	17
2.10 Neuroproteção do ômega 3.....	18
2.11 Etologia da ansiedade.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Animais.....	21
3.2 Dieta experimental.....	21
3.3 Ômega-3.....	22
3.4 Delineamento Experimental.....	22
3.5 Testes Comportamentais.....	22
3.6 Consumo Alimentar e Adiposidade.....	23
3.7 Análises Estatísticas.....	23
4 RESULTADOS.....	23
4.1 Alimentação suprimida pela novidade.....	23
4.2 Índice de adiposidade.....	25
4.3 Efeitos do consumo alimentar.....	25
5 DISCUSSÃO.....	26
6 CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas, a prevalência da obesidade e sobrepeso tem crescido em todo o mundo, atingindo taxas alarmantes e tornando-se um dos principais problemas de saúde pública em vários países (NG *et al.*, 2014). Segundo a Organização Mundial de Saúde (2016), a obesidade mais que dobrou desde 1980 e, em 2014, estimava-se que 39% da população mundial adulta estava acima do peso e 13% eram clinicamente obesos. No Brasil, os números são ainda maiores, pois 52,3% da população brasileira adulta estava acima do peso e 17% era obesa em 2015 (VIGITEL, 2017). Os dados sobre o aumento da taxa de obesidade e sobrepeso tornam-se alarmantes, pois constituem fatores de risco para o desenvolvimento de doenças como o diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, alguns tipos de cânceres e síndrome metabólica (ARNOLD *et al.*, 2016; ORTEGA *et al.*, 2016), além de transtornos psiquiátricos, particularmente a depressão e a ansiedade (KONTTINEN *et al.*, 2014; PEREIRA-MIRANDA *et al.*, 2017).

Nas sociedades com hábitos alimentares ocidentais, observa-se aumento do consumo de sacarose *per capita*, popularmente conhecida como açúcar, e observa-se que o seu consumo excede as diretrizes energéticas mais do que qualquer outro nutriente (GROSS *et al.*, 2004; CORDAIN *et al.*, 2005; MORRIS *et al.*, 2015). O excesso de sacarose prejudica a sinalização e ativação de regiões cerebrais que regulam a resposta homeostática relacionada à saciedade, contribuindo para o aumento da ingestão e, conseqüentemente, ganho de peso corporal (MORAN & MCHUGH, 1981; PAGE *et al.*, 2013). Baseado em tais evidências, vários trabalhos indicam o aumento da obesidade como consequência do aumento do consumo de sacarose (OLSEN & HEITMANN, 2009) e relacionam, ainda, a maior susceptibilidade a doenças cardiovasculares (DINICOLANTONIO & LUCAN, 2014), além de diabetes tipo 2 e síndrome metabólica (MALIK *et al.*, 2010; STURT, 2011). Mais recentemente, estudos utilizando roedores mostraram também um efeito tipo ansiogênico do consumo crônico de dieta rica em carboidrato (SANTOS *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2018).

As bases neurobiológicas que explicam o efeito tipo ansiogênico do consumo crônico de dieta rica em carboidratos ainda permanece por ser elucidado. Entretanto, algumas evidências apontam para a possível participação de vias inflamatórias e de estresse oxidativo. Souza *et al.* (2007) verificaram que o consumo crônico de uma dieta enriquecida com sacarose leva ao aumento da ansiedade em roedores associado ao estresse oxidativo no córtex pré-frontal dos animais.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são pequenos metabólitos moleculares do oxigênio que participam de reações redox através de sua alta reatividade. A geração de radicais livres é resultante do metabolismo de oxigênio, sendo a mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, sua principal fonte geradora. Muitas dessas espécies são geradas em baixos níveis sob condições fisiológicas normais, em resposta a estímulos internos e externos (BARBOSA *et al.*, 2010; BERRA *et al.*, 2006).

O sistema nervoso central (SNC) é particularmente vulnerável a danos oxidativos, devido ao elevado consumo de oxigênio e, portanto, a geração de EROs, e, também, devido à capacidade antioxidante relativamente baixa desta estrutura. O aumento dos níveis de oxidação neuronal pode ter efeitos deletérios sobre a transdução de sinal, plasticidade e resiliência celular (OLMEZ & OZYURT, 2012; KHAIROVA *et al.*, 2012). Estudos clínicos e pré-clínicos demonstram a ligação entre as vias metabólicas de estresse oxidativo e a ansiedade. Em indivíduos com transtornos de ansiedade, observa-se o aumento dos níveis plasmáticos de marcadores de estresse oxidativo, tais como o malonaldeído (KULOGLU, *et al.*, 2002; VAN VELZEN *et al.*, 2017). Da mesma forma, em roedores, a deficiência de compostos antioxidantes no cérebro está relacionado ao aumento dos níveis de marcadores de estresse oxidativo, resultando em comportamento relacionado à ansiedade (DESRUMAUX *et al.*, 2005).

O ômega 3 é um ácido graxo de cadeia longa obtido por meio da dieta (SCORLETTI & BYRNE, 2018) e há uma série de dados que evidenciam o efeito anti-inflamatório e antioxidante deste composto (KNÖCHEL *et al.*, 2015). Vários estudos pré-clínicos mostram os efeitos benéficos do ômega-3 em modelos de depressão e ansiedade. Confirmando tais achados, são encontrados níveis mais baixos de ômega-3 em pacientes com depressão maior e ansiedade e há estudos que propõem a suplementação com esse ácido graxo na prevenção de transtornos de humor e ansiedade (LIU *et al.*, 2013; SU *et al.*, 2015). Em primatas não-humanos, observou-se que o ômega-3 foi capaz de reduzir a ansiedade, além de melhorar as funções cognitivas e reduzir a atividade locomotora espontânea (VINOT, *et al.*, 2011). Ainda, em camundongos submetidos ao modelo de depressão induzida por estresse crônico, a suplementação diária com ômega-3 foi capaz de reverter os comportamentos tipo-depressivos, além de evitar o aumento da peroxidação lipídica e os níveis de carbonilação de proteínas e parcialmente reverter a inibição de complexos de cadeias respiratórias mitocondriais induzidos pelo estresse (DE MELLO, *et al.*, 2014).

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi verificar se a suplementação com ômega-3 seria capaz de prevenir ocorrência de comportamento tipo-ansioso em animais alimentados cronicamente com dieta rica em carboidratos. Os objetivos específicos foram: i) verificar o efeito do ômega-3 em animais alimentados cronicamente com dieta rica em carboidratos e submetidos ao teste de alimentação suprimida pela novidade; ii) Verificar o efeito do consumo crônico de dieta rica em carboidratos sobre a deposição lipídica; iii) Avaliar o perfil de consumo alimentar e ganho de peso nos animais alimentados cronicamente com dieta rica em carboidratos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia

A obesidade é considerada um problema de saúde mundial. Segundo a World Obesity Federation, um quinto da população mundial será obesa até o ano de 2025, e um terço viverá com obesidade grave. É uma doença metabólica, caracterizada pelo aumento de tecido adiposo, além da presença de alterações metabólicas, resistência insulínica e disfunção autonômica (BESKE *et al.*, 2002; FANTUZZI, 2005). Existem causas diversificadas para a ocorrência de obesidade e diabetes como fatores genéticos, ambientais, atividade física e alimentação (JOHNSON *et al.*, 2017; STANHOPE, 2015). Apesar de tantos fatores causadores destes distúrbios, a alimentação é considerada sua principal causa, sobretudo, quando se trata do consumo de alimentos e bebidas com adição de sacarose (HU E MALIK, 2010; MALIK *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2014). A sacarose é um alimento que ativa o sistema de recompensa no Sistema Nervoso Central, o que pode estar relacionado a sua alta adesão popular e amplo uso como adição em alimentos e bebidas (BRAY, 2016).

Os anos finais da década de 1960 foram marcados por uma introdução massiva do uso de açúcar em alimentos e bebidas como estratégia de venda, melhorando a palatabilidade e disfarçando possíveis amargores (MOSS, 2013). Atualmente o centro de controle e prevenção de doenças (CDC) (2021) aponta que em 2017 e 2018 tanto crianças de 2 a 19 anos quanto adultos com mais de 20 anos consumiam em média 68 gramas de açúcar diariamente. Contudo,

a *dietary guideline for americans* (2020) recomenda um consumo que não exceda 50 gramas de açúcar adicionado por dia. Sendo assim, o consumo médio diário excede o consumo máximo recomendado. Concomitantemente, o sobrepeso e obesidade tem aumentado a cada ano, sendo que em 2015 cerca de 600 milhões de adultos e 107 milhões crianças eram obesos (PICHE *et al.*, 2020). Na década de 1980, de acordo com autores colaboradores do *Global Burden Disease* (2017), estes índices não chegavam nem à metade dos atuais. Além disso, dados epidemiológicos com abrangência mundial do *Institute for Health Metrics and Evaluation* (2015) demonstram que as taxas percentuais de obesidade passam por aumentos anuais consecutivos desde 1980.

2.2 Efeitos de dietas ricas em carboidratos

Estudos recentes indicaram que a dieta é um fator muito significativo para o desenvolvimento de obesidade. Camundongos de grupos de risco genético puderam evitar a doença com dieta adequada, enquanto outros grupos sem riscos genéticos desenvolveram a doença através de uma dieta obesogênica (NG *et al.*, 2010).

Além do risco de obesidade, o consumo exagerado de sacarose se relaciona a comportamentos de compulsão alimentar e estão associados com perda de controle sob a ingestão (*American psychiatric association*, 1990). De fato, alterações no controle fisiológico da saciedade são observadas a partir da ativação do sistema de recompensa por sacarose enquanto alimento altamente palatável (AVENA, 2007). Dados em roedores mostram que o consumo de sacarose, depois de um período de privação alimentar, aumenta os níveis de dopamina no núcleo *accumbens*, que estão associados a um atraso na resposta colinérgica de saciedade, levando a um consumo maior de alimento (BELLO *et al.*, 2003; RADA *et al.*, 2005).

