



Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA
(ETCC) SOBRE O COMPORTAMENTO ALIMENTAR E PARÂMETROS
NEUROQUÍMICOS DE RATOS SUBMETIDOS À MODELO DE OBESIDADE**

JOICE SOARES DE FREITAS

ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª. Iraci Lucena da Silva Torres

COORIENTADORA: Dr^ª. Isabel Cristina de Macedo

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, setembro de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FARMACOLOGIA
E TERAPÊUTICA

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA
(ETCC) SOBRE O COMPORTAMENTO ALIMENTAR E PARÂMETROS
NEUROQUÍMICOS DE RATOS SUBMETIDOS À MODELO DE OBESIDADE**

JOICE SOARES DE FREITAS

Orientadora: Iraci Lucena da Silva Torres

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência Biológicas: Farmacologia e Terapêutica,
UFRGS, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, setembro de 2016.

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Vera e José Flávio de Freitas e a minha Orientadora Dra. Iraci Torres, por acreditarem em mim.

Agradecimentos

À Deus, por mais esta oportunidade de desenvolver este trabalho, sinônimo de realização pessoal e profissional.

Aos meus pais Vera Lucia e José Flávio de Freitas, por sempre me incentivarem e estarem do meu lado, eu devo tudo a vocês.

Aos meus irmãos e minha sobrinha, pelo apoio e carinho.

Ao meu namorado Denis Machado Terra, por estar ao meu lado em todo tempo, pela compreensão e entusiasmo.

À minha querida Orientadora, Professora Dra. Iraci Lucena da Silva Torres, pela disponibilidade, aprendizado, carinho e confiança.

À minha coorientadora, Dra. Isabel Cristina de Macedo pelo otimismo, atenção e incentivo.

A toda equipe da UEA, por toda ajuda foram muito importantes.

A toda equipe da UAMP pelo apoio necessário ao desenvolvimento dessa dissertação.

Aos meus colegas do Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Investigações Pré-clínicas, agradeço a cada um de vocês. Em especial aos amigos, Éllen Almeida Nunes, Jonnsin Kuo, Daniela Silva, Alexi Muchale, Tizye Rizo, sem vocês não seria possível o desenvolvimento da parte experimental.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida, bem como às agências de fomento, Fapergs (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Rio Grande do Sul) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), que contribuíram na realização deste trabalho.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG/HCPA) e a Fundação de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA), pelo apoio financeiro no desenvolvimento do projeto (GPPG/HCPA-110405).

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica (PPGFT).

"Cada sonho que você deixa pra trás,
é um pedaço do seu futuro que deixa de existir"

Steve Jobs

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	i
Lista de Figuras	ii
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	iii
Resumo.....	v
Abstract	vi
1 REVISÃO DA LITERATURA	14
1.1 OBESIDADE.....	14
1.2 OBESIDADE E COMPORTAMENTO ALIMENTAR	15
1.3 MARCADORES BIOQUÍMICOS	20
1.3.1 O papel do BDNF no controle alimentar	20
1.3.2 Obesidade e o perfil inflamatório	22
1.4 Estimulação transcraniana por corrente contínua	24
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVOS GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 ARTIGO	28
4 DISCUSSÃO	61
CONCLUSÃO	64
Referências	66
Anexo	75

Lista de Tabelas

Tabela 1	19
----------------	----

Lista de Figuras

Figura 1.....	17
Figura 2.....	23

Lista de Abreviaturas e Siglas

- AgRP - peptídio relacionado ao gene agouti (do inglês *Agouti-Related Protein*)
- ARC - núcleo arqueado (do inglês *Arcuate Nucleous*)
- BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *Brain-Derived Neurotrophic Factor*)
- CART - Transcrito relacionado à cocaína e anfetamina (do inglês *Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript*)
- CCK - Colecistoquinina (do inglês *Cholecystokinin*)
- CDV - Complexo Dordo Vagal
- CPFDL - córtex pré-frontal dorso lateral
- DMN - Núcleo dorsomedial (do inglês *Dorsomedial Nucleous*)
- ELISA - do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- EMT - Estimulação Magnética Transcraniana
- EPM - Labirinto em Cruz Elevado (do inglês *Elevated Plus Maze*)
- ETCC - Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua
- GABA - Ácido gama-aminobutírico (do inglês *Gamma-Aminobutyric Acid*)
- GHSR - Receptor secretagogo do hormônio de crescimento (do inglês *Growth Hormone Secretagogue Receptor*)
- GLP-1- Peptídeo semelhante ao glucagon-1 (do inglês *Glucagon-Like-Peptide-1*)
- IMC - Índice de Massa Corporal
- INRS - Receptor de insulina (do inglês *Insulin Receptor*)
- IRS - Substrato do receptor de insulina (do inglês *Insulin Receptor Substrate*)
- ISRS - Inibidores Seletivos de Recaptação de 5-HT
- IL-1 β - Interleucina 1 beta
- IL-6 - interleucina 6
- IL-10 - Interleucina 10
- Jak/STAT - sinalização da Janus quinase/transdutor de sinal ativador de transcrição (do inglês *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*)
- LEPR - Receptores da leptina (do inglês *Leptin Receptors*)
- LH - Hipotálamo lateral (do inglês *Lateral Hypothalamus*)
- MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases*)

MCH - Hormônio concentrador de melanina (MCH, do inglês Melanin-Concentrating Hormone)

MC4R - Receptor de melanocortina 4 (do inglês *Melanocortin 4 Receptor*)

NGF - Fator de crescimento do nervo (do inglês *Nerve Growth Factor*)

NPHD - Mergulho de cabeça desprotegido (do inglês *non-protected head-dipping*)

NPY - Neuropeptídeo Y

NTS - Núcleo Trato Solitário

NT-3 - Neurotrofina-3

NT-4/5 - Neurotrofina-4/5

OF - Campo aberto (do inglês *open field*)

OMS - Organização Mundial da Saúde

OX - Orexina

OXM - Oxintomodulina

OMS - Organização Mundial da Saúde

PFT - Teste do alimento palatável (PFT, do inglês *Palatable Food Test*)

PI3K - fosfoinositídeo 3-quinase (do inglês *Phosphatidylinositol-3-OH Kinase*)

PLCy - fosfolipase Cy (do inglês *Phospholipase Cy*)

POMC - Pro-ópio-melanocortina do inglês Pro-Opiomelanocortin)

PP - Polipeptídeo pancreático

PVN - Núcleo paraventricular (do inglês *Paraventricular Nucleous*)

PYY - Peptídeo YY

p75NTR - Pan-neurotrofina (do inglês *p75 Neurotrophin Receptor*)

SNC - Sistema Nervoso Central

TAB - Tecido Adiposo Branco

TCA - Tempo nos barços fechado (do inglês *time on closed arms*)

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa- α (*Tumoral Necrosis Factor α*)

TrK - Receptor tirosina quinase (do inglês *Tyrosine receptor Kinase*)

VMN - Núcleo ventromedial (do inglês *Ventromedial Nucleous*)

α -MSH - Hormônio estimulante de alfa-melanócito (do inglês *α -Melanocyte Stimulating Hormone*)

5-HT - 5-hidroxitriptamina

Resumo

Obesidade é uma doença multifatorial relacionada com desenvolvimento de patologias como hipertensão arterial, doença arterial coronariana, diabetes tipo 2 e certos tipos de câncer. Estruturas do sistema nervoso central, especialmente o hipotálamo, estão envolvidas no controle do apetite. A estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) é uma técnica de estimulação cerebral não invasiva representando um recurso promissor no tratamento da compulsão alimentar e alterações metabólicas, uma vez que promove neuroplasticidade em vias envolvidas com comportamento alimentar. Portanto, o objetivo desta dissertação foi avaliar os efeitos da exposição à ETCC em ratos submetidos à modelo de obesidade. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA:110455). Quarenta ratos Wistar machos foram divididos em 4 grupos: dieta padrão+sham ETCC, dieta padrão+ETCC, dieta hipercalórica+sham ETCC, dieta hipercalórica+ ETCC. Após 40 dias de exposição à dieta hipercalórica e previamente a exposição ao tratamento ETCC, os ratos foram expostos ao teste de campo aberto (OF, do inglês *Open Field*) para avaliar atividade exploratória e locomotora e ao teste de labirinto em cruz elevado (EPM, do inglês *Elevated Plus Maze*) para avaliar comportamento do tipo ansioso. Após 24h dos testes comportamentais, teve início a exposição ao tratamento repetido com ETCC bicefálico 20 minutos/dia/8 dias com intensidade de 0,5 mA no tratamento ativo ou exposição aos eletrodos desligados nos animais sham. Vinte e quatro horas após a última sessão de ETCC foram repetidos os testes comportamentais (OF e EPM) e 48h o teste do alimento palatável (PFT, do inglês *Palatable Food Test*) foi realizado. Para os ensaios bioquímicos, os ratos foram mortos 24 horas após a PFT. Os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*), interleucina 10 (IL-10), interleucina 1 beta (IL-1 β), e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , do inglês *Tumor Necrosis Factor-Alpha*) no córtex foram determinados por ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Delta de peso, índice de Lee, peso dos tecidos, níveis de citocinas e BDNF foram analisados por ANOVA de uma via. Foi empregado o teste de Kruskal-Wallis para análise dos dados do OF, EPM e PFT entre os grupos e para análise dos dados pré-tratamento e pós-tratamento foi empregado o teste de Wilcoxon. Diferenças foram consideradas significantes com um $P < 0,05$. Nossos resultados demonstram que o tratamento com ETCC bicefálica reduz a compulsão por alimento palatável em ratos obesos após o jejum e reverte o aumento do Índice de Lee e do peso do tecido adiposo visceral nestes animais. Além disso, verificou-se que a exposição à dieta hipercalórica diminui os níveis de BDNF e IL-10 em cortex. Por outro lado, ETCC bicefálica diminui os níveis de IL-1 β e TNF- α em córtex de animais obesos. A exposição à dieta hipercalórica teve efeito ansiolítico que foi revertido pelo tratamento com ETCC. Portanto, a exposição a tratamento repetido com ETCC parece atuar em vias envolvidas em comportamento alimentar modulando alterações neuroplásticas características da obesidade.

Palavras-chave: BDNF; citocinas; comportamento alimentar; dieta hipercalórica; obesidade.

Abstract

Obesity is a multifactorial disease related to development of diseases such as hypertension, coronary artery disease, type 2 diabetes and certain types of cancers. Structures of the central nervous system, particularly the hypothalamus, are involved in food intake control. The transcranial direct current stimulation (tDCS) is a promising non-invasive brain stimulation technique in the treatment of binge eating and metabolic disorders, since it promotes neuroplasticity pathways involved with feeding behavior. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of exposure to tDCS in rats subjected to obesity model. All procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA / HCPA: number 110455). Forty male Wistar rats were divided into 4 groups: standard diet + sham tDCS (SDS), standard diet + tDCS (SDT), hypercaloric diet + sham tDCS (HDS) and hypercaloric diet + tDCS (HDT). Forty days after exposure to hypercaloric diet and previously exposure to the tDCS treatment, rats were exposed to the open field test (OF) to evaluate locomotor and exploratory activities and to elevated plus maze test (EPM) to assess anxiety-like behavior. Twenty-four hours after the behavioral tests, the repeated bicephalic tDCS treatment was started, 20-minute/day for 8 days, using 0,5mA of intensity in the active treatment or exposure to electrodes turned off in sham animals. Twenty-four hours after the last tDCS session the behavioral tests (OF and EPM) were repeated and the 48 hours before the palatable food test (PFT) was performed. For biochemical assays, the rats were killed 24 hours after the (PFT). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), interleukin 10 (IL-10), interleukin 1 beta (IL-1 β), and tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) levels in the cortex were determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay test (ELISA). Delta weight, Lee index, tissue weight, cytokines and BDNF levels were analyzed by one-way ANOVA. It was employed a Kruskal-Wallis test for analysis of the data of the OF, EPM and PFT between the groups and to analyze the data pre-treatment and post-treatment was used Wilcoxon test. Significance difference was defined at $P < 0.05$. Our results demonstrate that bicephalic tDCS treatment reduces the food craving in obese animals after fasting and it reverts the increased Lee index and the weight of visceral adipose tissue in these animals. Furthermore, it was found that exposure to hypercaloric diet decreases BDNF and IL-10 in the cortex. On the other hand, bicephalic tDCS treatment reduces IL-1 β levels and TNF- α in the cortex. Exposure to hypercaloric diet had anxiolytic effect that was reversed by treatment with tDCS. Therefore, exposure to repeated treatment with tDCS appears to act in pathways related to eating behavior modulating changes neuroplastic obesity features.

Keywords: BDNF; cytokines; feeding behavior; hypercaloric diet; obesity.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 OBESIDADE

A prevalência mundial da obesidade duplicou nos últimos 30 anos, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2014 mais de 1,9 bilhões adultos estavam acima do peso e destes mais de 600 milhões eram obesos (WHO, 2014). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, uma pesquisa entre 2012 e 2013 revela que o percentual de pessoas com excesso de peso superava a metade da população e a obesidade atingia 17% dos brasileiros, já em Porto Alegre este índice chegava a 18,4% dos habitantes (Ministério da Saúde, 2012). Obesidade é caracterizada como acúmulo de gordura corporal resultado de desequilíbrio entre a ingestão e o gasto calórico, além de sofrer influência de fatores genéticos, comportamentais e ambientais (Pandit, de Jong et al. 2011). A OMS define como sobrepeso o índice de massa corporal (IMC) ≥ 25 e obesidade, um IMC ≥ 30 (WHO, 2014). Nos dias atuais, o consumo excessivo de alimentos ricos em gordura, com alto valor energético e o sedentarismo são as principais razões para este desequilíbrio energético (Rosas-Vargas, Martinez-Ezquerro et al. 2011, Rodriguez-Hernandez, Simental-Mendia et al. 2013). Obesidade é diretamente relacionada a várias comorbidades como dislipidemias, hipertensão arterial e resistência à insulina (Duclos 2016). Essas alterações em conjunto contribuem para o desenvolvimento de doenças como síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (Esser, Paquot et al. 2015) que podem ser relacionadas a eventos potencialmente fatais como acidente vascular cerebral e infarto agudo do miocárdio (Bastien, Poirier et al. 2014). Sendo desta forma de grande importância a prevenção e tratamentos relacionados ao sobrepeso e obesidade, porém estratégias para diminuir seus riscos não têm sido bem sucedidas (Blucher 2014). Além disso, complicações decorrentes da obesidade levam a menor qualidade e expectativa de vida. Portanto desvendar e compreender causas psicossociais e neurobiológicas pode ser de grande relevância para a prevenção da obesidade, diminuindo sua incidência (Ooi, Kennedy et al. 2012). Alternativas para a prevenção e tratamento do sobrepeso e obesidade tem sido o foco de muitas pesquisas, buscando contribuir para redução no impacto socioeconômico decorrente do aumento crescente de doenças relacionadas à obesidade provocando maior demanda dos sistemas de saúde levando a um grande impacto econômico (Lehnert, Sonntag et al. 2013).