Dietas ricas em carboidratos refinados são capazes de provocar picos de insulina mais acentuados que os picos de insulina provocados por dietas balanceadas. Normalmente, os picos de glicose pós-prandiais controlam o ciclo circadiano e a mediação de hormônios (SUH & KIM, 2015). O consumo elevado de carboidratos refinados é considerado atípico para a espécie humana, pois naturalmente os carboidratos são obtidos na natureza complexados e acompanhados de fibras que retardam sua absorção, evitando um pico elevado de insulina (TEMPLE, 2018). Isso provoca uma hipernutrição glicídica que está associada com ativação de vias lipogênicas e aumento de mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- α e IL-6, em resposta à exacerbação endocrinológica da insulina (DANDONA, 2004).

2.3 Metabolismo da sacarose

As altas concentrações plasmáticas de glicose e, conseqüentemente, de insulina desencadeiam uma resposta fisiológica de síntese de lipídios. No fígado, a insulina sinaliza vias bioquímicas que usam a glicose como esqueleto de carbono para síntese de ácidos graxos. Com a síntese de ácidos graxos em alta, devido a esta ingestão de carboidratos refinados, ocorre o aumento da lipidemia e os tecidos adiposos alojam tais ácidos graxos atuando como depósitos naturais (LEHNINGER *et al.*, 2014).

Os picos de insulina estão relacionados com aumento do mediador TNF- α que é diretamente capaz de induzir a resistência insulínica através da inibição da auto-fosforilação da tirosina em receptores da insulina. Além disso, esse mediador inflamatório também é capaz de inibir a síntese do receptor de insulina (DANDONA, 2004). A resistência à insulina dificulta que os receptores do tipo GLUT façam o transporte de glicose para a célula, prejudicando diretamente o processo de redução da glicemia. A hiperglicemia persistente, denominada como intolerância à glicose, faz com que receptores GLUT das células β de Langerhans estimulem uma maior produção de insulina. O aumento de insulina não compensa a resistência insulínica e ocorre uma exacerbação da via lipogênica causada pela regulação enzimática alostérica desse hormônio (LEHNINGER *et al.*, 2014).

Esta acentuação da via lipogênica deve-se ao fato de que a insulina é um hormônio anabólico, ou seja, capaz de induzir a síntese de macromoléculas, atuando como sinalização principal do *status* metabólico do organismo. Desta forma, a insulina atua em diversos pontos chave da regulação metabólica dos lipídeos, tais como a ativação de fatores de transcrição (SREBP) para genes relacionados a lipogênese e a redução da lipólise nos adipócitos pela inibição da lipase hormônio-sensível (LEHNINGER *et al.*, 2014).

2.4 Cadeia inflamatória da obesidade

A obesidade, caracterizada por produção elevada de ácidos graxos e seu acúmulo no tecido adiposo e sangue, está relacionada a processos inflamatórios pela elevada secreção de adipocinas e mediadores imunológicos frequentemente pró-inflamatórios (STOLARCZYK, 2017).

Um estudo com camundongos alimentados cronicamente com dieta com alto teor de carboidratos refinados demonstrou que diversas alterações inflamatórias oriundas do tecido adiposo puderam ser identificadas, como aumento da expressão da acetil-CoA carboxilase,

lipoproteína lipase, receptor ativado por proliferadores de peroxissoma, SREBP-1, chREBP-1. Também houve alterações dos níveis séricos de adiponectinas, leptinas e resistinas. Aumentos foram percebidos, ainda, nos níveis de macrófagos (M1 e M2), linfócitos (CD8+ e CD4+Foxp3+), neutrófilo (GR1+), além de aumentos nos níveis de citocinas TNF- α , IL-6, IL-10, TGF- β 1, CCL2 e CXCL1 (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

2.6 Estresse oxidativo sistêmico na obesidade

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas altamente reativas produzidas espontaneamente pelo nosso metabolismo no citoplasma de células, por meio da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria. As EROS ajudam em funções biológicas como: sinalização celular e quebra de compostos tóxicos (HASSAN *et al.*, 2014). Entretanto, o desequilíbrio entre a produção e remoção desses radicais livres é fundamental para um estado de estresse oxidativo, visto que, a redução de fatores antioxidantes que possuem um papel protetor para manutenção da integridade celular resulta na elevação de radicais livres (BOUAYED *et al.*, 2009). O cérebro pode ser profundamente afetado pelo estresse oxidativo e possui uma maior vulnerabilidade a esta condição, pois é a região que mais demanda oxigênio, causando assim danos neuronais que resultam em um agravamento de condições neurológicas pré-existentes ou no desenvolvimento (ZALACHORAS *et al.*, 2020).

Os radicais livres reagem principalmente com células que apresentam maiores quantidades de ácidos poli-insaturados, sendo o cérebro uma região com elevadas concentrações desses ácidos, o que favorece a peroxidação lipídica nesta região (BOUAYED *et al.*, 2009). Além da peroxidação lipídica, os radicais livres são responsáveis por causar danos a ácidos nucleicos e proteínas, resultando em alterações de estruturas celulares, o que pode ocasionar morte celular, ativação anormal de células da micróglia e produção de citocinas inflamatórias, gerando quadros de estresse oxidativo (FEDOCE *et al.*, 2018). Este pode afetar os neurônios de formas diferentes, pois, dependendo da área cerebral, existe maior vulnerabilidade, como o córtex pré-frontal, a amígdala e o hipocampo (SALIM *et al.*, 2017).

A obesidade é caracterizada por excesso de tecido adiposo, tecido responsável por secretar mediadores que estimulam a produção de EROs (MARSEGLIA, *et al.*, 2015). Esse tecido, via mediadores pro-inflamatórios, ativa o sistema imune inato, cujas citocinas pró-inflamatórias produzidas induzem a produção de espécies reativas de oxigênio através da ligação a receptores específicos e sinalização via NF- κ B (MARSEGLIA, *et al.*, 2015). Além disso, a obesidade é caracterizada por depleção no nível antioxidantes, sendo os indivíduos

obesos mais vulneráveis ao estresse oxidativo. Ainda, esses indivíduos apresentam uma dieta com um menor consumo de alimentos antioxidantes, tais como frutas e grãos (VINCENT *et al.*, 2017). Interessantemente, os efeitos de estresse oxidativo induzidos pela inflamação relacionada a obesidade puderam ser significativamente reduzidos com restrições alimentares de carboidratos refinados durante um período de quatro semanas. Ademais, um período de jejum de 48 horas é capaz de diminuir em até 50% a geração de espécies reativas de oxigênio por leucócitos ativados por vias inflamatórias (DANDONA, 2004).

Os picos elevados de concentração sanguínea de glicose e de insulina provocados pelo consumo de carboidratos refinados desencadeiam processos inflamatórios que estão associados com estresse oxidativo a nível celular. Confirmando isto, estudos em camundongos mostram que o consumo de glicose é capaz de provocar um processo de estresse oxidativo agudo observado até três horas após o consumo deste nutriente (ESPOSITO, 2002).

A hiperglicemia é capaz de aumentar a expressão da enzima NADPH oxidase que gera radicais superóxidos a partir de oxigênio molecular. Estes superóxidos são capazes de ativar o fator de transcrição redox sensível NF- κ B que ativa diversos genes pró-inflamatórios (DANDONA, 2004). Grandes quantidades de carboidratos refinados disponibilizam mais substrato para a respiração mitocondrial podendo gerar uma maior produção de superóxidos que são bastante reativos (TAM *et al.*, 2018). Após o consumo de uma refeição, certos níveis de estresse oxidativo são gerados devido ao metabolismo das mitocôndrias. Este pode ser sobrecarregado, dependendo da quantidade de calorias ingeridas, da composição de macronutrientes do alimento e do índice glicêmico (MUÑOZ & COSTA, 2013).

2.7 Cadeia neuroinflamatória

O sistema nervoso central tem, naturalmente, respostas adaptativas benéficas para mediadores inflamatórios, porém de ação transitória. Em desvios patológicos, alguns estressores crônicos podem desequilibrar esta reação natural e gerar respostas neuroinflamatórias aberrantes (DISABATO *et al.*, 2016).

A inflamação desencadeada pela obesidade é capaz de induzir a neuroinflamação através de mediadores permeáveis à barreira hematoencefálica. Os mediadores inflamatórios, produzidos periféricamente, possuem capacidade de permear a barreira do plexo coroide com maior facilidade que em outras barreiras encefálicas (GUILLEMOT-LEGRIS & MUCCIOLI, 2017). Estes mediadores cronicamente presentes no encéfalo levam ativação de células imunes residentes, bem como a indução do estresse oxidativo no cérebro que tem altas taxas

respiratórias e de liberação de radicais (DISABATO *et al.*, 2016). A inflamação crônica leva à ativação da micróglia e, portanto, ao processo neuroinflamatório, sendo estas células ativadas por diversas citocinas e marcadores inflamatórios, como o óxido nítrico, IL-1 β e espécies reativas de oxigênio (SHABAB *et al.*, 2017).

A ativação microglial leva a sua expansão celular, deslocamento, fagocitose, proliferação, apresentação de antígenos, ativação de genes e geração de espécies oxidantes. Dentre os diversos produtos pró-inflamatórios produzidos a partir da ativação microglial, destacam-se citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α), enzimas pró-inflamatórias, como COX-1, COX-2, iNOS, além do aumento de vias oxidativas e de produção de produtos neurotóxicos (SHABAB *et al.*, 2017). Esta miríade inflamatória e oxidativa desencadeada tem capacidade de gerar danos, disfunções ou morte neuronal. Tais danos são principalmente provocados pela sinalização pró-apoptótica de tais mediadores, bem como a peroxidação lipídica, que danifica estrutura de fibras neuronais e de células da glia, produzindo o malonaldeído como marcador. Além disso, observa-se redução da presença de marcadores com ação antioxidante, como a glutatona reduzida (SHABAB *et al.*, 2017).

2.8 Circuitarias neurais da ansiedade

O plexo coróide ocupa no encéfalo uma posição central que facilita as trocas do líquido cefalorraquidiano. Isso o torna proximamente alojado de áreas como o hipocampo e os núcleos límbicos do estriado (GUILLEMOT-LEGRIS & MUCCIOLI, 2017). Tais regiões cerebrais estão relacionadas com transtornos de ansiedade e compulsão. O sistema límbico evolutivamente desempenha ímpeto de autopreservação e sobrevivência, sendo assim, provoca respostas de sobressalto e medo que são manifestações de comportamentos tipo-ansiosos (ROXO *et al.*, 2011).

Camundongos apresentam alta homologia com o sistema límbico humano quando comparado com uma menor homologia das regiões neocorticais. Isto aumenta a validade de construto em estudos do comportamento tipo-ansioso em camundongos em comparação com humanos (BRUCE & NEARY, 1995). O cerebelo, córtex pré-frontal, estriado e hipocampo são sensíveis à neuroinflamação induzida por obesidade e estão relacionados com mudanças em comportamentos como ansiedade, anedonia e depressão (GUILLEMOT-LEGRIS & MUCCIOLI, 2017).

A obesidade pode levar ao desenvolvimento do sentimento de decepção com a própria aparência e a perda de confiança em suas relações pessoais, o que pode desencadear

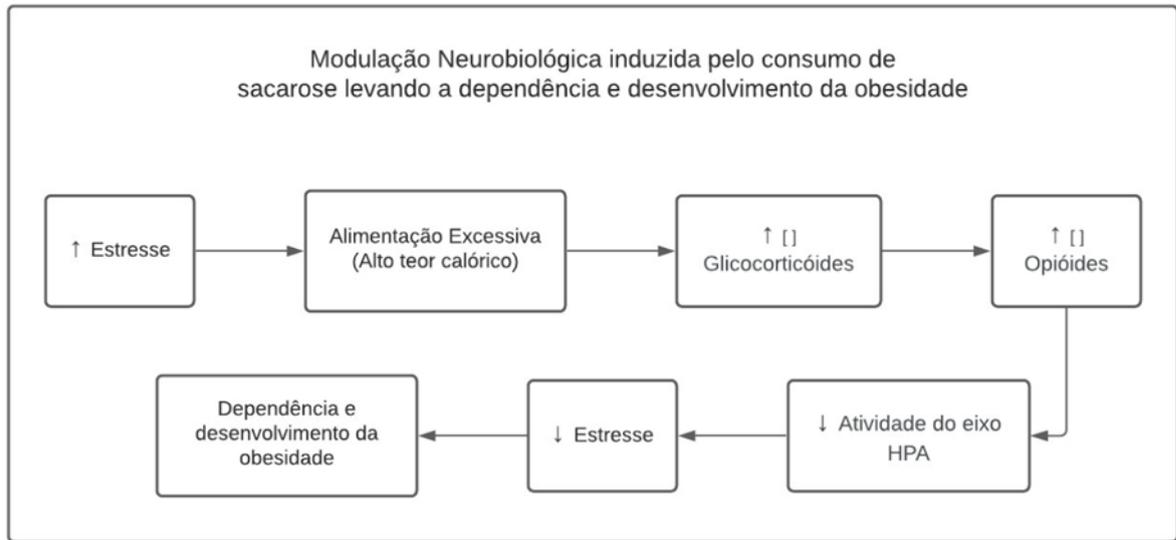
comportamento ansioso. Estudos sugerem que os índices de obesidade em pessoas com transtornos psiquiátricos são maiores, comparados com aqueles que não possuem esse histórico, sendo que alguns relatam chances aumentadas de apresentarem ansiedade. (BRUMPTON, *et al.*, 2012). Dessa forma, um estudo de Fusco *et al* (2020), objetivou analisar a relação da ansiedade em adultos com sobrepeso ou obesos e descobriu que a prevalência de níveis minimamente moderados de ansiedade em adultos com sobrepeso ou obesidade foi de 96%. Outro estudo, publicado por Calderón *et al* (2009), indica que à medida que o Índice de Massa Corporal (IMC) aumenta, os sintomas da ansiedade também aumentam (CALDERÓN *et al.*, 2009). Com isso, é proposto que a relação entre a ansiedade e a obesidade seja decorrente dos processos inflamatórios e da desordem do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), que faz com que ocorra um aumento na secreção de cortisol, provocando oscilações de humor (TORRES & NOWSON, 2007).

É estabelecido que condições com alto nível de estresse promovem um aumento na ingestão de alimentos altamente calóricos e levam à obesidade. Esse processo é tratado como uma via de recompensa entre a alteração emocional e o alimento altamente saboroso. Dessa forma, os circuitos neuroanatômicos complexos estão envolvidos na modulação do eixo HPA associada à alimentação, pois as áreas neuronais centrais que regulam a ingestão de alimentos e o gasto de energia, principalmente no hipotálamo, são fortemente influenciadas por vários componentes do sistema de estresse (PECORARO *et al.*, 2004; SAURO *et al.*, 2008). Assim, a ativação do eixo HPA sob condições de estresse crônico levam a hipersecreção de glicocorticóides nos centros de apetite, que são coletivamente orexigênicos e aliviam o estresse (KYROU & TSIGOS, 2007). Há evidências que durante a hipersecreção de glicocorticóides também podem ocorrer alterações neuroplásticas, como a diminuição dos níveis do Fator Neurotrófico Derivado do Cerebro (BDNF) e morte de neurônios piramidais na formação hipocampal (CAMARGO, 2016).

Um outro mecanismo que envolve a relação entre o cortisol e a ingestão de alimentos envolve os efeitos dos glicocorticoides sobre os opioides e endocanabinóides. A ativação do eixo HPA provoca a liberação de opioides, e há evidências que sugerem que a liberação de opioides faz parte do poderoso mecanismo de defesa de um organismo contra os efeitos prejudiciais do estresse. Os opioides diminuem a atividade do eixo HPA em diferentes níveis, a fim de atenuar e encerrar a resposta ao estresse, proporcionando um mecanismo de controle de feedback negativo. Dessa forma, a ingestão de alimentos ricos em gorduras e açúcares aumentam a liberação de opioides que agem no eixo HPA como uma forma de resposta e alívio do estresse. No entanto, se o estresse se tornar crônico e a ingestão de alimentos se tornar uma

forma de alívio do estresse, o consumo de alimentos altamente saborosos pode causar dependência e facilitar a condição de obesidade (figura 1), por meio das adaptações neurobiológicas mencionadas acima (ADAM *et al.*, 2008).

Figura 1 - Modulação Neurobiológica induzida pelo consumo de sacarose.



Fonte: Do autor

2.9 Antioxidantes como fatores neuroprotetores

Antioxidantes endógenos e exógenos ajudam na manutenção do equilíbrio da quantidade presente de espécies reativas de oxigênio no cérebro, pois tais antioxidantes possuem um importante papel na neutralização do equilíbrio de Equilíbrio de Oxirredução (OLMEZ & OZYURT, 2012; VINCENT *et al.*, 2007). Em um processo de estresse oxidativo, observa-se redução da quantidade de antioxidantes, danos a genes de fatores de transcrição de antioxidantes e ativação de genes envolvidos na indução de processos inflamatórios (ZALACHORAS *et al.*, 2020). Quando uma célula enfrenta estresse oxidativo, esta pode aumentar a quantidade de antioxidantes produzidos por meio da ativação do fator de transcrição fator nuclear 2 (NFR2). Entretanto, em episódios frequentes de neuroinflamação e de estresse oxidativo, observa-se saturação das defesas antioxidantes (SALIM, 2013).

Alguns exemplos de antioxidantes que atuam na proteção de células neuronais são: as vitaminas A e E, melatonina e Glutaciona. A glutaciona está presente em maior concentração nos tecidos nervosos, logo, possui uma grande importância em estudos relacionados ao estresse oxidativo (HASSAN *et al.*, 2014). Portanto, com base na teoria de que o estresse oxidativo se

dá em virtude de um desequilíbrio no balanço da geração de espécies reativas e antioxidantes, é importante a realização de trabalhos que avaliem a administração de diferentes substâncias antioxidantes para observação de seus efeitos em relação ao estresse oxidativo e possíveis aplicações para tratamentos de patologias. A administração do ácido graxo poli-insaturado (PUFA) ômega 3 surgem, então, como um importante exemplo de agente antioxidante (PISOSCHI & POP, 2015).

De fato, este composto tem sido explorado em pesquisas para testar seu potencial terapêutico frente a patologias sozinho ou de forma combinada, pois apresenta propriedades anti-inflamatórias que podem reduzir a produção de citocinas, fatores inflamatórios e até mesmo espécies reativas de oxigênio (SAW *et al.*, 2013). Alguns exemplos de propriedades dos ácidos graxos poli-insaturados que combatem o estresse oxidativo são: a capacidade de aumento da neuroplasticidade, redução da inflamação e a modulação de sinalização neuronal, porém, ainda há necessidade de pesquisas para comprovação de tal capacidade (GIORDANO *et al.*, 2014; STAVRINO *et al.*, 2020).

2.10 Neuroproteção do ômega 3

O estudo dos pesquisadores Larrieu e Layé (2018) sugeriu que o consumo de peixes está inversamente relacionado ao desenvolvimento de transtornos emocionais. Para tais conclusões, os autores basearam-se no estudo de Hibben (1998), onde foi proposto que países com alto consumo de peixes sofrem relativamente pouco de transtornos emocionais, enquanto países que apresentam menor consumo de peixes possuem alta prevalência para desenvolver esses transtornos. Assim, a relação entre o alto consumo de peixes e o baixo índice de desenvolvimento de transtornos emocionais pode ser justificada pelo alto percentual de ácidos graxos ômega 3 que peixes de águas frias apresentam (LARRIEU & LAYÉ, 2018). A partir disso, por exemplo, há estudos pré-clínicos de modelos animais que demonstram os efeitos benéficos do ômega 3 na prevenção da ansiedade (SU *et al.*, 2015).