1.2 OBESIDADE E COMPORTAMENTO ALIMENTAR

O controle do consumo alimentar é bastante complexo, regulado por vários hormônios e alterado pelo apetite, motivação e demandas energéticas do organismo (Schneeberger, Gomis et al. 2014). O peso ponderal é regulado pelo balanço energético, relação entre a ingestão de alimentos e o armazenamento de energia. No entanto, quando há um desequilíbrio entre energia ingerida e gasto calórico, resulta em aumento do peso ponderal, contribuindo para o surgimento de obesidade (Naslund e Hellstrom 2007, Sanchez-Lasheras, Konner et al. 2010). Uma complexa rede de interações neuroregulatórias entre hormônios gastrintestinais e/ou pancreáticos e centros hipotalâmicos promove regulação da ingesta alimentar e do balanço energético (Keen-Rhinehart, Ondek et al. 2013) (Figura 1).

O controle homeostático é promovido principalmente pelos centros hipotalâmicos, como núcleo arqueado (ARC, do inglês *arcuate nucleous*), núcleo paraventricular (PVN, do inglês *paraventricular nucleous*), núcleo dorsomedial (DMN, do inglês *dorsomedial nucleous*), núcleo ventromedial (VMN, do inglês *ventromedial nucleous*) e hipotálamo lateral (LH, do inglês *lateral hypothalamus*) (Buhmann, le Roux et al. 2014). No hipotálamo encontram-se duas populações neurais responsáveis por controlar o consumo alimentar e o ganho ponderal por meio da liberação de neuropeptídeos orexígenos e anorexígenos (Andrews 2011). No núcleo arqueado do hipotálamo o neuropeptídeo Y (NPY) e proteína relacionada à agouti (AgRP - *agouti-related protein*) são peptídeos que aumentam o apetite e diminuem o gasto energético, enquanto a pro-ópio-melanocortina (POMC, do inglês *pro-opiomelanocortin*) precursora do hormônio estimulante de alfa-melanócito (α -MSH, do inglês *α -melanocyte stimulating hormone*) e o peptídeo relacionado à cocaína e à anfetamina (CART - *cocaine end amphetamine peptide related*) diminuem o apetite e aumentam o gasto energético (Sanchez-Lasheras, Konner et al. 2010). Ambas as populações de neurônios expressam o receptor de melanocortina 4 (MC4R, do inglês *Melanocortin 4 Receptor*) que quando ativados tem efeito anorexígeno promovendo a saciedade, gasto energético e perda de peso ponderal. Por outro lado, o bloqueio de MC4R tem efeito orexígeno, aumentando a ingestão de alimentos, armazenando energia e promovendo ganho ponderal (Krashes, Lowell et al. 2016). Neurônios dos núcleos hipotalâmicos são modulados por vários fatores humorais associados aos diferentes estados metabólicos, inibindo ou ativando estes neurônios, promovendo a comunicação com outros núcleos hipotalâmicos, coordenando o controle do consumo alimentar (Harrold, Dovey et al. 2012, Farr, Li et al. 2016). Além do ARC, regiões extra-hipotalâmicas, como o núcleo trato solitário (NTS), também recebem informações do

trato digestivo (Suzuki, Simpson et al. 2010). NPY é sintetizado principalmente no ARC, porém também é expresso em outras regiões hipotalâmicas como DMN, PVN, VMN e LH, tem seu efeito orexígeno nos receptores NPY1R e NPY5R (Tulloch, Murray et al. 2015). AgRP age estimulando o apetite, portanto é considerado agonista inverso com ação seletiva dos receptores MC3R e MC4R, enquanto a POMC atua como agonista destes receptores, inibindo consumo alimentar (Sohn, Elmquist et al. 2013). Além disso, os neurônios NPY/AgRP expressam o neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA, do inglês *gamma-aminobutyric acid*) que inibem neurônios POMC (Rui 2013). O conhecimento a respeito do mecanismo do efeito anorexígeno da CART, de seus receptores e vias de sinalização é pouco conclusivo e divergente, pois estudos demonstram que a CART pode exercer efeito orexígeno sob determinadas condições (Schneeberger, Gomis et al. 2014). Neurônios NPY / AgRP e POMC no ARC são responsáveis por receber, coordenar e responder a mudanças no estado metabólico são considerados "de primeira ordem" no controle de ingestão de alimentos (Stark, Ashley et al. 2013). Neurônios do núcleo arqueado fazem contato direto com a periferia no controle da saciedade, já os neurônios de "segunda ordem" localizam-se nos núcleos hipotalâmicos como, LH, PVN e VMN (Acosta, Abu Dayyeh et al. 2014). Estes circuitos de neurônios de "segunda ordem" interagem entre esses núcleos regulando eventos catabólicos ou anabólicos gerados no organismo (Pandit, de Jong et al. 2011). PVN além de receber inervações no ARC também recebe do NTS regulando circuitos da fome e da saciedade no encéfalo posterior (Rui 2013). PVN expressa elevados níveis de receptores MC4R, portanto tem sido considerado importante local para inibir a sinalização deste receptor na ingestão de alimentos, e torna-se reduzida após administração local de agonistas MC4R (Morton, Meek et al. 2014). DMN contém um grande número de neurônios NPY, recebe projeções principalmente do ARC e envia para o PVN e LH, expressão aumentada de NPY no DMN é associada à hiperfagia e obesidade induzida por dieta em ratos (Simpson, Martin et al. 2009). O VMN recebe projeções de NPY / AgRP e os neurônios POMC / CART (Pandit, de Jong et al. 2011). Finalmente, o LH contém neurônios que secretam neuropeptídeos orexígenos, o hormônio concentrador de melanina (MCH, do inglês *melanin-concentrating hormone*) e a orexina (OX) (Yu e Kim 2012). Orexinas são dois peptídeos neuroendócrinos derivadas do mesmo gene, designadas orexina A e B, e agem sobre dois receptores acoplados à proteína G denominados, orexina 1 (OX1R) e orexina 2 (OX2R), respectivamente, com afinidade seletiva (Harrold, Dovey et al. 2012). Neurônios orexina do LH projetam para várias áreas do encéfalo que estimulam a ingestão alimentar (Suzuki, Jayasena et al. 2012).

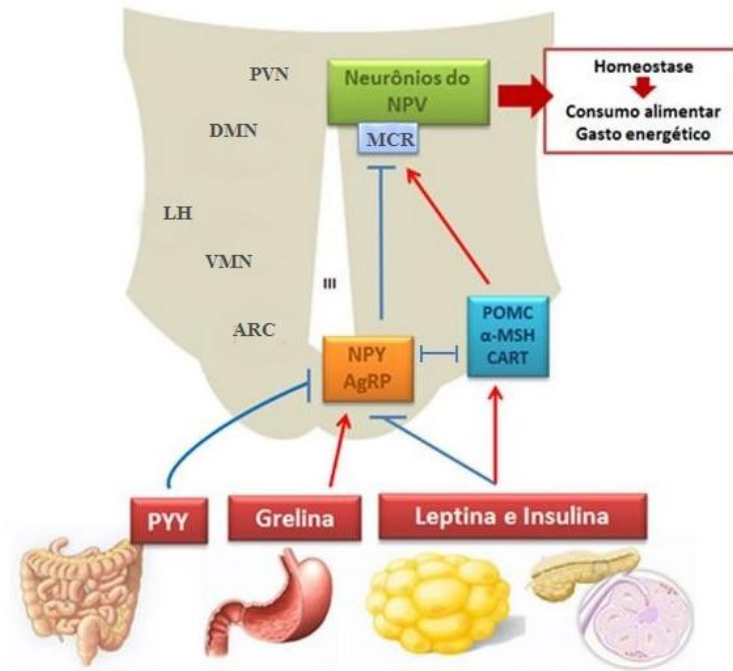


Figura 1. Controle central e periférico do apetite. PVN: núcleo paraventricular (do inglês *paraventricular nucleous*); DMN: núcleo dorso medial (do inglês *dorsomedial nucleous*); LH: hipotálamo lateral (do inglês *lateral hypothalamus*); VMN: núcleo ventro medial (do inglês *ventromedial nucleous*); ARC: núcleo arqueado (do inglês *arcuate nucleous*); MCR: receptor de melanocortina (do inglês *melanocortin receptor*); POMC: pró-opiomelanocortina; α -MSH: hormônio estimulante de melanócito- α ; CART: transcrito relacionado a cocaína e a anfetamina; PYY: polipeptídio YY; NPY: neuropeptídio Y; AgRP: peptídeo relacionado a gene *agouty*; CCK: colecistoquinina; GLP-1: peptídeo semelhante ao glucagon; PP: polipeptídio pancreático (Fonte: com autorização de Macedo, 2015, p.19)

É importante salientar que fatores periféricos como peptídeos e hormônios são liberados para regular o consumo alimentar sendo responsáveis pela sinalização desta regulação, como descrito na Tabela 1. Leptina é um hormônio derivado de tecido adiposo na proporção da massa de gordura, é responsável pelo equilíbrio energético, diminuição do apetite e ingesta alimentar. No entanto, obesidade tem sido associada à resistência à leptina, pois mesmo com elevadas concentrações de leptina não ocorre diminuição do apetite (Culbert, Racine et al. 2016). Há várias isoformas de receptores da leptina (LEPR, do inglês *leptin receptor*), no entanto, a forma longa (LEPRb) é essencial para as ações deste hormônio, mutações nesta isoforma são relacionadas a obesidade grave (Wasim, Awan et al. 2016). LEPRb é altamente expresso em vários núcleos hipotalâmicos e em outras regiões do sistema nervoso central (SNC). Leptina, simultaneamente, diminui atividade de neurônios que liberam NPY / AgRP e aumenta atividade de neurônios POMC (Kim, Leyva et al. 2014). Os efeitos da leptina sobre o gasto energético e peso ponderal parece depender de vias de sinalização da Janus quinase (JAK / STAT do inglês, *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) transdutor de sinal/ativador de transcrição. Já o efeito agudo da leptina e o comportamento

alimentar controlados via insulina pode necessitar da via de sinalização fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K do inglês, *phosphatidylinositol-3-OH kinase*) (Morton e Schwartz 2011).

Insulina é outro hormônio secretado pela célula β pancreática que age nos neurônios hipotalâmicos localizados principalmente na ARC, para reduzir o consumo energético (Sobrino Crespo, Perianes Cachero et al. 2014). Associada tradicionalmente ao metabolismo de glicose, seu efeito anorexígeno ocorre provavelmente por meio de mecanismos de sinalização semelhante à leptina. A insulina liga-se a receptores INSR (do inglês *insulin receptor*) e ativa o seu substrato (IRS, do inglês *insulin receptor substrate*) regulando homeostase da glicose e peso ponderal (Varela e Horvath 2012).

Grelina, liberada principalmente no estômago, é um importante marcador de estimulação do apetite, liga-se ao receptor secretagogo do hormônio de crescimento (GHSR, do inglês *growth hormone secretagogue receptor*). Os níveis circulantes de grelina são elevados em condições de jejum, mas reduzidos rapidamente após o consumo de alimentos. As administrações de grelina exógena em roedores e humanos promove ingestão de alimentos e ganho ponderal (Faulconbridge e Hayes 2011). Hormônios pancreáticos e intestinais também tem um papel importante no controle alimentar, promovendo comunicação bidirecional com o encéfalo.

O polipeptídeo pancreático (PP) é liberado após consumo alimentar pelo pâncreas endócrino via controle vagal, tem afinidade preferencialmente por receptores Y4, inibindo esvaziamento gástrico e reduzindo apetite (Bewick 2012). Já o peptídeo YY (PYY) é liberado das células L intestinais, seus níveis são baixos no jejum e sobem após uma refeição em proporção ao consumo de energia. No ARC, PYY liga-se preferencialmente a receptores Y2 reduzindo a ingestão de alimentos (Hussain e Bloom 2013). O peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) é também libertado de células L do intestino, cosecretado com PYY, atuando sobre o receptor de GLP-1 (GLP1R). Assim como os níveis de PYY, os níveis de GLP-1 também são elevados após uma refeição e são baixos no jejum atuando sobre o aumento da secreção de insulina induzido após ingestão de glicose (Suzuki, Jayasena et al. 2011).

Colecistoquinina (CCK) é um hormônio secretado no período pós-prandial pelas células I do intestino delgado decorrente do aumento de proteína e de gordura ligando-se aos receptores de CCK1 e CCK2 (Buhmann, le Roux et al. 2014). Os efeitos do CCK na saciedade podem ser aumentados pela leptina atuando especialmente no ARC (Blevins e Baskin 2010).

Oxintomodulina (OXM) e o GLP-1 são considerados membros da família do pré-proglucagon, sendo liberados de células L do intestino. Enquanto a oximodulina reduz à ingestão e aumenta o gasto energético, o GLP-1 retarda o esvaziamento gástrico e aumentando a sensação de saciedade. O efeito anorexígeno da OXM é predominantemente via GLP-1R e ARC (Sam, Troke et al. 2012).

Tabela 1. Hormônios e peptídeos no controle alimentar

	PEPTÍDEOS/ HORMÔNIOS	LOCAL DE MAIOR SECREÇÃO	RECEPTOR	AÇÃO NA INGESTÃO
CONTROLE HIPOTALÂMICO	NPY	ARC	Y1-Y5	Induz
	AgRP	ARC	MC3/MC4R	Induz
	POMC (α -MSH)	ARC	MC3/MC4R	Inibe
	CART	ARC	---	Inibe
	OREXINA	LH	OX1R/OX2R	Induz
CONTROLE PERIFÉRICO	LEPTINA	Tecido adiposo	LEPRb	Inibe
	INSULINA	Células β do pâncreas	IRs	Inibe
	GRELINA	Estômago	GhRS	Induz
	PP	Pâncreas	Y4	Inibe
	PYY	Células L do intestino	Y2	Inibe
	GLP-1	Células L do intestino	GLP-1R	Inibe
	CCK	Células I do intestino	CCK1 e CCK2	Inibe
	OXM	Células L do intestino	GLP-1R	Inibe

NPY: neuropeptídeo Y, AgRP: proteína relacionada à agouti, POMC: pro-ópio-melanocortina, α -MSH: hormônio estimulante de alfa-melanócito, CART: peptídeo relacionado à cocaína e à anfetamina, GLP-1: peptídeo semelhante a glucagon-1, CCK: colecistoquinina, OXM: oxintomodulina, PP: polipéptido pancreático, PYY: peptídeo YY, ARC: núcleo arqueado, LH: hipotálamo lateral (fonte: elaborado pelo autor).

Na obesidade todas essas moléculas são afetadas, por exemplo, o aumento de tecido adiposo resulta em níveis mais elevados de leptina gerando resistência à leptina (Farr, Li et al. 2016). Retardo do esvaziamento gástrico é comum em obesos devido à diminuição da secreção de CCK e dos níveis de GLP-1 e PYY, contribuindo para a fome (Naslund e Hellstrom 2007). Dietas ricas em açúcar e gorduras também contribuem para desequilíbrio da

homeostase, produzindo um perfil nos peptídeos hipotalâmicos semelhante ao observado em animais privados de alimento, induzindo consumo alimentar excessivo (Tulloch, Murray et al. 2015). Com base na complexidade do controle alimentar e sua relação com sobrepeso e obesidade muitos outros fatores relacionados ao que se pode chamar de "obesidade metabólica" poderiam ser citados (Yu, Vasselli et al. 2015). Sendo necessário o desenvolvimento de estudos que busquem uma melhor compreensão da relação entre SNC e peptídeos orexígenos/anorexígenos no desenvolvimento da obesidade.