Nesse sentido, o estudo de Carlezon (2005), por exemplo, mostrou que os ácidos graxos ômega-3 são relacionados a um efeito preventivo de comportamentos semelhantes à depressão e ansiedade em modelo animal (SU *et al.*, 2015). Esse efeito preventivo do ômega-3 está associado ao seu poder anti-inflamatório e é proposto que a suplementação de ômega-3 leva à diminuição da produção de citocinas inflamatórias (POLOKOWSKI *et al.*, 2020). Visto que a ansiedade é marcada pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), e por níveis baixos de ômega-3 no

sangue, a suplementação de ômega-3 auxiliaria na redução dos sintomas de ansiedade ao diminuir os processos inflamatórios (BOZZATELLO *et al.*, 2020; POLOKOWSKI *et al.*, 2020).

Outro provável mecanismo da ação do ômega-3 na prevenção da ansiedade é através do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), pois, em níveis baixos, o BDNF não estimula o crescimento sináptico de neurônios serotoninérgicos no cérebro, e baixos níveis de serotonina estão associados com a ansiedade. Dessa forma, é hipotetizado que o BDNF pode reduzir a ansiedade ao estimular o crescimento sináptico de neurônios serotoninérgicos no cérebro. Assim, a suplementação com ômega-3 pode apresentar efeitos ansiolíticos, uma vez que está associada a níveis aumentados de BDNF no cérebro (BOZZATELLO *et al.*, 2020).

O sistema nervoso central humano é composto por uma alta concentração de lipídios, sendo os principais os ácidos graxos poliinsaturados, como o ômega 3. Logo, o ômega 3 com suas propriedades antiinflamatórias e antioxidativas é capaz de exercer efeitos neuroprotetores contra as fisiopatologias inflamatórias e oxidativas cerebrais que estejam ligadas à ansiogênese (LARRIEU & LAYE, 2018).

Os ácidos graxos poliinsaturados do tipo ômega 3 exercem efeitos neuroprotetores, principalmente na ação sobre a composição lipídica da membrana de neurônios (DANGELO *et al.*, 2020). O ômega 3 se aloja junto aos fosfolipídios da membrana alterando a fluidez, estrutura e função e logo provoca mudança na atividade de receptores levando a uma redução de sinalização pro-inflamatória (CALDER, 2017). Adicionalmente, o ômega 3 melhora o funcionamento de vias com mediadores lipídicos envolvidos na resolução da neuroinflamação, como a maresina, neuroprotectina e resolvina (JANAKIRAM *et al.*, 2011).

Para compreensão da relevância da razão entre ácidos graxos poliinsaturados do tipo ômega 3 ou ômega 6, ratos foram submetidos à privação de alimentos fontes do ômega 3 causando um desbalanço das proporções cerebrais de ômega 3. Conseqüentemente, foi verificado que os níveis alterados interferiram em regiões sensíveis do sistema nervoso central relacionadas ao comportamento, levando à depressão. Além disso, animais submetidos a privação do ômega 3 por uma geração completa apresentaram distúrbios no comportamento social e aumento de sintomas tipo-ansiosos e tipo-depressivos (LARRIEU & LAYE, 2018).

Adicionalmente, o uso dietas desprovidas de ômega 3 e ricas em frutose está associado a alterações no sistema nervoso central. Tal dieta provocou resistência dos receptores insulínicos do hipocampo, oferecendo risco de transtornos de comportamento. A dieta provocou um desequilíbrio na razão de ácidos graxos ômega 6 e ômega 3 e aumentou os níveis do marcador de peroxidação lipídica 4-hidroxinonal. Além disso, a dieta reduziu os níveis de

proteína de ligação ao elemento de resposta monofosfato cíclico de adenosina (CREB), sinapsina I e sinaptofisina, todos mediadores importantes para neuroplasticidade (AGRAWAL & GOMEZ-PINILLA, 2012).

O ômega 3 já foi definido como capaz de atuar a nível celular e molecular pelos quais gera efeitos neuroprotetores em funções cerebrais. O ômega 3 e seus metabólitos são capazes de atuar na sinalização de mediadores da neuroinflamação (SERHAN *et al.*, 2011). Outra via importante para compreender a atuação do ômega 3 como um neuroprotetor é a via endocanabióide, que é central para a relação entre ácidos graxos dietéticos, comportamento e neuroplasticidade. Dietas com razão ômega 3/ ômega 6 equilibradas afetam o sistema canabióide positivamente para balancear a liberação pré-sináptica de glutamato e ácido gama aminobutírico. O hipocampo e o núcleo accumbens foram revelados como responsivos para a neuroplasticidade induzida por canabióides, possibilitando controle da ansiedade (LARRIEU & LAYE, 2018).

Além disso, já foi demonstrada a capacidade da suplementação com ômega 3 de induzir neuroproteção do comportamento em camundongos através da atuação em regiões do córtex e hipocampo reparando a micróglia a um fenótipo não inflamatório, o que diminui as concentrações de mediadores inflamatórios como o TNF- α , IL-6 e IL-1 β (LABROUSSE *et al.*, 2012).

Portanto, o ômega 3 desempenha um papel multifatorial para prevenção da inflamação. Sua presença no cérebro altera a função de receptores e reduz vias inflamatórias, e, uma vez que estas vias inflamatórias são reguladas, vias que resultam em produção de radicais livres são inibidas. Com a redução de radicais livres, a peroxidação lipídica, que acomete especialmente o cérebro, é reduzida, permitindo que os ácidos graxos poli-insaturados do cérebro estejam menos vulneráveis. Sabe-se que a miríade de eventos inflamatórios e oxidativos decorrentes da obesidade causa danos neuronais em áreas encefálicas correlacionadas com ansiedade. Logo, o ômega 3 desponta como um possível agente preventivo do surgimento de ansiedade em indivíduos vulneráveis em decorrência da obesidade, pois, sua ação é direcionada aos principais focos etiológicos desta patologia, como estresse oxidativo e neuroinflamação.

2.11 Etologia da ansiedade

Os seres humanos são os únicos animais capazes de demonstrar verbalmente o que sabem, sentem e percebem sobre o mundo e sobre si mesmos. Devido a isso, para elucidar os comportamentos emocionais e cognitivos de outros animais, os cientistas podem apenas

observar seu comportamento (CARTER & SHIEH, 2015). O teste de Teste de Alimentação Suprimida por Novidade é utilizado para avaliação de comportamento relacionado à ansiedade. Neste teste, avalia-se o comportamento do animal através latência para ingerir alimento após um período de privação alimentar. Dessa forma, a hesitação em consumir o alimento é dada como uma medida de ansiedade. Nesse teste, o animal é colocado em um ambiente novo e é avaliado o conflito entre o ambiente ansiogênico e o comportamento de busca pelo alimento induzido pela privação alimentar (SERRA *et al.*, 2017). Nesse sentido, os camundongos são privados de se alimentar por um determinado tempo e, então, são testados quanto à latência para consumir o alimento (fator motivacional) em um ambiente novo (fator inibitório). Esse ambiente é responsável por induzir ansiedade, levando a uma maior latência para o consumo deste alimento, fazendo com que o animal permaneça nas laterais e evite o centro (RAMAKER & DULAWA, 2017; SAMUELS & HEN, 2011). A latência para comer é definida como o tempo gasto para que o animal entre no centro da caixa e consuma a comida. Dessa forma, os animais que apresentarem uma latência significativamente maior para comer são identificados como mais ansiosos (SAMUELS & HEN, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Balb/C com idade entre 7 e 8 semanas provenientes da Rede de Biotérios UFU (REBIR-UFU). Os animais foram mantidos em ambiente controlado, ração e água *ad libitum* e com ciclo claro-escuro de 12 horas. A metodologia foi aprovada pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, sob o protocolo número 019/18.

3.2 Dieta experimental

A dieta experimental consiste em uma dieta rica em carboidrato (HC), preparada na seguinte proporção: 40% de leite condensado, 40% de dieta comercial para roedores (NUVILAB), 12% de água e 8% de açúcar refinado. Para a preparação da dieta HC, foram misturados o pó da ração comercial, água, açúcar e leite condensando (Nestle®), até se obter

uma massa homogênea. Em seguida, os pellets foram confeccionados manualmente e congelados em -20° C até a utilização. A dieta HC foi utilizada em até um mês após o seu preparo. Os animais foram tratados 12 semanas com a dieta HC (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

3.3 Ômega-3

O tratamento de suplementação com ômega-3 ocorreu entre a 9ª e a 12ª semana após o início do tratamento com a dieta HC. A dose de ômega 3 foi de 500 mg (DE MELLO *et al.*, 2014), administrada no volume de 1ml/Kg via oral por gavagem uma vez ao dia. Os animais dos grupos não suplementados receberam um volume equivalente de óleo vegetal de soja Concórdia® como tratamento controle.

3.4 Delineamento Experimental

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais. O grupo 1 (suplementado + dieta controle) foi alimentado com dieta padrão por 12 semanas e recebeu ômega 3 por via oral. O grupo 2 (suplementado + dieta HC) foi alimentado com dieta rica em carboidratos por 12 semanas e recebeu ômega 3 por via oral. O grupo 3 (não suplementado + dieta controle) foi alimentado com dieta padrão por 12 semanas e recebeu veículo por via oral. O grupo 4 (não suplementado + dieta HC) foi alimentado com dieta rica em carboidratos por 12 semanas e recebeu veículo por via oral.

3.5 Testes Comportamentais

Para avaliação de comportamento relacionado à ansiedade, os animais foram submetidos ao teste de Alimentação Suprimida pela Novidade (ASN). Para esse teste, os animais foram privados de alimentação por 24 horas e, então, foram colocados individualmente em uma sala não iluminada e introduzidos em um novo ambiente (caixa de policarbonato - 30 x 40 x 12 cm - com 5 cm de maravalha). Sob a maravalha, foi colocado uma pequena superfície de vidro (placa de petri) localizada centralmente contendo um único pellet de ração com um foco de luz direcionado. A latência para o primeiro episódio de comer foi avaliada com o auxílio de um cronômetro. Depois deste teste os animais se alimentaram livremente por 5 minutos para que se verifique a quantidade de alimento ingerida e sejam detectadas ou não heterogeneidades no apetite dos animais para o teste (YANG *et al.*, 2015).

3.6 Consumo Alimentar e Adiposidade

A ração consumida foi registrada duas vezes por semana para análise do consumo alimentar médio diário.

A adiposidade foi estimada pela relação entre o peso do tecido adiposo visceral, composto pelos tecidos adiposos epididimal (TAE), mesentérico (TAM) e retroperitoneal (TAR), e o peso do animal imediatamente antes do sacrifício, fornecendo o índice de adiposidade (IA), segundo fórmula a seguir:

$$Ia (\%) = \frac{TAE + TAM + TAR}{Peso do animal} * 100$$

3.7 Análises Estatísticas

A análise dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism, versão 9.0.1 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média, passaram por teste Saphiro-Wilk de aderência à distribuição normal. Para as comparações entre os grupos controle e dieta HC foi usado o teste t não pareado de Student (com correção de Welch para os dados que não tiveram variâncias homogêneas) ou o teste de Mann-Whitney para os dados que não apresentaram distribuição normal. As análises multivariadas foram feitas através de ANOVA de duas vias com pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

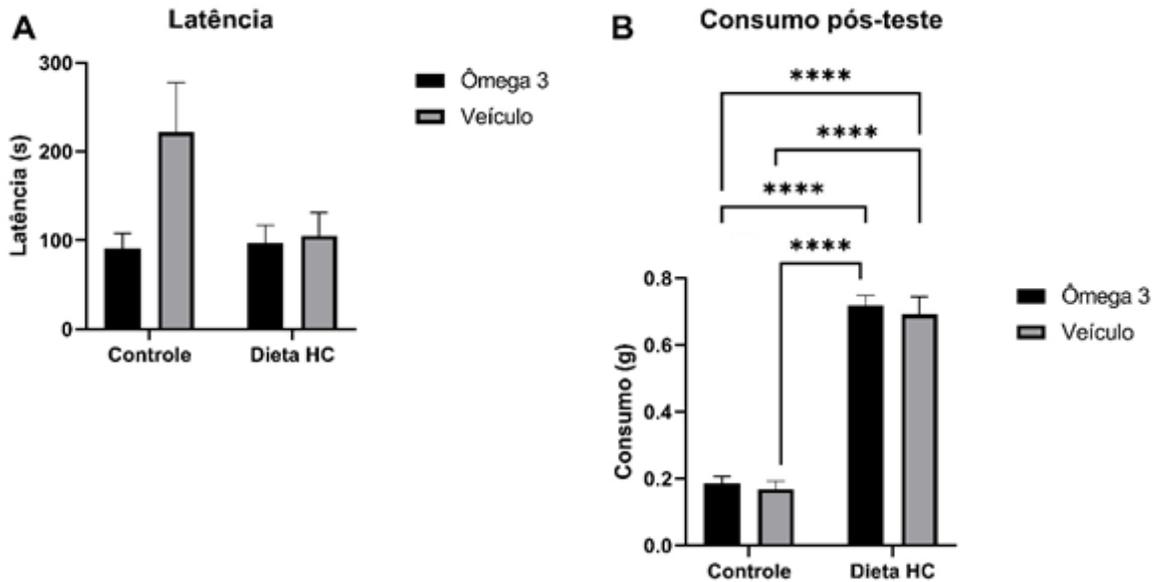
4.1 Alimentação suprimida pela novidade

Para o teste de alimentação suprimida pela novidade os dados foram analisados (ANOVA duas vias, figura 2A, Dieta: $F(1,32) = 2,34$, $p = 0,14$; Tratamento: $F(1,32) = 3,71$, $p = 0,06$; Interação: $F(1,32) = 2,88$, $p = 0,10$) e foi revelada nenhuma interação e efeitos das dietas

(controle e HC) e tratamentos (veículo e ômega 3) sobre a latência para se alimentar. Animais tratados com ômega 3 também não mostraram diferenças dentre os animais tratados com dieta HC ($p > 0,05$ na comparação múltipla de Bonferroni, figura 2A).

Os dados de consumo de ração pós-teste foram analisados (ANOVA duas vias, figura 2B, Dieta: $F(1,32) = 298,20$, $p < 0,0001$ 0,14; Tratamento: $F(1,32) = 0,53$, $p = 0,47$; Interação: $F(1,32) = 0,02$, $p = 0,90$) e foi revelada diferença entre grupos, tendo ocorrido um aumento significativo do consumo alimentar de ração no pós-teste da alimentação suprimida por novidade. Grupo dieta HC mostrou diferenças entre os animais tratados com dieta controle ($p > 0,05$ na comparação múltipla de Bonferroni, figura 2B).

Figura 2 - Dieta HC não modifica a latência no teste ASN, mas modifica o consumo no pós-teste.

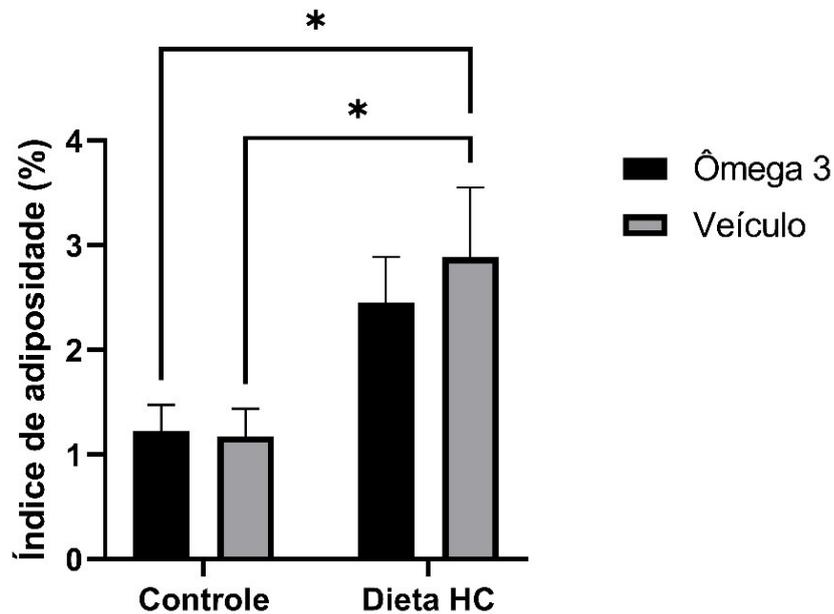


A: Latência (s) para o primeiro episódio de comer em ambiente estranho depois de um período de privação de alimento. B: Consumo de ração (g) no pós-teste da ASN. Colunas escuras: Tratamento com ômega 3. Colunas claras: Tratamento veículo. Ambas as comparações foram feitas com teste ANOVA duas vias seguido por teste multivariado de Bonferroni e os dados apresentados como média \pm E.P.M (dieta controle + ômega 3 $n = 11$, dieta controle + veículo $n = 9$, dieta HC + ômega 3 $n = 10$, dieta HC + veículo $n = 6$). **** $P < 0,0001$.

4.2 Índice de adiposidade

O índice de adiposidade foi analisado (ANOVA duas vias, figura 3, Dieta: $F(1,32) = 14,79$, $p = 0,0005$; Tratamento: $F(1,32) = 0,25$, $p = 0,62$; Interação: $F(1,32) = 0,39$, $p = 0,54$) e foi apontada diferença significativa entre dieta controle e dieta HC indicando que os animais que consumiram a dieta rica em carboidratos refinados tenderam a acumular mais tecido adiposo. Não houve diferença causada pelo tratamento com ômega 3 no grupo alimentado com dieta HC ($p > 0,05$ na comparação múltipla de Bonferroni, figura 3).

Figura 3 - Dieta HC modifica o índice de adiposidade (%) entre dietas.



Colunas escuras: Tratamento com ômega 3. Colunas claras: Tratamento veículo. Todas as comparações foram feitas com teste ANOVA duas vias seguido por teste multivariado de Bonferroni e os dados apresentados como média \pm E.P.M (dieta controle + ômega 3 $n = 11$, dieta controle + veículo $n = 9$, dieta HC + ômega 3 $n = 10$, dieta HC + veículo $n = 6$). * $P < 0,05$.

4.3 Efeitos do consumo alimentar

A média de alimento ingerido diariamente foi analisada (teste t não pareado com correção de Welch, tabela 1, $t(12) = 9,31$, $p < 0,0001$) e foi revelado que a dieta modificou significativamente o consumo de ração diário entre os grupos controle e dieta HC. O peso corpóreo final foi comparado (teste t não pareado, tabela 1, $t(34) = 2,74$, $p < 0,0098$) e foi revelada diferença significativa no peso corpóreo final entre os grupos controle e dieta HC. O índice de adiposidade também foi comparado entre os grupos controle e dieta HC (teste de Mann-Whitney, tabela 1, ($U = 57$, $p = 0,0009$) e o teste revelou que o grupo dieta HC teve maior

índice de adiposidade.

Tabela 1 – Efeito do consumo de dieta HC sobre peso corpóreo final, alimento ingerido e índice de adiposidade

	Controle	Dieta HC
Alimento ingerido (g)	9,49 ± 0,45	5,15 ± 0,12****
Peso corpóreo final (g)	30,32 ± 0,51	32,95 ± 0,88**
Índice de adiposidade (%)	1,20 ± 0,18	2,6 ± 0,36***

Resultados expressos como média ± E.P.M. Alimento ingerido analisado por teste t com correção de Welch (n=12), peso corpóreo final analisado através de teste t (n = 21-15) e índice de adiposidade analisado através de teste Mann-Whitney (n = 21-15) . ** p < 0,01. *** p < 0,001. **** p < 0,0001.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, esperava-se avaliar o efeito do ômega-3 em comportamento relacionado à ansiedade em animais submetidos ao consumo crônico de dieta HC. Entretanto, os resultados de comportamento não demonstraram efeito da dieta HC na indução de comportamento tipo ansiogênico, inviabilizando a possibilidade de avaliar o efeito do ômega-3. De acordo com os resultados comportamentais, foi observado que a latência no teste da alimentação suprimida pela novidade não foi alterada significativamente e o grupo dieta HC não demonstrou aumento do comportamento tipo ansioso. Estes dados não estão de acordo com trabalhos anteriores que mostraram o efeito do consumo crônico da dieta HC na indução de comportamento tipo ansioso, incluindo no teste de alimentação suprimida pela novidade (SANTOS et al., 2016; GOMES et al., 2018).