1.3 MARCADORES BIOQUÍMICOS

1.3.1 O papel do BDNF no controle alimentar

O fator neurotrófico derivado do encefálo (BDNF, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) é membro da família das neurotrofinas responsável por desempenhar papel fundamental no desenvolvimento neuronal, atuando na diferenciação, manutenção e sobrevivência celular (Lebrun, Bariohay et al. 2006, Lu, Christian et al. 2008). Evidências recentemente sugerem que o BDNF também participa da regulação do metabolismo energético (Wang, Godar et al. 2010). A família das neurotrofinas são compostas por 4 peptídeos, fator de crescimento do nervo (NGF, do inglês *nerve growth factor*), BDNF, neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofina-4/5 (NT-4 / 5). Essas neurotrofinas têm alta afinidade por receptores específicos da classe conhecida como tirosina-quinases (trk do inglês, *tyrosine receptor kinase*), o NGF medeia os seus efeitos por meio de trkA, o BDNF ou NT-4/5 por meio de trkB, enquanto o NT-3 atua principalmente em trkC (Skaper 2012, Obianyano e Ye 2013). A forma biologicamente ativa do BDNF interage com alta afinidade em seu receptores trkB (Noble, Billington et al. 2011), ao ligar-se ao receptor específico ativa três cascatas de sinalização: proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK, do inglês *mitogen activated protein kinases*); fosfolipase Cy (PLCy do inglês, *phospholypase Cy*); e PI3K (Numakawa, Adachi et al. 2013), sendo sua ação decorrente da combinação destas vias. Outro receptor que é alvo de todas as neurotrofinas é o receptor de pan-neurotrofina (p75NTR, do inglês *neurotrophin receptor p75*) que tem como uma de suas ações a regulação da resposta a receptores trk (Foltran e Diaz 2016).

O BDNF e o receptor trkB são expressos em vários núcleos hipotalâmicos responsáveis pela regulação do apetite, como o LH, DMN, PVN e VMN. No entanto, BDNF tem maior expressão no VMN, sendo altamente sensível ao status energético (Rios 2013),

porém não é expresso no ARC. No estado de jejum, o BDNF tem sua expressão inibida no VMN. Por outro lado, no estado alimentado, a disponibilidade de nutrientes, como a glicose induz um aumento rápido da expressão de BDNF (Cordeira e Rios 2011). Estudos camundongos heterozigoto nocaute (BDNF^{+/-}), isto é, com deficiência no gene do BDNF sugerem que o BDNF desempenhe um papel crucial no controle da ingesta alimentar, mas não na regulação do gasto energético (Rios 2013). Ainda, mutações no gene do BDNF ou em seu receptor levam à obesidade grave em camundongos, o que tem sido corroborado por estudos em humanos, que associam obesidade a variações no gene do BDNF (Liao, An et al. 2012). A deleção total do gene, camundongos homozigoto nocaute (BDNF^{-/-}) é relacionada à alta taxa de mortalidade após o nascimento, porém uma eliminação parcial do gene (BDNF^{+/-}) não leva à morte, mas a hiperfagia e a um significativo aumento do ganho de peso no início da idade adulta (Waterhouse e Xu 2013). Infusões de BDNF no PVN resultam na supressão do apetite, aumento do gasto energético e bloqueio da ingestão alimentar induzida pelo NPY. Da mesma forma, a infusão de BDNF no VMN e complexo dorsal vagal (CDV) conduz a redução da ingesta energética e perda de peso (Fargali, Sadahiro et al. 2012). No entanto, redução na expressão de BDNF pós-natal em neurônios do VMN e DMN contribui para hiperfagia e obesidade em ratos (Schwartz e Mobbs 2012). Outro dado importante demonstra que animais com privação alimentar reduzem a expressão de BDNF no VMN, que é revertida pela administração de um agonista MC3/4R. Isto confirma a hipótese de que a expressão de BDNF no VMN é controlada pela sinalização de MC4R, além de pelo estado nutricional (Xu, Goulding et al. 2003). O BDNF atua modulando neuropeptídeos orexígenos e anorexígenos nos núcleos do hipotálamo, inibindo vias orexígenas e impedindo elevações na expressão do NPY induzida pelo jejum no ARC. Por outro lado, a sinalização de NPY no hipotálamo induz a diminuição da expressão do BDNF (Rios 2013). Além disso, o VMN, principal local de expressão do BDNF, recebe conexões de neurônios NPY/AgRP e POMC/CART, portanto o BDNF pode exercer efeito modulador orexígeno e anorexígeno sobre estas vias (Pandit, de Jong et al. 2011). O BDNF e seu receptor também são expressos em neurônios serotoninérgicos, envolvidos na sinalização do neurotransmissores 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Ooi, Kennedy et al. 2012). Evidências demonstram que o uso de inibidores seletivos de recaptação de 5-HT (ISRS), aumentam os níveis de BDNF em animais (Rogoz, Skuza et al. 2008) e humanos (Yoshimura, Mitoma et al. 2007), sugerindo o seu envolvimento na atividade terapêutica de fármacos antidepressivos, que apresentam, como efeito secundário, a supressão do apetite. Corroborando estes dados, a deficiência de genes do BDNF induz alterações em neurônios de 5-HT no hipotálamo, hipocampo e no córtex frontal revelando

importante papel da serotonina na obesidade e transtornos alimentares (Rosas-Vargas, Martinez-Ezquerro et al. 2011).

Além do importante papel central na regulação da ingestão alimentar, sinais periféricos como a leptina, PP, CCK, entre outros, influenciam a ação do BDNF. A administração periférica de leptina aumenta níveis de RNAm de BDNF no VMN. Comprometimento na sinalização do BDNF impede que circuitos neurais não transmitam o sinal anorexígeno enviado pela leptina, induzindo resistência à leptina e obesidade (Vanevski e Xu 2013). Os mecanismos pelo quais a leptina interage com o BDNF ainda não estão totalmente esclarecidos. Uma das hipóteses é que a interação BDNF/receptor (LepRb) gere uma cascata de sinalização que induza a expressão de BDNF no VMN. Outra possibilidade é que a produção de leptina mediada por α -MCH no ARC aumente a expressão de BDNF no VMN pelo MC4R (Rosas-Vargas, Martinez-Ezquerro et al. 2011). Já o peptídeo anorexígeno CCK aumenta a liberação de BDNF tanto no CDV como no VMN, enquanto o PP induz a expressão de BDNF no VMN (Rios 2013).

1.3.2 Obesidade e o perfil inflamatório

A obesidade caracterizada pelo excesso de tecido adiposo é considerada uma inflamação sistêmica crônica de baixo grau. A origem desta inflamação e os mecanismos moleculares subjacentes que explicam a sua ocorrência não são totalmente compreendidos (Rodriguez-Hernandez, Simental-Mendia et al. 2013). Estudo utilizando um modelo animal de obesidade induzida por dieta hipercalórica propõe que a obesidade seria uma doença inflamatória crônica iniciada no tecido adiposo relacionada à resistência à insulina (Xu, Barnes et al. 2003).

Identificado como principal órgão secretor, o tecido adiposo branco (TAB), um subtipo do tecido adiposo, é responsável por secretar substâncias com funções metabólicas ativas, como homeostase energética, resposta inflamatória e sensibilidade insulínica. Associação do metabolismo energético com sistema imune parece envolver uma complexa rede de mediadores derivados do sistema imunológico e dos adipócitos (Tilg e Moschen 2006). Evidências sugerem que citocinas inflamatórias desempenham um importante papel na obesidade e na resistência à insulina (Rodriguez-Hernandez, Simental-Mendia et al. 2013). Neste contexto, a obesidade induz inflamação crônica não apenas a partir do tecido adiposo, mas também do fígado, músculo esquelético e pâncreas e ainda pode causar um desequilíbrio da flora intestinal (Lackey e Olefsky 2016). O tecido adiposo induz a liberação de ácidos

graxos livres. Na obesidade, o pâncreas está associado a secreção de IL-1 β e diminuição da secreção de insulina; No fígado estimula a produção de citocinas pro-inflamatórias, levando à esteatose, e no músculo esquelético leva à resistência de insulina (Kershaw e Flier 2004, Gregor e Hotamisligil 2011) Figura 2. A participação do tecido adiposo visceral na inflamação e obesidade está associada a indução da liberação de citocinas que estão envolvidas no processo de regulação do metabolismo e ingestão alimentar. Um possível mecanismo da indução do processo inflamatório pela obesidade pode ser a hipóxia resultante do aumento do tecido adiposo, liberando adipocinas e dando início ao processo inflamatório pela secreção de citocinas pró-inflamatórias.



Figura 2. Figura representativa da relação entre obesidade e inflamação em diversos órgãos e tecidos (fonte: elaborado pelo autor)

As principais citocinas pró-inflamatórias envolvidas na obesidade são o TNF- α , IL-6 e IL-1 β secretadas principalmente pelo tecido adiposo (Rodriguez-Hernandez, Simental-Mendia et al. 2013). TNF- α , responsável por desempenhar um papel central na inflamação é a primeira citocina pró-inflamatória relacionada com a resistência à insulina associada à obesidade (Tzanavari, Giannogonas et al. 2010). Embora a expressão de TNF- α no TAB não seja significativa, sua secreção é modificada pela obesidade (Antuna-Puente, Fève et al. 2008). Níveis circulantes de TNF- α aumentam com obesidade e diminuem com perda de peso. TNF- α promove secreção de IL-6, outra citocina pró-inflamatória e reduz de adiponectina (Rodriguez-Hernandez, Simental-Mendia et al. 2013). Ausência de TNF- α ou seus receptores protege parcialmente a indução da obesidade por resistência insulínica (Uysal,

Wiesbrock et al. 1997) e melhora a sensibilidade à insulina em animais nocautes (Cooke, Connaughton et al. 2016).

TNF- α , juntamente com IL-6, inibem o substrato da via de sinalização dos receptores de insulina (Ueki, Kondo et al. 2004). IL-6 desempenha um importante papel no controle do apetite, além de ser expressa no tecido adiposo é expressa também em núcleos do hipotálamo responsáveis pelo controle alimentar (Stenlof, Wernstedt et al. 2003). Os níveis séricos de IL-6, são elevados em pacientes com obesidade e resistência à insulina. O mecanismo exato pelo qual a própria IL-6 contribui para a resistência à insulina não é claro, embora a desregulação da sinalização de IL-6 contribua para causar obesidade (Naugler e Karin 2008).

Adicionalmente, IL-1 β , formada a partir do seu precursor pro-IL-1 β , é ativada pelo complexo de proteínas chamado inflamassoma e está associada à resposta pro-inflamatória na obesidade (Rodriguez-Hernandez, Simental-Mendia et al. 2013). Considerada a citocina inflamatória mais potente, IL-1 β está envolvida em muitas doenças inflamatórias, além de diminuir o transporte de glicose por meio da inibição da expressão de receptor de insulina. Animais nocaute para o receptor de IL-1 β não desenvolvem intolerância à glicose induzida por dieta hipercalórica (Cooke, Connaughton et al. 2016).

Citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10, atuam no tecido adiposo de obesos e na resistência à insulina (Fujisaka, Usui et al. 2009). IL-10 é uma citocina que tem semelhanças estruturais e funcionais com a leptina. Em um estudo recente, a IL-10 regula positivamente neurônios POMC no ARC e melhora a hiperfagia, obesidade e diabetes causada pela deficiência de leptina (Nakata, Yamamoto et al. 2016). A adiponectina induz a expressão de IL-10 em macrófagos humanos e apresenta efeitos anti-aterogênicos mediados pela IL-10 (Volp, Alfenas Rde et al. 2008). A IL-10 pode exercer importante ação anti-inflamatória no sistema nervoso central. Infusão de IL-10 diretamente no hipotálamo reduziu a ingestão de alimentos em animais obesos e aumentou a sensibilidade à leptina e insulina nos neurônios dessa região (Ropelle, Flores et al. 2010).

1.4 ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA E COMPORTAMENTO ALIMENTAR

Técnicas de estimulação cerebral não invasiva alteraram a atividade neural por meio da aplicação de agentes magnéticos e elétricos. Entre essas técnicas destacam-se a estimulação magnética transcraniana (EMT) que utiliza campos magnéticos e a estimulação

transcraniana por corrente contínua (ETCC) que modula atividade neuronal empregando campos elétricos (Johnson, Lim et al. 2013).

ETCC é uma técnica de neuromodulação que utiliza correntes elétricas fracas e contínuas no tecido neuronal através do couro cabeludo, induzindo alterações na excitabilidade cortical de acordo com os parâmetros de estimulação (Fregni e Pascual-Leone 2007). Uma corrente de 0,5-2 mA é aplicado durante um período de 10-20 minutos, utilizado eletrodos embebidos em solução salina. O efeito da ETCC é determinado pela posição dos eletrodos, a estimulação anódica provoca a polarização de neurônios (aumenta a excitação), enquanto a estimulação catódica hiperpolariza os neurônios (diminui a excitação) (Rosen, Ramkumar et al. 2009). Quando a ETCC é aplicada em superfícies maiores, como o córtex cerebral humano, a corrente passa do cátodo, polarizado negativamente, para o ânodo, polarizado positivamente (Johnson, Lim et al. 2013), já em encéfalos menores como o de roedores esta estimulação é considerada bimodal (Cioato, Medeiros et al. 2016, Macedo, de Oliveira et al. 2016) Figura 3. ETCC é considerada uma técnica segura apresentando baixo risco, sem efeitos adversos graves ou lesões irreversíveis, mesmo com aplicações repetidas (Bikson, Grossman et al. 2016). Os efeitos da ETCC são observados também em áreas subcorticais interconectadas e não apenas em áreas corticais situadas abaixo dos eletrodos (Polania, Paulus et al. 2012). Além disso, estudos de nosso grupo de pesquisa com ratos demonstraram efeitos do tratamento ETCC na hiperalgesia induzida por modelos de estresse crônico (Spezia Adachi, Caumo et al. 2012), em modelo de dor neuropática (Cioato, Medeiros et al. 2016), na inflamação crônica (Laste, Caumo et al. 2012) e no *craving* desencadeado por alimento altamente palatável (Macedo, de Oliveira et al. 2016).

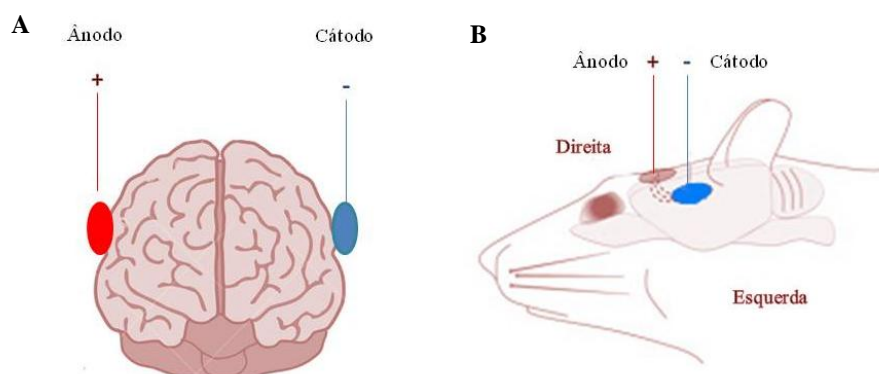


Figura 3. Representação da aplicação de ETCC em humanos e ratos. Estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC). A. ETCC anódica no córtex humano; B. ETCC anódica em córtex de rato. ETCC utiliza um ânodo e um cátodo ligado a uma fonte de corrente contínua (Fonte: A. elaborada pelo autor; B. com autorização (Macedo, de Oliveira et al. 2016).

Tratamento com ETCC tem sido empregado em várias patologias como a dor crônica (Antal, Terney et al. 2010) e transtornos neuropsiquiátricos como epilepsia (Liebetanz, Klinker et al. 2006) e depressão (Boggio, Berman et al. 2007). Recentemente tem sido aplicada com sucesso no tratamento de alterações no comportamento alimentar, com principal alvo o córtex pré-frontal dorso lateral (CPFDL), uma região que está diretamente relacionada com funções cognitivas e a tomada de decisão. O mecanismo de ação da ETCC nestas situações pode estar relacionado a modulação do sistema de recompensa e ao comportamento de adição (Val-Laillet, Aarts et al. 2015). Os efeitos da ETCC não são totalmente compreendidos na diminuição do *craving* por alimentos (Macedo, de Oliveira et al. 2016) ou por substâncias de abuso, porém sugere-se que o CPFDL possa estar envolvido pelo envolvimento desta área cortical em transtornos alimentares como bulimia e anorexia nervosa (Sauvaget, Trojak et al. 2015).

Estudos com humanos saudáveis demonstraram que ETCC anódica (ânodo direita/cátodo esquerda) no CPFDL suprimiu o desejo por alimentos (Fregni, Orsati et al. 2008, Goldman, Borckardt et al. 2011, Kekic, McClelland et al. 2014) e em participantes com excesso de peso a ETCC no CPFDL associada a exercícios aeróbicos diminuiu a sensação de apetite, (Montenegro, Okano et al. 2012). Já um estudo mais longo, 8 dias de ETCC foi capaz de reduzir 14% do consumo de calorias em comparação com a estimulação sham (Jauch-Chara, Kistenmacher et al. 2014).

Consistentes com resultados em humanos um estudo de nosso grupo de pesquisa, utilizando estimulação bimodal cortical reduziu o consumo de alimentos palatáveis 24 horas após a última sessão de ETCC em ratos (Macedo, de Oliveira et al. 2016) demonstrando o efeito da ETCC sobre o *craving* por alimentos palatáveis.

ETCC aplicada ao CPFDL pode exercer efeitos sobre o sistema de recompensa modulando vias dopaminérgicas e melhorando o controle cognitivo (Sauvaget, Trojak et al. 2015). O emprego ETCC em humanos ou em modelos animais tem auxiliado no controle alimentar, no entanto os mecanismos envolvidos na neuromodulação exercidos pela ETCC carecem de elucidação. Considerando a importância de um melhor entendimento dos efeitos da ETCC em alterações alimentares e mecanismos moleculares em regiões corticais, assim como marcadores bioquímicos reforçam a necessidade de estudos em modelos animais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da exposição à estimulação transcraniana por corrente contínua em ratos submetidos à modelo de obesidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- verificar o ganho de peso ao longo do tempo (delta de peso) e índice de Lee;
- avaliar o peso relativo do fígado e do tecido adiposo visceral;
- avaliar a atividade locomotora (teste de campo aberto) e o comportamento do tipo ansioso (teste do labirinto em cruz elevado);
- avaliar o comportamento alimentar (teste do alimento palatável);
- mensurar os níveis de BDNF em córtex cerebral;
- mensurar os níveis de TNF- α , IL-10, IL-1 β em córtex cerebral.

3 ARTIGO

**TRANSCRANIAL DIRECT CURRENT STIMULATION (tDCS)
MODULATES BIOMETRIC AND INFLAMATORY PARAMETERS, AND
ANXIETY-LIKE BEHAVIORAL IN OBESE RATS**

Periódico: Brain Stimulation

Status: a ser submetido

**TRANSCRANIAL DIRECT CURRENT STIMULATION (tDCS)
MODULATES BIOMETRIC AND INFLAMMATORY PARAMETERS, AND
ANXIETY-LIKE BEHAVIORAL IN OBESE RATS**

Joice Soares^{1,2,3}, Isabel Cristina de Macedo^{1,2,3}, Ellen de Almeida Nunes^{2,3}, Jonnsin Kuo, Daniela Silva dos Santos, Andressa de Souza^{1,2,3}, Felipe Fregni⁴, Wolnei Caumo¹, Iraci L.S. Torres^{1,2,3*}.

¹Graduate Program in Biological Sciences – Pharmacology and Therapeutics, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

²Laboratory of Pain Pharmacology and Neuromodulation: Preclinical Researchs, Pharmacology Department, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

³Animal Experimentation Unit, Graduate Research Group, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-003 Porto Alegre, Brazil

⁴Harvard Medical School. Berenson-Allen Center for Noninvasive Brain Stimulation, Department of Neurology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, United States of America.

Conflict of Interest. There was no financial interest between any of the authors or any commercial interest in the outcome of this study.

* Corresponding author:

Iraci Lucena da Silva Torres

Departamento de Farmacologia – ICBS, UFRGS

Rua Sarmiento Leite, 500 – sala 202

90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: 0055-51 3316 3183; FAX: 0055-51 3316 3121

E-mail:

e-mail: iltorres@hcpa.edu.br

ABSTRACT

Background: Obesity is a multifactorial disease associated to metabolic dysfunction and chronic disease development, such as diabetes and cardiovascular disorders. The prevention and treatment of obesity are often unsatisfactory. The transcranial direct-current stimulation (tDCS) is a brain stimulation noninvasive technique promising as adjuvant in the treatment of eating disorders such as obesity.

Objective/Hypothesis: We evaluated the tDCS effects on locomotor and exploratory activities and the anxiety-like and feeding behaviors, and BDNF, IL-10, IL-1 β and TNF- α levels in cerebral cortex of obese rats.

Methods: After 40 days of hypercaloric diet and before exposure to tDCS treatment, rats were exposed to the open field (OF) to assess the locomotor and exploratory activities and anxiety-like behaviors were assessed by elevated plus maze (EPM). The experimental groups were submitted to active or sham treatment tDCS for eight consecutive days. Twenty-four hours after the last session ETCC the animals were again exposure to EPM and OF tests. In the next day, a palatable food consumption test (PFT) was performed at baseline and on treatment completion (24 h after the last tDCS session) under fasting and feeding conditions. 24 hours after PFT, the rats were killed. The level of BDNF, IL-10, IL-1 β , and TNF- α in the cerebral cortex were determined by ELISA test.

Results: The animals that received hypercaloric diet submitted to bicephalic tDCS treatment presented reduction in the obesity parameters (Lee index and visceral adipose tissue weight), and decreased food craving. In addition, bicephalic tDCS decreases the cerebral cortex levels of IL-1 β and TNF- α in the animal submitted to hypercaloric diet. The exposure to hypercaloric diet induced an increase in the exploratory activity demonstrating an anxiolytic effect. This effect is reversed by bicephalic tDCS treatment.

Conclusions: These results demonstrated that bicephalic tDCS can modulate biometric parameters and inflammatory, as well as feeding behavior and anxiety in rats subjected to the consumption of hypercaloric diet, corroborating human studies.

Keywords: BDNF; cytokines; feeding behavior; hypercaloric diet; obesity.

INTRODUCTION

Currently millions of people die from the consequences of overweight, and obesity worldwide and its prevention and treatment are unsatisfactory [1]. Metabolic changes resulting from overweight or obesity contribute to the co-morbidities development such as heart diseases, hypertension, liver and pancreas disease [2, 3]. These comorbidities can be linked to low-grade inflammation found on obesity, with a significant expression of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6), and a reduction of anti-inflammatory cytokines, such as interleukin 10 (IL-10) [4]. In addition, obesity has also been associated with emotional disorders in humans and rodents [5, 6]. Studies show that rising obesity rates are closely related to the dramatic increase in the consumption of highly palatable and caloric foods [7, 8].

In this regard, the cafeteria diet has been widely used to induce obesity in rodents. This diet has a high content of sugar and fat is rich in highly palatable foods, it induces hyperphagia, leads to increased body weight, and alters metabolic factors [6, 9-11]. On other hand, consumption of palatable foods, which are highly obesogenic, reduces anxiety and stress response [12, 13]. These effects can trigger a search behavior for this type of food like addition [8, 14]. In rodents, the cafeteria diet contributes directly to adipose tissue and liver inflammation [10]. Release of inflammatory cytokines resulting from obesity can change the permeability of the blood-brain barrier by modifying the brain homeostasis, triggering neurodegenerative diseases and neuroinflammation. While these inflammatory mediators expressed in the central nervous system (CNS) may modulate energetic metabolism and food intake [15].

Other important mediator related to energy metabolism and the control of food intake is the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a neurotrophin involved in synaptic plasticity [6, 16, 17]. Mutations in genes encoding the BDNF receptor tyrosine kinase receptor (TrkB) lead to hyperphagia and obesity, and while the central infusion of BDNF in rodents leads to increased satiety and reduction of the weight gain [18]. Low levels of BDNF were associated to hypothalamic $\alpha 2\delta$ thrombospondin-1 receptor dysfunction; this receptor is required for normal function of BDNF in rats. The dysfunction of this receptor appears to contribute to increased food intake and weight gain, suggesting a central mechanism mediating the inhibitory effects of BDNF [19].

The transcranial direct current stimulation (tDCS) is a non-invasive neuromodulator technique, which has been investigated in the control of abuse substance [20-23], and food

intake [8, 24]. These tDCS effects can be directly related cortical areas linked to decision-making [25]. The prefrontal dorsolateral cortex (DLPFC) is responsible for mediating the decision-making behavior involved the mechanism of food reward [24]. Thus, binge eating triggers neuroendocrine changes very similar to the addition of abuse drugs. Obese patients undergoing bariatric surgery may have a relapse and behavioral recovery of similar weight to the behavior observed in addicted individuals [26]. The tDCS application uses a low and continuous current that alters the excitability cortical, promoting depolarization (anodal) or hyperpolarization (cathodal) membrane [27, 28]. Human studies have shown that applying tDCS (direct anode / cathode left) in the DLPFC reduces the food craving in the healthy individuals [24, 29]. In addition, previous study of our research group showed decrease the craving for food in rats, confirming previous data with humans [8]. Thus, considering that there is little information about the brain mechanisms involved the effects of tDCS on food consumption, the aim of this study was to evaluate the effects of tDCS on obesity in the biometric, behavioral and neurochemical parameters of rats. The behavioral parameters evaluated were exploratory and locomotor activities, anxiety-like behavioral and behavior preference for sweet food. The neurochemical parameters evaluated were brain-derived neurotrophic factor (BDNF), IL-10, interleukin 1 beta (IL-1 β) and TNF- α levels in cerebral cortex.

METHODS

Animals

In this study were used 40 naïve adult male Wistar rats (60 days old; weighing 200–250 g). Rats were randomized by weight and housed in polypropylene home cages (49 cm \times 34 cm \times 16 cm). The animals were maintained on a standard 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m. and lights-off at 7:00 p.m.), in a temperature-controlled environment (22 ± 2 °C), with access to water and chow *ad libitum* (hypercaloric diet and/or standard chow diet). All experiments and procedures were approved by the Institutional Committee for Animal Care and Use (GPPG-HCPA protocol No. 110455). The procedures for the scientific animals use were realized conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 8th edn. 2011, and law 11.794 (Brazil). The experimental protocol complied with the ethical and methodological standards of the ARRIVE guidelines [30]. The experiment used the number of animals necessary to produce reliable scientific data.

Experimental Design

The rats were divided in three or four animals per cage and acclimated to the maintenance room for one week before the experiment began. After the acclimation period, the animals were randomly selected for weight and length measurements and subsequently allocated into four groups (n = 10/group): standard diet plus sham tDCS treatment (SDS), standard diet plus tDCS treatment (SDT), hypercaloric diet plus sham tDCS treatment (HDS), hypercaloric diet plus tDCS treatment (HDT). The animals were weighed weekly for all experimental time. Before exposure to bicephalic tDCS treatment, the rats were exposed to the open-field apparatus (OF) and elevated plus-maze (EPM) to locomotor and exploratory activities and anxiety-like behavior evaluations, respectively. Subsequently, the experimental groups received active or sham tDCS treatment for 20 minutes for day for eight consecutive days. OF and EPM tests were repeated 24 hours after the last tDCS session. In the next day, the animals were exposure to two test sessions palatable food (PFT). The rats were killed 24 hours after the PFT (Figure 1).

Insert Figure 1

Blinding

To control for possible measurement bias, a number of steps were taken. The hair of all animals were shaved in the area of electrode placement. In addition, the researchers responsible for the behavioral ratings were blinded to the numbers assigned to the test boxes, which was done by a third researcher. Therefore, it was impossible for the investigators to distinguish the groups receiving active tDCS treatment from the sham and control groups. Two researchers conducted the behavioral tests. Three researchers analyzed the results; importantly, these evaluators were unaware of the experimental protocol. Thus, it is believed that were eliminated the possibilities of influence on behavior results.

Experimental diets

The standard rat chow (Nuvilab CR-1, NUVITAL®, Curitiba, PR, Brazil) provided an energy content of 2.93 kcal/g (information provided by the manufacturer), and is composed of 55% carbohydrates, 22% protein, 4.5% lipids, and other constituents (fiber and vitamins) and the hypercaloric diet (cafeteria diet) totaled 4.186 kcal/g and 0.42 kcal/mL (calculated based on information provided by the manufacturer on the package label) consists of approximately 60% carbohydrates, 20% lipids, 15% protein, and 5% other constituents (sodium, calcium, vitamins, preservatives, minerals, etc.). The hypercaloric diet was chosen because it mimics modern patterns of human food consumption and has been used successfully in experimental studies to induce obesity in lean animals [31, 32]. This particular diet was adapted from the hypercaloric diet or Western diet previously described by Estadella et al. [31]. Foods included in the hypercaloric diet were crackers, sausages, snack foods, wafers, condensed milk and soda. The experimental diet was replaced daily with fresh food, as was the standard diet. Animals exposed to the hypercaloric diet also had access to standard food and water.

Transcranial direct current stimulation (tDCS)

After 5 weeks of diet hypercaloric, the animals in the real treatment groups underwent a 20 min diary of bicephalic tDCS every afternoon for 8 days, as described by Macedo et al. [8]. The electrodes were then positioned, fixed to the head with surgical tape (Micropore™) and covered with a protective mesh to prevent removal. A constant direct current of 0.5 mA was delivered from a battery- powered stimulator using electrocardiogram electrodes with conductive adhesive hydrogel. The rats' heads were shaved for firmer adherence and the electrodes were trimmed to 1.5 cm² for better fit. The electrodes were placed on the scalp to emulate the tDCS method used in human food craving studies [24]. The treatment target was the DLPFC, because modulation of this area has been shown to reduce both smoking and food craving [33, 34]; moreover, other studies suggest that DLPFC activity is associated with food craving [35]. The center of the anodal electrode was placed on the right DLPFC and the cathode on the left side DLPFC [8] (Fig. 2), to mimic the anodal placement in human studies in which stimulating the DLPFC modifies food craving. According to an earlier animal safety study [36], a current density higher than 142.9 A/m² is associated with brain lesions. Considering this threshold, our stimulation parameters resulted in a current density of 33.4 A/m². For sham stimulation, the electrodes were placed and fixed in the same position as for

actual stimulation; however, the stimulator remained in the “off” position throughout the procedure [8]. In order to deliver the current, animals had to be immobilized with the use of a cloth for the total time of stimulation. This protocol, such as the intensity and period of stimulation are in accordance with studies in our group where presented behavioral and neurochemical effects in rats [37-40].

Insert Figure 2

Weight parameters

The animals were weighed weekly, and the weight delta was defined as the difference between final and baseline weights. At the end of the experiment, the naso-anal length (cm) of the animals was measured to determine the Lee index. This index, which was adapted from Bernardis and Cols, corresponds to the ratio between the cube root of the body weight (g) and the naso-anal length (cm) of the animals multiplied by 1000 [41].