A experiência com machos da linhagem Balb/C, utilizada neste trabalho, mostra que estes animais apresentam elevado grau de competitividade e agressividade quando colocados em um mesmo ambiente com outros machos (Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP, 2013). Ao longo do tempo de exposição à dieta HC, foram observados casos de canibalismo e agressão física entre os animais. A necessidade de intervenção nas caixas para redistribuição dos animais resultou em redução do n amostral, além de possível estresse para os animais. Assim, pode-se

justificar que os animais controle estavam apresentando comportamento tipo-ansiosgênico, em decorrência das condições supra citadas, impedindo observar o efeito da dieta HC no comportamento relacionado à ansiedade o que, conseqüentemente, impossibilitou verificar o efeito do ômega-3. Desta forma, é possível que tal achado tenha sido influenciado pelas condições de acondicionamento dos animais.

Observou-se um aumento significativo do peso corpóreo final e do índice de adiposidade nos animais do grupo dieta HC devido ao aumento excessivo do tecido adiposo indicando que os animais que consumiram a dieta rica em carboidratos refinados tenderam a acumular mais tecido adiposo deixando-os propensos a inflamações crônicas e subcrônicas (STOLARCZYK, 2017). Esse aumento de gordura corporal é relacionado na literatura com altas taxas de secreção de insulina que ocorreram no grupo dieta HC devido ao alto consumo de carboidratos refinados. O pico de secreção de insulina causa elevação dos níveis de ácidos graxos no organismo, pois ocorre subregulação da lipólise nos adipócitos através da inibição da lipase hormônio sensível, aumento captura dos ácidos graxos do sangue para os depósitos adiposos e aumento nos fatores de transcrição relacionados a genes lipogênicos (LEHNINGER *et al.*, 2014; DIMITRIADIS *et al.*, 2011). Além disso, os resultados revelaram que a média de alimento ingerido diariamente foi significativamente menor no grupo dieta HC comparado ao grupo controle. O efeito de redução no apetite em indivíduos com alto índice de adiposidade tem causas descritas na literatura relacionadas a secreção aumentada de leptina, uma adipocina que atua diretamente no hipotálamo e no tronco encefálico levando a tal hiporexia (AHIMA *et al.*, 1996; ELMQUIST, 1997).

O consumo aumentado de ração pelo grupo dieta HC no pós-teste do Teste de Alimentação Suprimida pela Novidade deve-se a textura física da ração rica em carboidratos, uma vez que seu preparo, que leva leite condensado e água (OLIVEIRA *et al.*, 2013), conduz a um aumento no teor aquoso do pellet confeccionado, tornando-o mais macio do que o pellet de ração comercial para roedores. Esta última, tem menor teor aquoso e favorece um consumo mais rápido. Isso justifica que o grupo dieta HC pudesse se alimentar mais no período do pós-teste.

O ômega 3 é entendido como capaz de mudar a composição de lipídios do sistema nervoso central, sendo assim, ocorre mudança na fluidez da membrana e atividade de receptores (DANGELO *et al.*, 2020). Através destas mudanças vias inflamatórias diversificadas são controladas reduzindo danos de estresse oxidativo e, conseqüentemente, diminuindo a peroxidação lipídica. Esta peroxidação lipídica controlada regula os níveis de agentes antioxidantes endógenos como a glutathiona aumentando a neuroproteção (CALDER, 2017).

Logo, ressalta-se que o ômega-3 não possui apenas um efeito anti-inflamatório pontual, mas sim um efeito central no balanço fisiológico do funcionamento do SNC. Este é considerado um nutracêutico e está historicamente ligado ao processo evolutivo humano (LARRIEU & LAYE, 2018). Muitas desordens inflamatórias generalizadas podem ser evitadas quando o ômega 3 é consumido com frequência adequada, pois, seu consumo em quantidades recomendadas se mostra benéfico e indispensável. Como a ansiedade é geralmente causada por eventos neuroinflamatórios, o consumo de ômega-3 torna-se um fator extremamente importante para investigação no tratamento de transtornos psiquiátricos relacionados à obesidade (SERHAN *et al.*, 2011; LABROUSSE *et al.*, 2012).

6 CONCLUSÃO

A dieta, como esperado, levou a diferenças na deposição de tecido adiposo, porém, sem mudanças notáveis no comportamento. O ômega-3 é descrito na literatura como amplamente promissor para neuroproteção, capaz de proteger diversas áreas do SNC através do seu efeito anti-inflamatório e antioxidante. Desta forma, mais estudos precisam ser conduzidos para avaliação do efeito preventivo do ômega-3 em comportamentos de ansiedade associados à obesidade, pois várias evidências apontam para o seu efeito nas alterações neurobiológicas relacionadas com estas condições patológicas.

REFERÊNCIAS

ADAM, T.; EPEL, E. Stress, eating and the reward system. **Physiol Behav**, v. 9, n. 4, p. 449-458, jul. 2007.

AGRAWAL, R.; GOMEZ-PINILLA, F. (2012). “Metabolic syndrome” in the brain: deficiency in ômega 3 fatty acid exacerbates dysfunctions in insulin receptor signalling and cognition. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. 10, p. 2485–2499, 2012.

AHIMA, R. S.; PRABAKARAN, D.; MANTZOROS, C.; QU, D.; LOWELL, B.; MARATOS-FLIER, E.; FLIER, J. S. (1996). Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. **Nature**, v. 382, n. 6588, p. 250–252, 1996.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder DSM-IV. Draft, 1990.

ARNOLD, M. *et al.* Overweight duration in older adults and cancer risk: a study of cohorts in Europe and the United States. **Eur J Epidemiol**, Jun 14 2016.

AVENA, N. M. Examining the addictive-like properties of binge eating using an animal model of sugar dependence. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 15, n. 5, p. 481–491, 2007.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BELLO, N. T.; SWEIGART, K. L.; LAKOSKI, J. M.; NORNGREN, R.; Hajnal, A. Restricted feeding with scheduled sucrose access results in an upregulation of the rat dopamine transporter. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 284, n. 5, p. R1260–R1268, 2003.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quím Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

BESKE, S. D. *et al.* Reduced cardiovagal baroreflex gain in visceral obesity: implications for the metabolic syndrome. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 282, n. 2, p. H630-5, Feb

2002.

BOUAYED, J.; RAMMAL, H.; SOULIMANI, R.. Oxidative Stress and Anxiety: Relationship and Cellular Pathways, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2, 5 pages, 2009.

BOZZATELLO, P.; ROSA, M.; ROCCA, P.; BELLINO, S. Effects of Omega 3 Fatty Acids on Main Dimensions of Psychopathology. *Int J Mol Sci*, v. 21, n. 17, p. 1-27, set. 2020.

BRAY, G. A. Is Sugar Addictive? *Diabetes*, v. 65. n. 7, p. 1797–1799, 2016.

BRUCE, L. L., NEARY, T. J. The Limbic System of Tetrapods: A Comparative Analysis of Cortical and Amygdalar Populations. *Brain, Behavior and Evolution*, v. 46, p. 4-5, 1995.

BRUMPTON, B.; LANGHAMMER, A.; ROMUNDSTAD, P.; CHEN, Y.; MAI, X-M. The associations of anxiety and depression symptoms with weight change and incident obesity: The HUNT Study. *Int J Obes (Lond)*, v. 37, n. 9, p. 1268-1274, dez. 2012.

CALABRESE, V., MANCUSO, C., CALVANI, M. ET AL. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci*, v.8, p.766–775, 2007.

CALABRESE, V.; BATES, T.E.; STELLA, A. M. G. NO Synthase and NO-Dependent Signal Pathways in Brain Aging and Neurodegenerative Disorders: The Role of Oxidant/Antioxidant Balance. *Neurochem*, p.1315–1341, 2000.

CALDER, P. C. Ômega 3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochemical Society Transactions*, v. 45, n. 5, p. 1105–1115, 2017.

CALDERÓN, C.; FORNS, M.; VAREA, V. Adolescent obesity: anxiety, cognitive and behavioural symptoms characteristic of eating disorders. *An Pediatr (Barc)*, v. 71, n. 6, p. 489-94, out. 2009.

CAMARGO, L. O papel do fator neurotrófico derivado do cérebro (bdnf) da via mesolímbica na hiperalgesia persistente. 2016. 88f. Tese de doutorado – Universidade estadual de campinas, Campinas, 2016.

CARLEZON, W.; MAGUE, S.; PAROW, A.; STOLL, A.; COHEN, P.; RENSHAW, P. Antidepressant-like effects of uridine and ω 3 fatty acids are potentiated by combined treatment in rats. **Biol Psychiatry**, v. 57, n. 4, p. 343-345, fev. 2005.

CARTER, M.; SHIEH, J. Animal Behavior. **Guide to Research Techniques in Neuroscience**, ed. 2, p. 39–71, 2015

Center for disease control and prevention (CDC), Get the Facts: Added Sugars, Mai 2021. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/nutrition/data-statistics/added-sugars.html>>. Acesso em 15 de Set 2021.

CHOLERIS, E. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 235–260, 2001.

CORDAIN, L. *et al.* Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. **Am J Clin Nutr**, v. 81, n. 2, p. 341-54, Feb 2005.

CRYAN, J. F.; SWEENEY, F. F. The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 164 n. 4, p. 1129–1161, 2011.

DANDONA, P. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 1, p. 4–7, 2004.

DANGELO, S., MOTTI, M. L.; MECCARIELLO, R. ω -3 and ω -6 Polyunsaturated Fatty Acids, **Obesity and Cancer. Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 2751, 2020

DE MELLO, A.H.; GASSENFERTH, A.; SCHRAIBER, R.D.E.B, SOUZA, L.D.A. R.; FLORENTINO, D.; DANIELSKI, L.G.; CITTADIN-SOARES, E.D.A.; FORTUNATO, J.J.; PETRONILHO, F.; QUEVEDO, J.; REZIN, G.T. Effects of omega on behavioral and biochemical parameters in rats submitted to chronic mild stress. **Metab Brain Dis**. v. 29, n.3, p.691-699, 2014.