Open-field test

To assess the locomotor and exploratory activities, the open field test was carried out; the apparatus was a varnished wooden cage (60 × 40 × 50 cm) with a front glass wall. The linoleum floor was divided by black lines in twelve 13 × 13 cm square. Each trial began immediately after the animals were placed in the left rear corner and allowed to explore surroundings for 5 min [42, 43]. After the end of each trial, the box was cleaned with 70% alcohol, and then water to remove any animal scent. Three measures were evaluated during the test: (1) the total number of crossings, (2) number of occurrences of rearing behavior (i.e., vertical activity) and (3) latency to leave the first quadrant (in seconds). The number of line crossings (all paws crossing the boundary a marked-out area adjacent) was taken as a measure of locomotor activity [44]. The latency to exit the first quadrant was considered as an anxiety-like behavior [45]. The amount of time that the animals dedicated to education (standing on hind legs) [46] was used to evaluate exploratory activity [43, 47].

Elevated plus-maze test

The elevated plus maze test was used mainly to assess anxiety-like behaviors. The elevated plus maze apparatus consisted of two closed arms ($50 \times 40 \times 10$ cm), which extended from a common central platform (10×10 cm) and elevated 50 cm above the floor. The animal was placed in the EPM central area facing one of the open arms. During a 5-min session, the following behavioral measures were recorded: (1) number of non-protected head-dipping movements (NPHD); (2) total time spent in the open arms (TOA), (3) total time spent in the closed arms (TCA) and (4) number of open arm entries (EOA). Non-protected head-dipping movements were considered to occur when the animal dipped its head over the sides of the maze while in an open arm. In the EPM, entering a new area was counted when all four paws crossed into the new arm or the central area [47]. After each test, the apparatus was cleaned to remove any scent from the previously tested rat.

Palatable food consumption test

All animals had access to palatable food for five days for 3 min to an adaptive process to new diet. For this purpose, the rats were placed on an illuminated rectangular box ($40 \times 15 \times 20$ cm) with floors and wooden walls and a roof glass, and 10 Froot Loops (Kellogg's®-pellets wheat and corn starch, and sucrose) were placed at one end of the box. Forty-eight hours after the learning period all animals were subjected to two test sessions of 3 minutes in the same rectangular box, when the number of ingested beads was recorded. To one of the test sessions, the rats were fasted for 22 hours prior to behavioral task (post-fasting test), while for the other they were fed *ad libitum* (post-feeding test). A protocol so that when the pellets were partially consumed (for example, 1/3 or 1/4) this fraction was counted been established [8, 48].

Tissue collection

The animals were killed by decapitation 24 hours after the completion of the test palatable food. The cortex was removed and frozen at -80°C for subsequent analysis. The relative weight of the liver and visceral adipose tissue were dissected manually and were weighed using a semi-analytical balance. The data were expressed as grams of tissue per 100 g of body weight (weight tissue/body weight $\times 100$).

Biochemical assays

BDNF of IL-10, IL-1 β and TNF- α levels were determined by ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay test) sandwich using monoclonal antibodies specific for IL-1 β , IL-10, TNF- α and BDNF (R & D Systems, Minneapolis, USA). Total protein was measured by Bradford method using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

Normality was verified for all variables using the Shapiro–Wilk test and parametric test and nonparametric were used to analyze data with or without normal distribution. The weight delta, Lee index, tissue weight, cytokines and BDNF concentration were analyzed with using one-way ANOVA followed by Student Newman-Keuls test post hoc correction for multiple comparisons. Data from OF and EPM tests did not show normal distribution and were analyzed using the Kruskal–Wallis test followed by the post hoc Dunn's test analysis for the analysis pre-treatment and post-treatment individually to compare pre-treatment and post-treatment was used the Wilcoxon test. Palatable food consumption it was analyzed using the Kruskal–Wallis test. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.) (parametric data) or median \pm interquartile range (nonparametric data). Statistical significance was defined for $P < 0.05$. The data were analyzed statistically using the SPSS software version 20 (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTS

Assessment of the weight parameters: delta weight and Lee index

The animals that consumed the hypercaloric diet presented an increase in the delta weight (HDS and HDT groups) and Lee index (HDS group), confirming the obesity induction (one-way ANOVA, $F_{(3,36)} = 7.48$, $P < 0.05$; Figure 3- panel A; $F_{(3,36)} = 4.61$, $P < 0.05$; Figure 3- panel B, respectively). These results demonstrated that the bicephalic tDCS treatment reverts the Lee index increase, become the HDT group similar to groups that received standard diet.

Insert Figure 3 - Panel A and Panel B

Assessment of the relative tissue weights: liver, visceral adipose tissue

An increase in the relative liver weight was observed in hypercaloric diet groups (one-way ANOVA, $F_{(3,36)} = 5.98$, $P < 0.05$; Figure 4 – panel A). The hypercaloric diet increased of visceral adipose tissue weight in sham animals (HDS) (one-way ANOVA, $F_{(3,23)} = 5.89$, $P < 0.05$; Figure 4 – panel B), and this effect was reverted by bicephalic tDCS exposure.

Insert Figure 4 - Panel A and Panel B

Effect of tDCS on locomotor and exploratory activities and anxiety-like behavioral parameters

The OF test showed no significant difference between the groups before and after applying tDCS in total number of crossings, number of rearing behavior and latency to leave the first quadrant (Kruskal–Wallis test, pre-treatment: $\chi^2 = 2.27$, $\chi^2 = 5.57$ and $\chi^2 = 5.13$, respectively, $P > 0.05$ and post-treatment: $\chi^2 = 2.91$, $\chi^2 = 6.31$ and $\chi^2 = 1.65$, respectively, $P > 0.05$; see supplementary material Table 3). But, when comparing intra group pre and post tDCS treatment, there is significant difference in total number of crossings; the animals fed standard diet (SDS and SDT) had a decrease in the number of rearing (Wilcoxon test, $Z = -2.80$ and $Z = -2.39$, respectively, $P < 0.05$; Table 1), and the active tDCS group (SDT) presented a decrease in latency to leave the first quadrant (Wilcoxon test, $Z = -2.69$, $P < 0.05$; Table 1). The last effect also was observed in the HD groups (HDS and HDT) (Wilcoxon test, $Z = -2.61$ and $Z = -2.81$, respectively, $P < 0.05$; Table 1). The test EPM showed no significant difference between the groups before treatment with tDCS in the NPHD, TOA, TCA and EOA parameters (Kruskal–Wallis test, pre-treatment: $\chi^2 = 2.98$, $\chi^2 = 4.45$, $\chi^2 = 2.77$ and $\chi^2 = 3.41$, respectively, $P > 0.05$; see supplementary material Table 4). However, in the post-treatment analysis HDS group showed increased NPHD and decreased TCA compared to SDS group (Kruskal–Wallis test, post-treatment: $\chi^2 = 11.04$, $\chi^2 = 8.76$, respectively, $p < 0.05$;

see supplementary material Table 4), suggesting anxiolytic effect of the hypercaloric diet. There were not significant differences for TOA and EOA between groups (Kruskal–Wallis test, $\chi^2= 5.55$, $\chi^2= 3.77$, respectively, $P >0.05$; see supplementary material). However, comparing pre and post tDCS treatment, the HDS group presented an increased NPHD, TOA, EOA, and decreased TCA (Wilcoxon test, $Z= -2.11$, $Z= -2.80$, $Z= -2.56$ and $Z= -2.19$, respectively, $P <0.05$; Table 2), but this effect was not observed in group active tDCS (HDT) (Wilcoxon test, $P >0.05$ for all, Table 2).

Table 1

Table 2

Effect of tDCS on palatable food test

In the PFT test, the bicephalic tDCS treatment did not alter food consumption in the first phase of the test (post-feed) (Kruskal–Wallis test, $\chi^2= 3.54$, $P >0.05$; Figure 5- Panel A), but there is decrease in the consumption in the second phase of the test (after fasting) HD group (HDT) (Kruskal–Wallis test, $\chi^2= 8.87$, $P <0.05$; Figure 5- panel B) in relation the sham treatment (HDS).

Insert Figure 5 - Panel A and Panel B

Effect of tDCS on central BDNF, IL-10, IL-1 β and TNF- α levels

There is decreased of BDNF levels in the HD group (HDS and HDT) compared to standard diet groups (SDS and SDT) (one-way ANOVA, $F_{(3,36)}= 10.96$, $P <0.05$; Figure 6 – Panel A). IL-10 levels decreased in the hypercaloric diet groups (one-way ANOVA, $F_{(3,35)}= 7.89$, $P <0.05$; Figure 6 – Panel B). However, The pro-inflammatory cytokines levels (IL-1 β and TNF- α) decreased in HDT group (one-way ANOVA, $F_{(3,36)}= 3.62$ and $F_{(3,35)}= 5.91$,

respectively, $P < 0.05$; Figure 6- Panel C and D) compared to the other groups suggesting effect of tDCS state dependent, since the reduction occurs only in animals receiving hypercaloric diet and became obese.

Insert Figure 6 - Panel A, B, C, and D

DISCUSSION

In this study we showed that bicephalic tDCS treatment reverses the increase in the Lee Index and relative visceral adipose tissue weight and it reduces post-fasting intake of palatable food of the animals that received hypercaloric diet. In addition, bicephalic tDCS treatment induced to decrease latency to leave the first quadrant in animals receiving a standard diet. Moreover, the animals exposed to hypercaloric diet exposure presented a decrease in the levels of BDNF and IL-10, and the association with bicephalic tDCS treatment decreased IL-1 β and TNF- α levels in cerebral cortex. Then, we can suggest that effect of tDCS treatment has animal state specific effect in the biometrics, behavior and inflammatory mediators, since its effects are different according to diet type the animals were submitted.

It is important highlight that for tDCS technique to be applied without the use of anesthetics is necessary submitted the animal to restraint. Thus, aimed to avoid the restraint stress bias in our study, we insert in the SHAM group, which the animals were restrained during 20 minutes, the electrodes were positioned on the head, but the stimulator was turned off. In this way, before exposure to bicephalic tDCS treatment, the groups were exposure to behavior apparatus and all groups were homogeneous in relation to behavior parameters.

Comparing pre and post bicephalic tDCS treatment (intra group), the hypercaloric diet groups presented an increase in the EOA and NPHD in the EPM. These results can be indicated an anxiolytic-like effect of hypercaloric diet, that was reverted by tDCS treatment. In addition, the restraint exposure decreases the time latency to leave the first quadrant in the open field test in these animals; however the tDCS treatment is not able to reverse this effect.

After tDCS treatment, in the inter group comparisons, the animal exposure to restraint and standard diet showed a decrease in the rearing in the open field test, and this effect was not reverted by active tDCS treatment. Hypercaloric diet exposure increased NPHD and reduces TCA compared to standard diet groups, corroborating the anxiolytic effect already

observed in the intra group's analyses. These results suggest that hypercaloric diet may be attenuating the restraint stress effect required to tDCS technique application. It is known that acute or chronic stress can cause changes in food control [49], and palatable foods may decrease the stress response of rats [50]. Recent study from our research group showed that exposure to chronic stress increases the anxiety-like behavior and this effect is reversed by hypercaloric diet consumption [51, 52].

Stress, combined with overeating and sedentarism, can lead to overweight, and abdominal obesity, which is related to higher waist-to-hip-ratio and body mass index (BMI). In addition, previous study showed a relationship between energetic supply of the brain and body weight regulation [53]. Human's study suggests that tDCS can modulate brain energy in the DLPFC, reducing body weight [54]. In this study, bicephalic tDCS treatment reverts the increase of Lee index and the visceral adipose tissue weight induced by hypercaloric diet. Thus, these data demonstrate that tDCS is able to reduce obesity parameters. In this way, tDCS can be a non-pharmacology tool in metabolic diseases treatment.

In addition, a diet high in fat and sugar can trigger an irresistible motivation for consumption known as "food craving". Recent study from our research group showed that tDCS reduces palatable foods craving in rats [8] corroborating humans' study [24, 26]. In present study, the bicephalic tDCS decreases food intake after fasting (HD group) in relation the sham treatment (HDS). The molecular mechanisms by which repeated tDCS reduces the food craving is not established. It is known that the consumption of highly palatable foods can trigger binge eating, similar to compulsive drug mechanisms [55]. These highly palatable foods high in sugars activate the reward system, modified eating behavior [56, 57]. The DLPFC, an important area of the brain responsible for motivation and decision-making, has been investigated in the treatment for addiction and compulsion. Studies have shown that DLPFC plays an important role in taste [58-60]. In addition, the repeated application of tDCS in DLPFC reduces the food craving [24, 34], the consumption of alcohol [61], the nicotine and smoking craving [62]. The tDCS modulates dopaminergic pathways by cortical stimulation [63], and palatable food intake acts way mesolimbic dopamine system that has an important role in reward circuits [64].

Obesity results in a low-grade inflammatory state with increased fat, particularly visceral fat, which contributes to metabolic and body weight controls. This low-grade inflammatory state also produces effects in other regions, such as the liver, pancreas, and brain [65]. Previous studies describe some metabolic changes induced by obesity and brain sensitivity to these changes [66-68]. Corroborated previous studies, the present study showed

that hypercaloric diet intake is associated with decrease in the BDNF levels in the cerebral cortex [69, 70]. In addition, we showed that hypercaloric diet exposure also reduces IL-10 cortical levels. BDNF is a neurotrophin responsible for cell survival, and synaptic plasticity [71, 72], and IL-10 may play an important anti-inflammatory action in the central nervous system [73]. It has been demonstrated that IL-10 hypothalamic infusion inhibits inflammatory action in this brain region of obese rats, contributing with caloric intake decreased and control of energy balance [74]. Our data corroborated previous studies that showed that in the obesity process occurs a decrease of anti-inflammatory, but we are able to show an increase of pro-inflammatory interleukins [75, 76]. Hypercaloric diet does not increase pro-inflammatory interleukin central levels; it can be explained due adaptative process to maintain the CNS homeostasis. In addition, it is possible that these effects were related to diet type and exposure time. Interestingly it was observed that the tDCS decreased IL-1 β and TNF- α levels in the HD groups em relation to SD groups. The role of TNF- α is complex, has pleiotropic effects and may have positive and negative effects on the brain [15]. Highlight that bicephalic tDCS decrease pro-inflammatory interleukins levels the only in altered state, as obesity. The mechanisms by which the tDCS exerts its effects are not fully understood.

It is important to highlight that, this study has some limitations, including difficulty employment of tDCS technique due to the small size of the rat head that contributed to the designation of "treatment tDCS bicephalic", as well as the lack of evaluation of other structures involved in feeding behavior and the reward system. Future studies, based on results obtained in this work, will include the evaluation of specific brain structures, including the frontal cortex, brainstem, striatum and nucleus accumbens. Such as, it will be to evaluate the dopamine central levels and receptors expression that are directly related to the reward system.

This study demonstrates that bicephalic tDCS treatment is effective in reducing the food craving in obese animals after fasting, as demonstrated in animals [6] and humans studies [24]. In addition, it reverts the increased Lee index and the weight of visceral adipose tissue in these animals. Furthermore, it was found that exposure to hypercaloric diet decreases BDNF and IL-10 in the cortex. On the other hand, bicephalic tDCS treatment reduces IL-1 β levels and TNF- α in the cortex. Exposure to hypercaloric diet induced anxiolytic effect that was reversed by treatment with tDCS. Therefore, exposure to repeated treatment with tDCS appears to act in pathways related to eating behavior modulating changes neuroplastic obesity features. The mechanism by which the tDCS inhibits the fod craving in animals and humans,

probably involving neurobiological processes linked with reward and motivation decision-making [77].

CONCLUSION

In conclusion, the present study demonstrates that bicephalic tDCS can modulate biometric and inflammatory parameters, as well as feeding and like-anxiety behaviors in rats submitted to hypercaloric diet intake, corroborating human studies. In addition, these data provides a better understanding of the effects of tDCS in the prevention or treatment of obesity and food craving. In this way, tDCS can be a non-pharmacology tool in metabolic diseases treatment.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the following Brazilian funding agencies: the National Council for Scientific and Technological Development, CNPq (I.L.S. Torres, W. Caumo, E. A. Nunes, J.S. Freitas); Grant Doc-Fix FAPERGS/CAPES/09-2012 (I.C. de Macedo); Graduate Research Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, GPPG (I.L.S. Torres, grant 11-0455).

References

1. Bastien M, Poirier P, Lemieux I, Despres JP. Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 2014;56:369-81.
2. Bluher M. Are metabolically healthy obese individuals really healthy? *Eur J Endocrinol* 2014;171:R209-19.
3. Lanza JF, Caimari A, del Bas JM, Torregrosa D, Cigarroa I, Pallas M, et al. Effects of a post-weaning cafeteria diet in young rats: metabolic syndrome, reduced activity and low anxiety-like behaviour. *PLoS One* 2014;9:e85049.
4. Wang X, Cheng M, Zhao M, Ge A, Guo F, Zhang M, et al. Differential effects of high-fat-diet rich in lard oil or soybean oil on osteopontin expression and inflammation of adipose tissue in diet-induced obese rats. *Eur J Nutr* 2013;52:1181-9.
5. Kittel R, Brauhardt A, Hilbert A. Cognitive and emotional functioning in binge-eating disorder: A systematic review. *Int J Eat Disord* 2015;48:535-54.
6. Macedo IC, Rozisky JR, Oliveira C, Oliveira CM, Laste G, Nonose Y, et al. Chronic stress associated with hypercaloric diet changes the hippocampal BDNF levels in male Wistar rats. *Neuropeptides* 2015;51:75-81.
7. Gumbs MC, van den Heuvel JK, la Fleur SE. The effect of obesogenic diets on brain Neuropeptide Y. *Physiol Behav* 2016;162:161-73.
8. Macedo IC, de Oliveira C, Vercelino R, Souza A, Laste G, Medeiros LF, et al. Repeated transcranial direct current stimulation reduces food craving in Wistar rats. *Appetite* 2016;103:29-37.
9. Macedo IC, Medeiros LF, Oliveira C, Oliveira CM, Rozisky JR, Scarabelot VL, et al. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides* 2012;38:189-96.
10. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 2011;19:1109-17.
11. Cigarroa I, Lanza JF, Caimari A, Del Bas JM, Capdevila L, Arola L, et al. Treadmill Intervention Attenuates the Cafeteria Diet-Induced Impairment of Stress-Coping Strategies in Young Adult Female Rats. *PLoS One* 2016;11:e0153687.
12. Zeeni N, Bassil M, Fromentin G, Chaumontet C, Darcel N, Tome D, et al. Environmental enrichment and cafeteria diet attenuate the response to chronic variable stress in rats. *Physiol Behav* 2015;139:41-9.
13. de Oliveira C, Scarabelot VL, de Souza A, de Oliveira CM, Medeiros LF, de Macedo IC, et al. Obesity and chronic stress are able to desynchronize the temporal pattern of serum levels of leptin and triglycerides. *Peptides* 2014;51:46-53.

14. Pivarunas B, Conner BT. Impulsivity and emotion dysregulation as predictors of food addiction. *Eat Behav* 2015;19:9-14.
15. Parimisetty A, Dorsemans AC, Awada R, Ravanan P, Diotel N, Lefebvre d'Hellencourt C. Secret talk between adipose tissue and central nervous system via secreted factors-an emerging frontier in the neurodegenerative research. *J Neuroinflammation* 2016;13:67.
16. Woo J, Shin KO, Park SY, Jang KS, Kang S. Effects of exercise and diet change on cognition function and synaptic plasticity in high fat diet induced obese rats. *Lipids Health Dis* 2013;12:144.
17. Leffa DD, Valvassori SS, Varela RB, Lopes-Borges J, Daumann F, Longaretti LM, et al. Effects of palatable cafeteria diet on cognitive and noncognitive behaviors and brain neurotrophins' levels in mice. *Metab Brain Dis* 2015;30:1073-82.
18. Hinderberger P, Rullmann M, Drabe M, Luthardt J, Becker GA, Bluher M, et al. The effect of serum BDNF levels on central serotonin transporter availability in obese versus non-obese adults: A [¹¹C]DASB positron emission tomography study. *Neuropharmacology* 2016.
19. Cordeira JW, Felsted JA, Teillon S, Daftary S, Panessiti M, Wirth J, et al. Hypothalamic dysfunction of the thrombospondin receptor alpha2delta-1 underlies the overeating and obesity triggered by brain-derived neurotrophic factor deficiency. *J Neurosci* 2014;34:554-65.
20. Conti CL, Moscon JA, Fregni F, Nitsche MA, Nakamura-Palacios EM. Cognitive related electrophysiological changes induced by non-invasive cortical electrical stimulation in crack-cocaine addiction. *Int J Neuropsychopharmacol* 2014;17:1465-75.
21. Conti CL, Nakamura-Palacios EM. Bilateral transcranial direct current stimulation over dorsolateral prefrontal cortex changes the drug-cued reactivity in the anterior cingulate cortex of crack-cocaine addicts. *Brain Stimul* 2014;7:130-2.
22. Trojak B, Soudry-Faure A, Abello N, Carpentier M, Jonval L, Allard C, et al. Efficacy of transcranial direct current stimulation (tDCS) in reducing consumption in patients with alcohol use disorders: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2016;17:250.
23. Pedron S, Beverley J, Haffen E, Andrieu P, Steiner H, Van Waes V. Transcranial direct current stimulation produces long-lasting attenuation of cocaine-induced behavioral responses and gene regulation in corticostriatal circuits. *Addict Biol* 2016.
24. Fregni F, Orsati F, Pedrosa W, Fecteau S, Tome FA, Nitsche MA, et al. Transcranial direct current stimulation of the prefrontal cortex modulates the desire for specific foods. *Appetite* 2008;51:34-41.
25. Montenegro RA, Okano AH, Cunha FA, Gurgel JL, Fontes EB, Farinatti PT. Prefrontal cortex transcranial direct current stimulation associated with aerobic exercise change aspects of appetite sensation in overweight adults. *Appetite* 2012;58:333-8.
26. Goldman RL, Borckardt JJ, Frohman HA, O'Neil PM, Madan A, Campbell LK, et al. Prefrontal cortex transcranial direct current stimulation (tDCS) temporarily reduces food

cravings and increases the self-reported ability to resist food in adults with frequent food craving. *Appetite* 2011;56:741-6.

27. Polania R, Paulus W, Antal A, Nitsche MA. Introducing graph theory to track for neuroplastic alterations in the resting human brain: a transcranial direct current stimulation study. *Neuroimage* 2011;54:2287-96.

28. Nitsche MA, Nitsche MS, Klein CC, Tergau F, Rothwell JC, Paulus W. Level of action of cathodal DC polarisation induced inhibition of the human motor cortex. *Clin Neurophysiol* 2003;114:600-4.

29. Lapenta OM, Sierve KD, de Macedo EC, Fregni F, Boggio PS. Transcranial direct current stimulation modulates ERP-indexed inhibitory control and reduces food consumption. *Appetite* 2014;83:42-8.

30. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 2010;8:e1000412.

31. Estadella D, Oyama LM, Damaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition* 2004;20:218-24.

32. Kumar S, Alagawadi KR, Rao MR. Effect of *Argyreia speciosa* root extract on cafeteria diet-induced obesity in rats. *Indian J Pharmacol* 2011;43:163-7.

33. Johann M, Wiegand R, Kharraz A, Bobbe G, Sommer G, Hajak G, et al. Transcranial magnetic stimulation for nicotine dependence. *Psychiatr Prax* 2003;30 Suppl 2:S129-31.

34. Uher R, Yoganathan D, Mogg A, Eranti SV, Treasure J, Campbell IC, et al. Effect of left prefrontal repetitive transcranial magnetic stimulation on food craving. *Biol Psychiatry* 2005;58:840-2.

35. Alonso-Alonso M, Pascual-Leone A. The right brain hypothesis for obesity. *JAMA* 2007;297:1819-22.

36. Liebetanz D, Koch R, Mayenfels S, Konig F, Paulus W, Nitsche MA. Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats. *Clin Neurophysiol* 2009;120:1161-7.

37. Laste G, Caumo W, Adachi LN, Rozisky JR, de Macedo IC, Filho PR, et al. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. *Exp Brain Res* 2012;221:75-83.

38. Spezia Adachi LN, Caumo W, Laste G, Fernandes Medeiros L, Ripoll Rozisky J, de Souza A, et al. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. *Brain Res* 2012;1489:17-26.

39. Leffa DT, de Souza A, Scarabelot VL, Medeiros LF, de Oliveira C, Grevet EH, et al. Transcranial direct current stimulation improves short-term memory in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Eur Neuropsychopharmacol* 2016;26:368-77.

40. Cioato SG, Medeiros LF, Marques Filho PR, Vercelino R, de Souza A, Scarabelot VL, et al. Long-Lasting Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in the Reversal of Hyperalgesia and Cytokine Alterations Induced by the Neuropathic Pain Model. *Brain Stimul* 2016;9:209-17.
41. Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol* 1968;40:527-8.
42. Bianchin M, Walz R, Ruschel AC, Zanatta MS, Da Silva RC, Bueno e Silva M, et al. Memory expression is blocked by the infusion of CNQX into the hippocampus and/or the amygdala up to 20 days after training. *Behav Neural Biol* 1993;59:83-6.
43. Medeiros LF, de Souza AC, de Souza A, Cioato SG, Scarabelot VL, Caumo W, et al. Fentanyl administration in infant rats produces long-term behavioral responses. *Int J Dev Neurosci* 2012;30:25-30.
44. Roesler R, Walz R, Quevedo J, de-Paris F, Zanata SM, Graner E, et al. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). *Brain Res Mol Brain Res* 1999;71:349-53.
45. Britton DR, Britton KT. A sensitive open field measure of anxiolytic drug activity. *Pharmacol Biochem Behav* 1981;15:577-82.
46. Wells CE, Amos DP, Jeewajee A, Douchamps V, Rodgers J, O'Keefe J, et al. Novelty and anxiolytic drugs dissociate two components of hippocampal theta in behaving rats. *J Neurosci* 2013;33:8650-67.
47. Filho PR, Vercelino R, Cioato SG, Medeiros LF, de Oliveira C, Scarabelot VL, et al. Transcranial direct current stimulation (tDCS) reverts behavioral alterations and brainstem BDNF level increase induced by neuropathic pain model: Long-lasting effect. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2016;64:44-51.
48. Gamaro GD, Manoli LP, Torres IL, Silveira R, Dalmaz C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. *Neurochem Int* 2003;42:107-14.
49. Dallman MF, la Fleur SE, Pecoraro NC, Gomez F, Houshyar H, Akana SF. Minireview: glucocorticoids--food intake, abdominal obesity, and wealthy nations in 2004. *Endocrinology* 2004;145:2633-8.
50. Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology* 2004;145:3754-62.
51. Oliveira C, Oliveira CM, de Macedo IC, Quevedo AS, Filho PR, Silva FR, et al. Hypercaloric diet modulates effects of chronic stress: a behavioral and biometric study on rats. *Stress* 2015;18:514-23.

52. Krolow R, Noschang CG, Arcego D, Andrezza AC, Peres W, Goncalves CA, et al. Consumption of a palatable diet by chronically stressed rats prevents effects on anxiety-like behavior but increases oxidative stress in a sex-specific manner. *Appetite* 2010;55:108-16.
53. Schmoller A, Hass T, Strugovshchikova O, Melchert UH, Scholand-Engler HG, Peters A, et al. Evidence for a relationship between body mass and energy metabolism in the human brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010;30:1403-10.
54. Jauch-Chara K, Kistenmacher A, Herzog N, Schwarz M, Schweiger U, Oltmanns KM. Repetitive electric brain stimulation reduces food intake in humans. *Am J Clin Nutr* 2014;100:1003-9.
55. Gosnell BA. Sucrose intake predicts rate of acquisition of cocaine self-administration. *Psychopharmacology (Berl)* 2000;149:286-92.
56. Pelchat ML. Of human bondage: food craving, obsession, compulsion, and addiction. *Physiol Behav* 2002;76:347-52.
57. Dalton M, Blundell J, Finlayson G. Effect of BMI and binge eating on food reward and energy intake: further evidence for a binge eating subtype of obesity. *Obes Facts* 2013;6:348-59.
58. Brody AL, Mandelkern MA, London ED, Childress AR, Lee GS, Bota RG, et al. Brain metabolic changes during cigarette craving. *Arch Gen Psychiatry* 2002;59:1162-72.
59. McBride D, Barrett SP, Kelly JT, Aw A, Dagher A. Effects of expectancy and abstinence on the neural response to smoking cues in cigarette smokers: an fMRI study. *Neuropsychopharmacology* 2006;31:2728-38.
60. Wilson SJ, Sayette MA, Fiez JA. Prefrontal responses to drug cues: a neurocognitive analysis. *Nat Neurosci* 2004;7:211-4.
61. Boggio PS, Liguori P, Sultani N, Rezende L, Fecteau S, Fregni F. Cumulative priming effects of cortical stimulation on smoking cue-induced craving. *Neurosci Lett* 2009;463:82-6.
62. Amiaz R, Levy D, Vainiger D, Grunhaus L, Zangen A. Repeated high-frequency transcranial magnetic stimulation over the dorsolateral prefrontal cortex reduces cigarette craving and consumption. *Addiction* 2009;104:653-60.
63. Nitsche MA, Lampe C, Antal A, Liebetanz D, Lang N, Tergau F, et al. Dopaminergic modulation of long-lasting direct current-induced cortical excitability changes in the human motor cortex. *Eur J Neurosci* 2006;23:1651-7.
64. Nicola SM. Reassessing wanting and liking in the study of mesolimbic influence on food intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2016;ajpregu 00234 2016.
65. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 2011;29:415-45.

66. Lopez M, Tovar S, Vazquez MJ, Williams LM, Dieguez C. Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proc Nutr Soc* 2007;66:131-55.
67. Kanoski SE, Meisel RL, Mullins AJ, Davidson TL. The effects of energy-rich diets on discrimination reversal learning and on BDNF in the hippocampus and prefrontal cortex of the rat. *Behav Brain Res* 2007;182:57-66.
68. Velloso LA, Schwartz MW. Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)* 2011;35:1455-65.
69. Franco-Robles E, Lopez MG. Agavins Increase Neurotrophic Factors and Decrease Oxidative Stress in the Brains of High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Molecules* 2016;21.
70. Meireles M, Rodriguez-Alcala LM, Marques C, Norberto S, Freitas J, Fernandes I, et al. Effect of chronic consumption of blackberry extract on high-fat induced obesity in rats and its correlation with metabolic and brain outcomes. *Food Funct* 2016;7:127-39.
71. Leal G, Comprido D, Duarte CB. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 2014;76 Pt C:639-56.
72. Bekinschtein P, Cammarota M, Medina JH. BDNF and memory processing. *Neuropharmacology* 2014;76 Pt C:677-83.
73. Valdearcos M, Xu AW, Koliwad SK. Hypothalamic inflammation in the control of metabolic function. *Annu Rev Physiol* 2015;77:131-60.
74. Ropelle ER, Flores MB, Cintra DE, Rocha GZ, Pauli JR, Morari J, et al. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. *PLoS Biol* 2010;8.
75. Arslan N, Erdur B, Aydin A. Hormones and cytokines in childhood obesity. *Indian Pediatr* 2010;47:829-39.
76. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 2010;316:129-39.
77. Wang GJ, Yang J, Volkow ND, Telang F, Ma Y, Zhu W, et al. Gastric stimulation in obese subjects activates the hippocampus and other regions involved in brain reward circuitry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:15641-5.