DESRUMAUX, C.; RISOLD, P.Y.; SCHROEDER, H.; DECKERT, V.; MASSON, D.; ATHIAS, A.; LAPLANCHE, H.; LE GUERN, N.; BLACHE, D.; JIANG, X.C.; TALL, A.R.; DESOR, D.; LAGROST, L. Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency reduces brain vitamin E content and increases anxiety in mice. **FASEB J**. v. 19, p. 296-297, 2005.

DIMITRIADIS, G.; MITROU, P.; LAMBADIARI, V.; MARATOU, E.; RAPTIS, SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 93,

p. S52–S59, 2011.

DINICOLANTONIO, J. J.; LUCAN, S. C. The wrong white crystals: not salt but sugar as aetiological in hypertension and cardiometabolic disease. **Open Heart**, v. 1, n. 1, p. e000167, 2014.

DISABATO, D. J., QUAN, N., GODBOUT, J. P. Neuroinflammation: the devil is in the details. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 136–153, 2016.

DRAPER, H. H.; SQUIRES, E. J.; MAHMOODI, H.; WU, J.; AGARWAL, S.; HADLEY, M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radic Biol Med**, v. 15, n. 4, p. 353–363, 1993.

ELMQUIST, J.K.; AHIMA, R.S.; MARATOS-FLIER, E.; FLIER, J.S.; SAPER, C.B. A Leptin Activates Neurons in Ventrobasal Hypothalamus and Brainstem. **Endocrinology**, v. 138, n. 2, p. 839–842, 1997.

ESPOSITO, K. Inflammatory Cytokine Concentrations Are Acutely Increased by Hyperglycemia in Humans: Role of Oxidative Stress. **Circulation**, v. 106, n. 16, p. 2067–2072, 2002.

ESTANISLAU, C.; VELOSO, A. W. N.; FILGUEIRAS, G. B.; MAIO, T. P.; DAL-CÓL, M. L. C.; CUNHA, D. C.; FERNÁNDEZ-TERUEL, A. Rat self-grooming and its relationships with anxiety, dearousal and perseveration: Evidence for a self-grooming trait. **Physiology & Behavior**, 112585, 2019.

FEDOCE, A. G.; FERREIRA, F.; BOTA, R. G.; COSTA, V. B.; SUN, P. Y.; DAVIES, K. J. A.. The role of oxidative stress in anxiety disorder: cause or consequence?, **Free Radical Research**, 2018.

FUSCO, S.; AMANCIO, S.; PANCIERE, A.; ALVES, M.; SPIRI, W.; BRAGA, E. Anxiety, sleep quality, and binge eating in overweight or obese adults. **Rev Esc Enferm USP**, v. 54, e03656, dez. 2020.

GENTSCH, C.; LICHTSTEINER, M.; FEER, H. Open field and elevated plus-maze: A behavioural comparison between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats and the effects of chlordiazepoxide. **Behavioural Brain Research**, v. 25, n. 2, p. 101–107, 1987.

GIORDANO, E.; VISIOLI, F.; CHAIN, L. Omega 3 fatty acids: Molecular bases of potential antioxidant actions, **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 90, n. 1, p. 1-4, 2014.

GOMES, J.A.S.; OLIVEIRA, M.C.; GOBIRA, P.H.; SILVA, G.C.; MARÇAL, A.P.; GOMES, G.F.; FERRARI, C.Z.; LEMOS, V.S.; OLIVEIRA, A.C.P.; VIEIRA, L.B.; FERREIRA, A.V.M.; AGUIAR, D.C. A high-refined carbohydrate diet facilitates compulsive-like behavior in mice through the nitric oxide pathway. **Nitric Oxide**. v. 1, p. 61-69, 2018.

GRAHAM, D.; MEYER, J.; STANWOOD, G. Behavioral Phenotyping in Developmental Neurotoxicology - Simple Approaches Using Inconditioned Behaviors in Rodents. **Handbook of Developmental Neurotoxicology**, ed. 2, p. 287-308. 2018.

GROSS, L. S. *et al.* Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. **Am J Clin Nutr**, v. 79, n. 5, p. 774-9, May 2004.

GUILLEMOT-LEGRIS, O.; MUCCIOLI, G. G. Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. **Trends in Neurosciences**, v. 40, n. 4, p. 237–253, 2017.

GULATI, K. ; RAI, N.; RAY, A. Nitric Oxide and Anxiety, **Vitamins and Hormones**, v. 103, p.169-192, 2017.

HASSAN, W.; SILVA, C.E; MOHAMMADZAI, I. U.; ROCHA, J. B.; J LF. Association of oxidative stress to the genesis of anxiety: implications for possible therapeutic interventions. **Curr Neuropharmacol**, v.12,n.2,p.120-39, 2014.

HIBBELN, J. Fish consumption and major depression. **The Lancet**, v. 351, n. 9110, p. 1213, abr. 1998.

HOVATTA, I.; TENNANT, R.; HELTON, R. ET AL. Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. **Nature**, v.438, p. 662–666, 2005.

HU, F. B.; MALIK, V. S. Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: Epidemiologic evidence. **Physiology & Behavior**, v. 100, n. 1, p. 47–54, 2010.

Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), Global burden disease, 2015. Disponível em: <<http://www.healthdata.org/gbd/data>>. Acesso em 06 de Set 2021.

JANAKIRAM, N.B.; MOHAMMED, A.; RAO, C.V. Role of lipoxins, resolvins, and other bioactive lipids in colon and pancreatic cancer. **Cancer and Metastasis Review**, v. 30,n. 3, p. 507–523, 2011.

JOHNSON, R. J., SÁNCHEZ-LOZADA, L. G., ANDREWS, P.; LANASPA, M. A. Perspective: A Historical and Scientific Perspective of Sugar and Its Relation with Obesity and Diabetes. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 8, n. 3, p. 412–422, 2017.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; SONG, C.; BERRIDGE, K. C.; GRAYBIEL, A. M.; FENTRESS, J. C. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 45–59, 2015.

KHAIROVA, R.; PAWAR, R.; SALVADORE, G.; JURUENA, M. F.; DE SOUSA, R. T., SOEIRO-DE-SOUZA, M. G.; SALVADOR, M.; ZARATE, C. A.; GATTAZ, W. F.; MACHADO-VIEIRA, R. Effects of lithium on oxidative stress parameters in healthy subjects. **Mol. Med. Rep.**, v. 5, n. 3, p. 680–682, 2012.

KONTTINEN, H. *et al.* Longitudinal associations between depressive symptoms and body mass index in a 20-year follow-up. **Int J Obes (Lond)**, v. 38, n. 5, p. 668-74, May 2014.

KRAEUTER, A.; GUEST, PC.; SARNYAI, Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. **Pre-Clinical Models**, v. 1916, p. 99-103, 2018.

KULOGLU, M.; ATMACA, M.; TEZCAN, E.; GECICI, O.; USTUNDAG, B.; BULUT, S. Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with panic disorder. **Neuropsychobiology**. v. 46, p. 186-189, 2002.

KYROU, I.; TSIGOS, C. Stress mechanisms and metabolic complications. **Horm Metab Res**, v. 39, n. 6, p. 430-438, jun. 2007.

LABROUSSE, V. F., NADJAR, A., JOFFRE, C., COSTES, L., AUBERT, A., GRÉGOIRE, S. Short-term long chain omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and memory impairment in aged mice. **PLoS One**, V. 7, p. e36861, 2012.

LARRIEU, T., LAYÉ, S. Food for Mood: Relevance of Nutritional Ômega 3 Fatty Acids for Depression and Anxiety. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. 1047, p. 1-15, 2018.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 6ª Edição, 2014. Ed. Artmed.

LIU, J.J.; GALFALVY, H.C.; COOPER, T.B.; OQUENDO, M.A.; GRUNEBAUM, M.F.; MANN, J.J.; SUBLETTE, M.E. Omega 3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) status in major depressive disorder with comorbid anxiety disorders. **J Clin Psychiatry**. v. 74, n. 7, p. 732-738, 2013.

LOPEZ-ATALAYA, J. P., ASKEW, K. E., SIERRA, A., GOMEZ-NICOLA, D. Development and maintenance of the brain's immune toolkit: Microglia and non-parenchymal brain macrophages. **Developmental Neurobiology**, v. 78, n. 6, p. 561–579, 2017.

MALIK, V. S. *et al.* Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 33, n. 11, p. 2477-83, Nov 2010.

MALIK, V. S., PAN, A., WILLETT, W. C., & HU, F. B. Sugar-sweetened beverages and weight gain in children and adults: a systematic review and meta-analysis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 98, n. 4, p. 1084–1102, 2013.

MARSEGLIA, L.; MANTI, S.; D'ANGELO, G.; NICOTERA, A.; PARISI, E.; DI ROSA, G.; GITTO, E.; ARRIGO, T. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, p.378-400, 2015.

MELCA, I.; FORTES, S. Obesidade e transtornos mentais: construindo um cuidado efetivo. **HUPE**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, p. 18-25, 2014.

MORAN, T. H.; MCHUGH, P. R. Distinctions among three sugars in their effects on gastric emptying and satiety. **Am J Physiol**, v. 241, n. 1, p. R25-30, Jul 1981.

MORRIS, M. J. *et al.* Why is obesity such a problem in the 21st century? The intersection of palatable food, cues and reward pathways, stress, and cognition. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 58, p. 36-45, Nov 2015.

MOSS, M. Salt, sugar, fat: How the food giants hooked us. **Random House**, 2013.

NG, M. *et al.* Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 384, n. 9945, p. 766-781, Aug 30 2014.

MUÑOZ, A.; COSTA, M.. Nutritionally Mediated Oxidative Stress and Inflammation, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013.

NG, S.-F., LIN, R. C. Y., LAYBUTT, D. R., BARRES, R., OWENS, J. A., MORRIS, M. J. Chronic high-fat diet in fathers programs β -cell dysfunction in female rat offspring. **Nature**, v. 467, n. 7318, p. 963–966, 2010.