Legends

Figure 1: Experimental Design. Wk: week. OF: open field test. EPM: elevated plus maze test. PFT: palatable food test. tDCS: transcranial direct current stimulation. †: euthanasia

Figure 2: tDCS model. The center of the anodal electrode was placed on the right prefrontal dorsolateral cortex (DLPFC) and the cathode on the left side DLPFC.

Figure 3: Assessment of weight parameters - Delta weight and Lee Index. Data expressed as mean \pm SEM. (SDS) standard diet plus sham tDCS treatment; (SDT) standard diet plus tDCS treatment; (HDS) hypercaloric diet plus sham tDCS treatment; (HDT) hypercaloric diet plus tDCS treatment.

Panel A. Delta weight (n=10 per group).

* significant difference from SDS and SDT groups (one-way ANOVA/ SNK, $P < 0.05$).

Panel B. Lee Index (n=10 per group).

* significant difference from other groups (one-way ANOVA/ SNK, $P < 0.05$).

Figure 4: Assessment of the relative tissue weights. Data expressed as mean \pm SEM. (SDS) standard diet plus sham tDCS treatment; (SDT) standard diet plus tDCS treatment; (HDS) hypercaloric diet plus sham tDCS treatment; (HDT) hypercaloric diet plus tDCS treatment.

Panel A. Relative weight liver (n=10 per group).

* significant difference from SDS and SDT groups (one-way ANOVA/ SNK, $P < 0.05$).

Panel B. Relative weight adipose tissue (n=6-9 per group).

* significant difference from other groups (one-way ANOVA/ SNK, $P < 0.05$).

Figure 5: Palatable food consumption test. Data expressed as median \pm interquartile range (n=10 per group). (SDS) standard diet plus sham tDCS treatment; (SDT) standard diet plus tDCS treatment; (HDS) hypercaloric diet plus sham tDCS treatment; (HDT) hypercaloric diet plus tDCS treatment.

Panel A. Post-feeding. There was no significant difference between groups (Kruskal–Wallis test, $P > 0.05$).

Panel B. Post-fasting.

* significant difference from HDS group (Kruskal–Wallis test, $P > 0.05$)

Figure 6: BDNF, IL-10, IL-1 β and TNF- α levels in cerebral cortex. Data expressed as mean \pm SEM. (SDS) standard diet plus sham tDCS treatment; (SDT) standard diet plus tDCS treatment; (HDS) hypercaloric diet plus sham tDCS treatment; (HDT) hypercaloric diet plus tDCS treatment.

Panel A. BDNF levels (n= 10 per group).

* significant difference from SDS and SDT groups (one-way ANOVA/ SNK, P <0.05).

Panel B. IL-10 levels (n= 9-10 per group).

* significant difference from SDS and SDT groups (one-way ANOVA/ SNK, P <0.05).

Panel C. IL-1 β levels (n= 10 per group).

* significant difference from SDS, SDT and HDS groups (one-way ANOVA/ SNK, P <0.05).

Panel D. TNF- α levels (n= 9-10 per group).

* significant difference from SDS, SDT and HDS groups (one-way ANOVA/ SNK, P <0.05).

Table 1. Open field test. Data expressed as median \pm interquartile range (n=10 per group). (SDS) standard diet plus sham tDCS treatment; (SDT) standard diet plus tDCS treatment; (HDS) hypercaloric diet plus sham tDCS treatment; (HDT) hypercaloric diet plus tDCS treatment. (Pre) pre tDCS; (Post) post tDCS ; Crossing and rearing presented in absolute numbers, and latency, in seconds.

* significant difference from pre treatment (Wilcoxon test, P <0.05).

Table 2. Elevated plus maze test. Data expressed as median \pm interquartile range (n= 9-10 per group). (SDS) standard diet plus sham tDCS treatment; (SDT) standard diet plus tDCS treatment; (HDS) hypercaloric diet plus sham tDCS treatment; (HDT) hypercaloric diet plus tDCS treatment; (NPHD) non-protected head-dipping movements; (EOA) entries into open arms; (TOA) time on open arms; (Pre) pre tDCS; (Post) post tDCS ; (TCA) time on closed arms. NPHD and EOA presented in absolute numbers, and TOA and TCA, in seconds.

* significant difference from pre treatment (Wilcoxon test, P <0.05)

Supplemental Materials

Table 3. Open field test. Data expressed as median \pm interquartile range (n=10 per group). (SDS) standard diet plus sham tDCS treatment; (SDT) standard diet plus tDCS treatment; (HDS) hypercaloric diet plus sham tDCS treatment; (HDT) hypercaloric diet plus tDCS treatment; Crossing and rearing presented in absolute numbers, and latency, in seconds.

There was no significant difference from pre and post treatment between groups (Kruskal-Wallis test, $P > 0.05$).

Table 4. Elevated plus maze test. Data expressed as median \pm interquartile range (n= 9-10 per group). (SDS) standard diet plus sham tDCS treatment; (SDT) standard diet plus tDCS treatment; (HDS) hypercaloric diet plus sham tDCS treatment; (HDT) hypercaloric diet plus tDCS treatment; (NPHD) non-protected head-dipping movements; (EOA) entries into open arms; (TOA) time on open arms; (TCA) time on closed arms; (Pre) pre tDCS; NPHD and EOA presented in absolute numbers, and TOA and TCA, in seconds.

* significant difference in relation to group SDS (Kruskal-Wallis test, $P < 0.05$).

Figures

Figure 1: Experimental Design

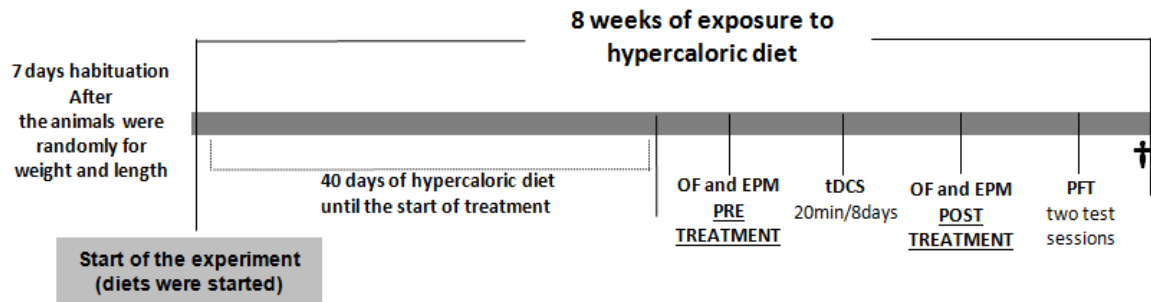


Figure 2: tDCS model

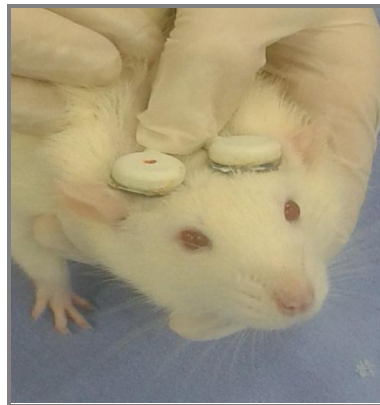
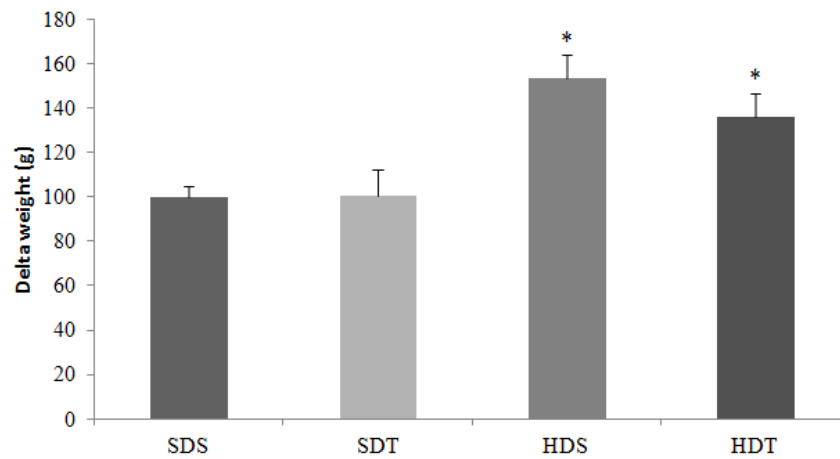


Figure 3. Delta weight and Lee Index

PANEL A



PANEL B

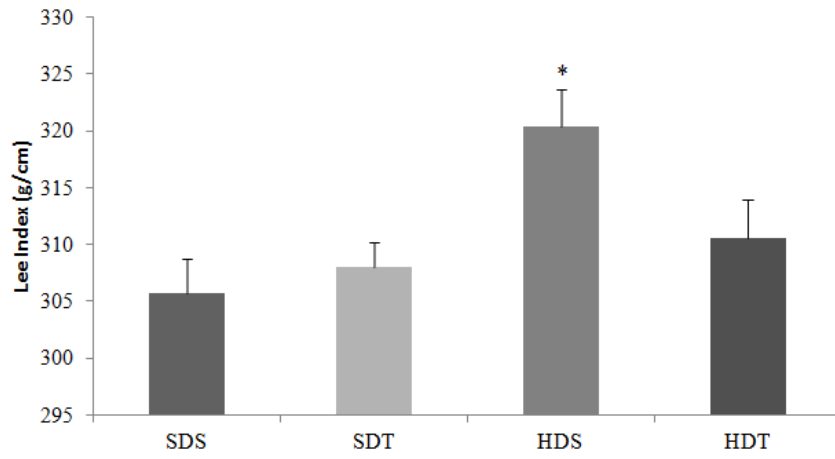
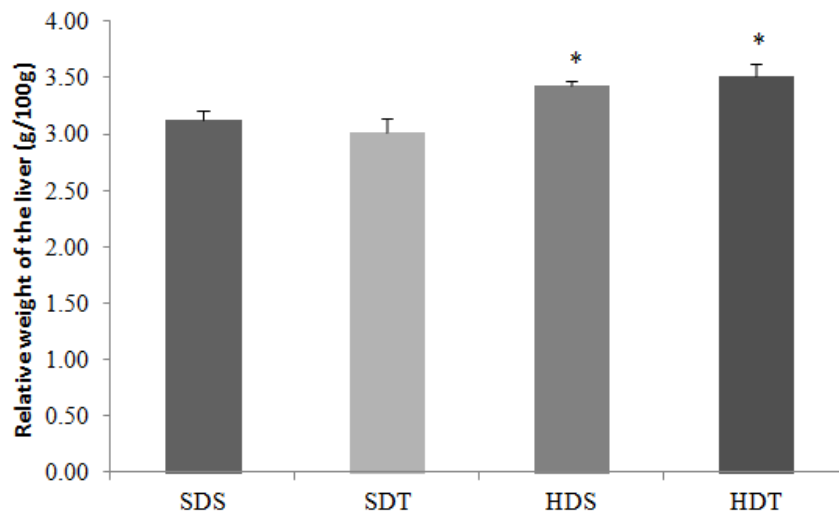


Figure 4. Relative weight liver and adipose tissue

PANEL A



PANEL B

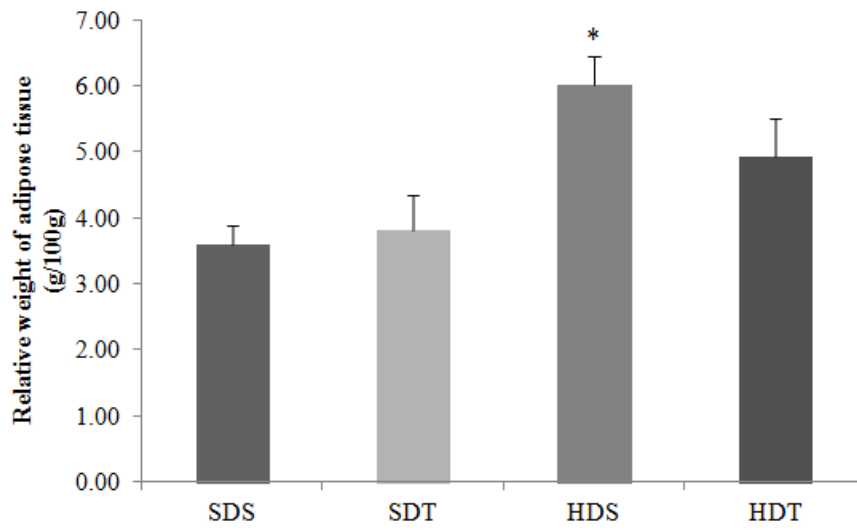
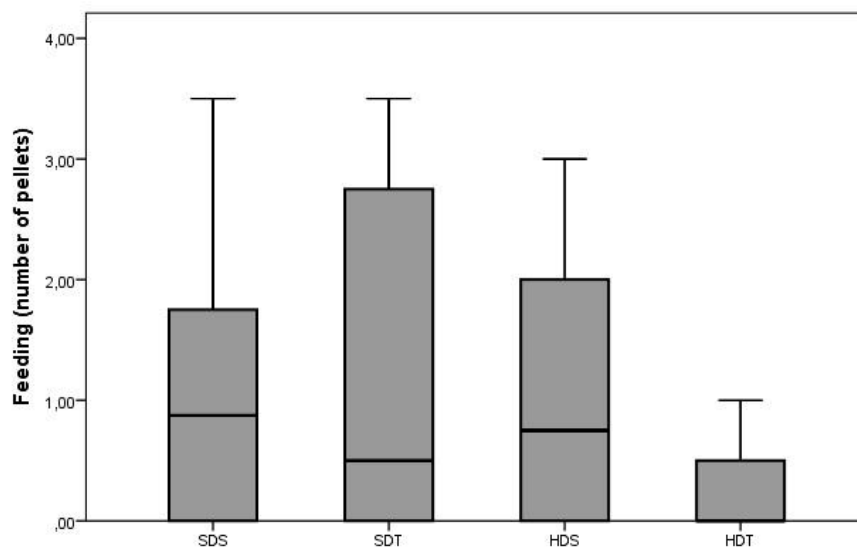