OLIVEIRA, M. C. *et al.* Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 9, p. E396-406, Sep 2013.

OLMEZ, I.; OZYURT, H. Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. **Neurochem. Int.**, v. 60, n. 2, p. 208–212, 2012.

OLSEN, N. J.; HEITMANN, B. L. Intake of calorically sweetened beverages and obesity. **Obes Rev**, v. 10, n. 1, p. 68-75, Jan 2009.

Organização Mundial de Saúde (OMS), Obesity and Overweight, Jun 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em 21 de Mar 2019.

Center for disease control and prevention (CDC), Get the Facts: Added Sugars, Mai 2021. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/nutrition/data-statistics/added-sugars.html>>. Acesso em 15 de Set 2021.

ORTEGA, F. B.; LAVIE, C. J.; BLAIR, S. N. Obesity and Cardiovascular Disease. **Circ Res**, v. 118, n. 11, p. 1752-70, May 27 2016.

PAGE, K. A. *et al.* Effects of fructose vs glucose on regional cerebral blood flow in brain regions involved with appetite and reward pathways. **JAMA**, v. 309, n. 1, p. 63- 70, Jan 02 2013.

PECORARO, N.; REYES, F.; GOMEZ, F.; BHARGAVA, A.; DALLMAN, M. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. **Endocrinology**, v. 145, p. 3745-3762, 2004.

PEREIRA-MIRANDA, E. *et al.* Overweight and Obesity Associated with Higher Depression Prevalence in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. **J Am Coll Nutr**, p. 1-11, Apr 10 2017.

PICHÉ, M.-E., TCHERNOF, A.; DESPRÉS, J.-P. Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. **Circulation Research**, v. 126, n. 11, p. 1477–1500, 2020.

PIERINI D.; BRYAN N.S. Nitric Oxide Availability as a Marker of Oxidative Stress, **Methods in Molecular Biology**, v. 120, 2015.

PISOSCHI, A. M; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

PITTENGER, C.; DUMAN, R. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 88–109, 2008.

POLOKOWSKI, A.; SHAKIL, H.; CARMICHAEL, C.; REIGADA, L. Ômega 3 fatty acids and anxiety: A systematic review of the possible mechanisms at play. **Nutr Neurosci**, v. 23, n. 7, p. 494-504, jul. 2020.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n 1, p. 3–33, 2003.

RADA, P.; AVENA, N.M.; HOEBEL, B.G. Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell. **Neuroscience**, v. 134, n. 3, p. 737-744, 2005.

RAMAKER, M.; DULAWA, S. Identifying fast-onset antidepressants using rodent models. **Molecular Psychiatry**, v. 22, n. 5, p. 656–665, 2017.

ROXO, M. R., FRANCESCHINI, P. R., ZUBARAN, C., KLEBER, F. D., SANDER, J. W. The Limbic System Conception and Its Historical Evolution. **The Scientific World Journal**, v. 11, p. 2427–2440, 2011.

SALIM, S. Oxidative Stress Regulates Neurobehavioral Function, **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 360, n.1, p.201-205, 2017.

SALIM, S.; ASGHAR, M.; TANEJA M.; HOVATTA, I.; CHUGH, G.; VOLLERT, C.; ANTHONY, V. U. Potential contribution of oxidative stress and inflammation to anxiety and hypertension, **Brain Research**, v. 1404, p. 63-71, 2011.

SAMUELS, B.; HEN, R. Novelty-Suppressed Feeding in the Mouse. **Neuromethods**, v. 63, p. 107-121, 2011.

SANSBURY, B. E.; HILL, B. G.. Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide, **Free Radical Biology and Medicine**, v. 73, p. 383-399, 2014 .

SANTOS, C. J. *et al.* Carbohydrate-enriched diet predispose to anxiety and depression- like behavior after stress in mice. **Nutr Neurosci**, p. 1-7, Jul 29 2016.

SAURO, C.; RAVALDI, C.; CABRAS, P.; FARAVELLI, C.; RICCA, V. Stress, Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Eating Disorders. **Neuropsychobiologia**, v. 57, n. 3, p. 95-115, jun. 2008.

SAW, C. L. L.; YANG, A. Y.; GUO, Y.; KONG, A.T. Astaxanthin and omega-3 fatty acids individually and in combination protect against oxidative stress via the Nrf2–ARE pathway, **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p.869-875, 2013.

SCHMITT, U.; HIEMKE, C. Combination of open field and elevated plus-maze: A suitable test battery to assess strain as well as treatment differences in rat behavior. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 22, n. 7, p. 1197–1215, 1988.

SCORLETTI, E.; BYRNE, C. D. Ômega 3 fatty acids and non-alcoholic fatty liver disease: Evidence of efficacy and mechanism of action. **Mol Aspects Med.** v. 64, p. 135-146, 2018.

SEDLAK, J; HANUS, L. Changes of glutathione and protein bound SH-groups concentration in rat adrenals under acute and repeated stress. **Endocrinol. Exp.**, v. 16, n. 2, p. 103-109, 1982.

SERHAN, C. N., FREDMAN, G., YANG, R., KARAMNOV, S., BELAYEV, L. S., BAZAN, N. G. Novel proresolving aspirin-triggered DHA pathway. **Chem. Biol.**, v. 18, p. 976–987, 2011.

SERRA, A.; SOLER, E.; FERRI, A.; MARTÍ, V.; NAVARRO, A. A standardization of the Novelty-Suppressed Feeding Test protocol in rats. **Neuroscience Letters**, v. 658, p. 73–78, 2017.

SESTAKOVA, N.; PUZSEROVA, A.; KLUKNAVSKY, M.; BERNATOVA, I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. **Interdiscip. Toxicol**, v. 6, n. 3, p. 126–135, set. 2013.

SHABAB, T., KHANABDALI, R., MOGHADAMTOUSI, S. Z., KADIR, H. A., MOHAN, G. Neuroinflammation pathways: a general review. **International Journal of Neuroscience**, v. 127, n. 7, p. 624–633, 2016.

SOUZA, C. G. *et al.* Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. **Life Sci**, v. 81, n. 3, p. 198-203, Jun 27 2007.

STANHOPE, K. L. Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 53, n. 1, p. 52–67, 2015.

STAVRINO, P. S.; ANDREOU, E.; APHAMIS, G.; PANTZARIS, M.; IOANNOU, M.; S. PATRIKIOS, I.; D. GIANNAKI, C. The Effects of a 6-Month High Dose Omega-3 and Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids and Antioxidant Vitamins Supplementation on Cognitive Function and Functional Capacity in Older Adults with Mild Cognitive Impairment. **Nutrients**, v.12, p 325, 2020.

STOLARCZYK, E. Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? **Current Opinion in Pharmacology**, v. 37, p. 35–40, 2017.

SU, K. P.; MATSUOKA, Y.; PAE, C.U. Ômega 3 Polyunsaturated Fatty Acids in Prevention of Mood and Anxiety Disorders. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**. v. 13, n. 2, p. 129-137, 2015.

SUH, S; KIM, J. H. Glycemic Variability: How Do We Measure It and Why Is It Important? **Diabetes & Metabolism Journal**, v. 39, n. 4, p. 273-282, 2015.

TAM, B. L., NORHAIZAN, M. E.; LIEW, W. P. P.. Nutrients and Oxidative Stress: Friend or Foe, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** , p.24 , 2018.

TEMPLE, N. Fat, Sugar, Whole Grains and Heart Disease: 50 Years of Confusion. **Nutrients**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2018.

THE GBD 2015 OBESITY COLLABORATORS. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 1, p. 13–27, 2017.

TORRES, S.; NOWSON, C. Relationship between stress, eating behavior, and obesity. **Nutrition**, v. 23, n. 11-12, p. 887-94, nov-dez 2007.

TREIT, D.; FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 31, n. 4, p. 959–962, 1988.

U.S. department of health and human services (HHS), Dietary Guidelines for Americans, 2020. Disponível em: <<https://www.dietaryguidelines.gov>>. Acesso em 06 de Set 2021.

VAN VELZEN, L.S.; WIJDEVELD, M.; BLACK, C.N.; VAN TOL, M.J.; VAN DER WEE, N.J.A.; VELTMAN, D.J.; PENNINX, B.W.J.H.; SCHMAAL, L. Oxidative stress and brain morphology in individuals with depression, anxiety and healthy controls. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v. 2, n. 76, p. 140-144, 2017.

VIGITEL Brasil 2015 Saúde Complementar: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília:Ministério da Saúde, 173 p. 2017.

VINCENT, H.K.; INNES, K.E.; VINCENT, K.R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 9, p.813-839, 2007.

VINOT, N.; JOUIN, M.; LHOMME-DUCHADEUIL, A.; GUESNET, P.; ALESSANDRI, J.M.; AUJARD, F.; PIFFERI, F. Ômega 3 fatty acids from fish oil lower anxiety, improve cognitive functions and reduce spontaneous locomotor activity in a non-human primate. **PLoS One**. v. 6, n. 6, 2011.

WORLD OBESITY FEDERATION - Obesity: missing the 2025 global targets - London – 2020.

YANG, L. P. *et al.* Acute Treatment with a Novel TRPC4/C5 Channel Inhibitor Produces Antidepressant and Anxiolytic-Like Effects in Mice. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0136255, 2015.

YANG, Q.; ZHANG, Z.; GREGG, E. W., FLANDERS, W. D., MERRITT, R.; HU, F. B. Added Sugar Intake and Cardiovascular Diseases Mortality Among US Adults. **JAMA Internal Medicine**, v. 174, n. 4, p. 516- 524, 2014.

ZALACHORAS, I.; HOLLIS, F.; EVA RAMOS-FERNÁNDEZ; LAURA TROVO; SARAH SONNAY; GEISER, E.; NICOLAS PREITNER,; PASCAL STEINER,; SANDI, C.; MORATÓ, L. Therapeutic potential of glutathione-enhancers in stress related psychopathologies, **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 114, p. 134-155, 2020.