Figure 5: Palatable Food Test

PANEL A



PANEL B

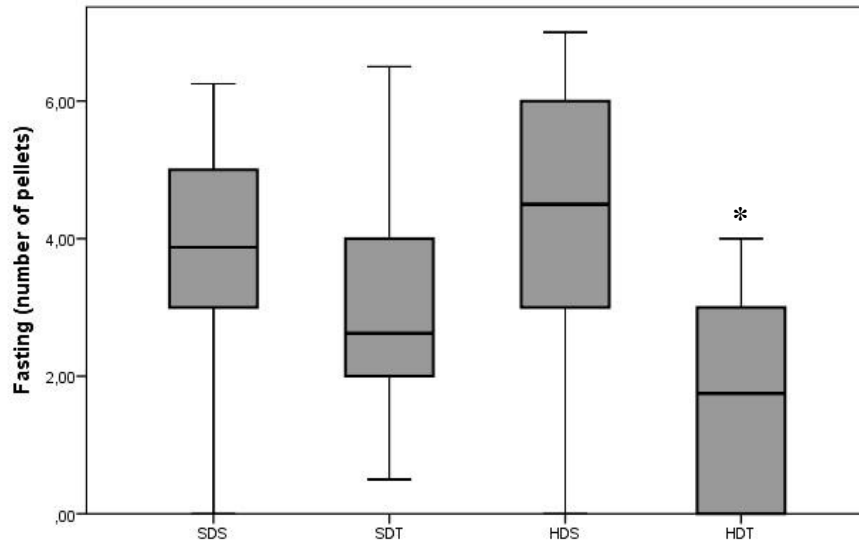
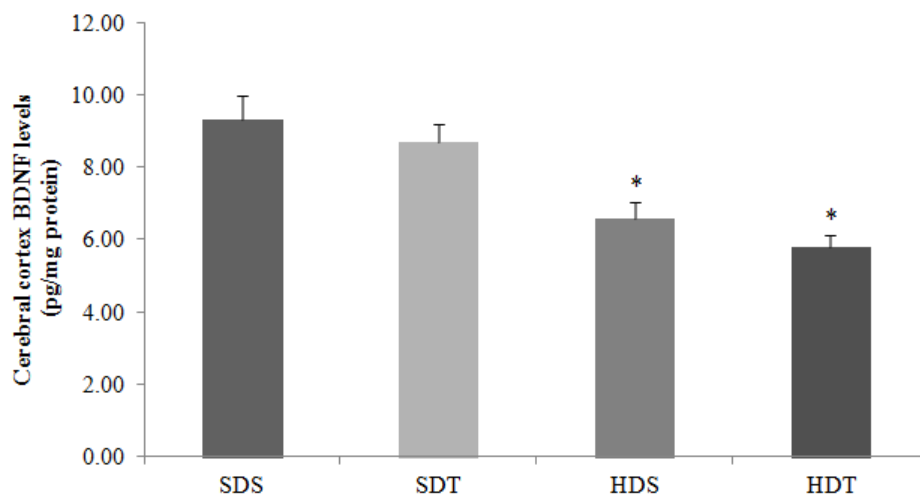
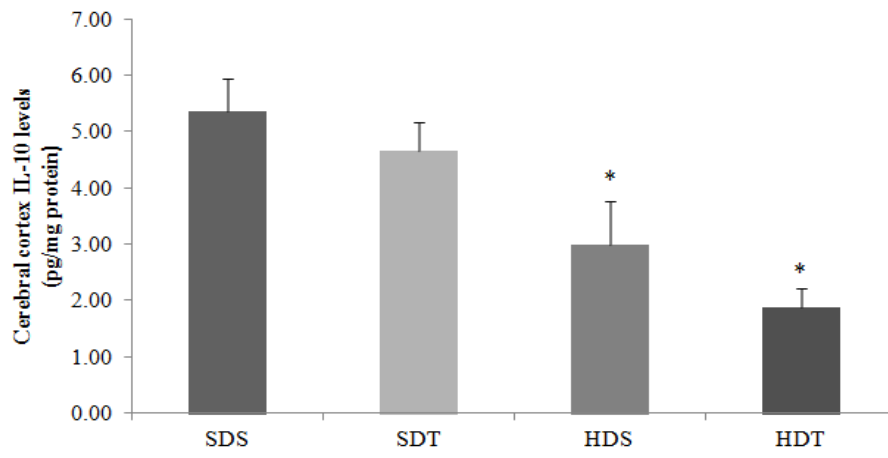


Figure 6: BDNF, IL-10, IL-1 β and TNF- α levels in cerebral cortex

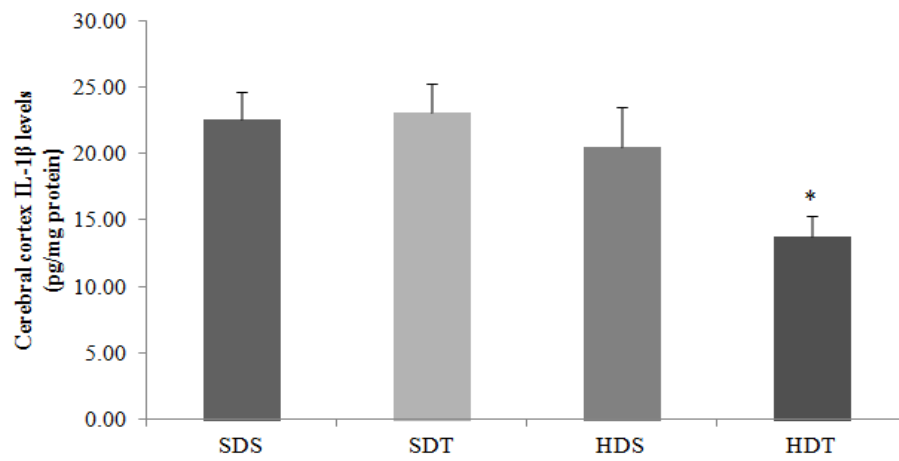
Panel A



PANEL B



PANEL C



PANEL D

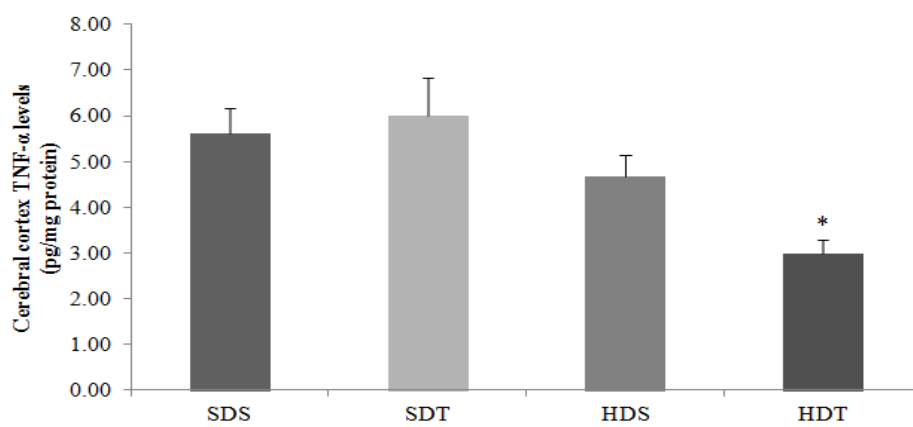


Table 1. Open Field Test

	Crossing Pre	Crossing Post	Rearing Pre	Rearing Post	Latency Pre	Latency Post
SDS	70.50±36.25	59.00±64.75	23.50±13.25	17.00±10.75*	6.00±11.00	2.50±4.50
SDT	78.50±43.00	79.00±34.25	24.50±11.25	13.50±13.25*	7.50±4.00	2.50±1.00*
HDS	85.50±49.75	65.50±64.25	19.00±6.50	15.50±13.50	4.50±5.25	2.50±3.25*
HDT	88.50±22.00	89.50±55.00	24.00±9.25	25.50±24.25	10.50±12.50	3.00±6.75*

Table 2. Elevated Plus Maze Test

	NPHD Pre	NPHD Post	EOA Pre	EOA Post
SDS	1.00±4.00	0.00±1.00	10.50±23.00	3.00±44.50
SDT	3.00±6.50	2.00±4.50	36.00±53.00	32.00±40.50
HDS	0.00±3.50	3.00±3.25*	0.00±34.75	40.00±48.50*
HDT	2.50±6.75	2.00±4.25	14.00±48.75	22.50±25.00

Table 2. Elevated Plus Maze Test continuation

	TOA Pre	TOA Post	TCA Pre	TCA Post
SDS	1.50±3.25	0.50±4.00	269.00±85.00	267.50±35.00
SDT	2.00±3.00	2.00±1.00	222.00±46.50	255.00±77.50
HDS	0.00±2.00	2.00±2.00*	274.00±65.75	232.50±60.25*
HDT	1.00±3.00	1.50±1.25	258.00±63.25	259.50±45.75

Supplemental Materials

Table 3 . Open Field test

	PRE TREATMENT			POST TREATMENT		
	CROSSING	REARING	LATENCY	CROSSING	REARING	LATENCY
SDS	70.50±36.25	23.50±13.25	6.00±11.00	59.00±64.75	17.00±10.75	2.50±4.50
SDT	78.50±43.00	24.50±11.25	7.50±4.00	79.00±34.25	13.50±13.25	2.50±1.00
HDS	85.50±49.75	19.00±6.50	4.50±5.25	65.50±64.25	15.50±13.50	2.50±3.25
HDT	88.50±22.00	24.00±9.25	10.50±12.50	89.50±55.00	25.50±24.25	3.00±.6.75

Table 4. Plus Maze test

	PRE TREATMENT				POST TREATMENT			
	NPHD	EOA	TOA	TCA	NPHD	EOA	TOA	TCA
SDS	1.00±4.00	1.50±3.25	10.50±23.00	269.00±85.00	0.00±1.00	0.50±4.00	3.00±44.50	267.50±35.00
SDT	3.00±6.50	2.00±3.00	36.00±53.00	222.00±46.50	2.00±4.50	2.00±1.00	32.00±40.50	255.00±77.50
HDS	0.00±3.50	0.00±2.00	0.00±34.75	274.00±65.75	3.00±3.25*	2.00±2.00	40.00±48.50	232.50±60.25*
HDT	2.50±6.75	1.00±3.00	14.00±48.75	258.00±63.25	2.00±4.25	1,50±1.25	22.50±25.00	259.50±45.75

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesta dissertação mostram que o tratamento com ETCC bicefálico reduziu o consumo de alimento palatável (Froot Loops Kellogg's®) após 22 horas de jejum nos animais tratados com a dieta hipercalórica. Adicionalmente reverteu, nestes animais, o aumento no índice de Lee, que corresponde ao índice de massa corporal (IMC) em humanos e o aumento do tecido adiposo, ambos os parâmetros clássicos de obesidade. Em animais alimentados com dieta padrão o tratamento repetido com ETCC bicefálico reduziu a latência para saída do primeiro quadrante no teste de campo aberto. Além disso, exposição à dieta hipercalórica diminuiu os níveis de BDNF e IL-10 em córtex cerebral, enquanto o tratamento com ETCC bicefálico diminuiu os níveis de IL-1 β e TNF- α nesta estrutura. Baseado nestes resultados pode sugerir que o tratamento com ETCC bicefálico induz, nestes mediadores inflamatórios, um efeito estado dependente, uma vez que não foram observadas alterações nestes parâmetros nos animais submetidos à dieta padrão.

É importante salientar que a técnica de ETCC, desenvolvida por nosso grupo de pesquisa, é aplicada sem o uso de anestésicos, sendo necessário que o animal seja contido. Portanto com o objetivo de evitar viés de estresse gerado por esta contenção foi inserido um grupo SHAM no estudo envolvendo somente a contenção e colocação dos eletrodos, no entanto sem ligá-los. Precedendo o tratamento com ETCC bicefálico, os grupos foram submetidos aos testes comportamentais que demonstraram homogeneidade entre os grupos em relação aos parâmetros avaliados. Após o tratamento com ETCC bicefálico, exposição do animal a dieta padrão induziu diminuição no comportamento de *rearing* no teste de campo aberto, efeito este não revertido pela ETCC ativa. Comparando pré e pós-tratamento com ETCC bicefálico, os grupos expostos à dieta hipercalórica mostraram aumento no tempo de entrada nos braços abertos e NPHD no labirinto em cruz elevado. É importante salientar que este efeito ansiolítico induzido pela dieta hipercalórica foi revertido pela ETCC bicefálica sugerindo um restabelecimento da homeostase.

A contenção ao que o animal foi submetido diminuiu a latência para deixar o primeiro quadrante no teste de campo aberto, e este efeito não foi revertido pelo tratamento com ETCC bicefálico. Quando analisamos os dados de EPM comparando os grupos após exposição ao tratamento repetido com ETCC bicefálica, observamos que exposição à dieta hipercalórica aumentou NPHD e reduziu TCA em comparação com os grupos de dieta padrão sugerindo um efeito ansiolítico induzido pela dieta hipercalórica. Estes resultados podem sugerir que a dieta hipercalórica atenua o efeito da imobilização necessária para aplicação técnica ETCC

considerado um modelo de estresse por restrição. Classicamente a exposição a estresse repetido é relacionado a efeito ansiogênico, no entanto neste estudo não temos um grupo controle que nos possibilitasse determinar este efeito em relação ao animal sham exposto a dieta padrão. Situações de exposição a estresse são complexas, exposição a estresse agudo ou crônico podem causar alterações no controle alimentar (Dallman, la Fleur et al. 2004). Sabe-se que os alimentos palatáveis podem diminuir a resposta a estresse (Pecoraro, Reyes et al. 2004). Estudo recente do nosso grupo de pesquisa mostrou que exposição a estresse crônico aumentou comportamento do tipo ansioso e este efeito foi revertido pelo consumo de dieta hipercalórica (Krolow, Noschang et al. 2010, Oliveira, Oliveira et al. 2015).

Estresse combinado ao sedentarismo pode levar a excesso de peso e obesidade abdominal associada a maior relação cintura-quadril e o índice de massa corporal (IMC). Além disso, um estudo anterior mostrou relação entre o aporte energético encefálico e regulação do peso corporal (Schmoller, Hass et al. 2010). Estudo com humanos sugeriu que ETCC pode modular a energia do cérebro no DLPFC, reduzindo o peso corporal (Jauch-Chara, Kistenmacher et al. 2014). Em nosso estudo o aumento no índice de Lee e no peso do tecido adiposo visceral, ambos induzidos por dieta hipercalórica foram revertidos pelo tratamento com ETCC bicefálico. Este efeito não foi observado no peso relativo do fígado. Considerados em conjunto, estes dados sugerem que tratamento com ETCC bicefálico reduz os parâmetros de obesidade. Desta forma, ETCC pode ser uma alternativa não farmacológica no tratamento de doenças metabólicas como a obesidade.

Dietas ricas em gordura e açúcares (*palatable food*) podem provocar uma motivação irresistível para consumo conhecido como *craving*. Um estudo recentemente publicado por nosso grupo de pesquisa mostrou que tratamento com ETCC bicefálico reduziu o *craving* por alimento palatável (Macedo, de Oliveira et al. 2016) corroborando estudos prévios com humanos (Fregni, Orsati et al. 2008, Goldman, Borckardt et al. 2011).

O presente estudo reforça os achados anteriores mostrando que tratamento com ETCC bicefálico diminuiu a ingestão de alimento palatável após jejum nos animais alimentados com dieta hipercalórica em relação ao tratamento SHAM (Macedo, de Oliveira et al. 2016). Os mecanismos moleculares pelos quais o tratamento com ETCC bicefálico reduz o *craving* por alimentos palatáveis não estão completamente estabelecidos. Sabe-se que o consumo por este tipo de alimento pode desencadear compulsão alimentar, semelhante aos mecanismos envolvidos no processo de adição por drogas de abuso (Gosnell 2000). Estes alimentos altamente palatáveis, ricos em açúcares, podem ativar o sistema de recompensa, modificando o comportamento alimentar (Pelchat 2002, Dalton, Blundell et al. 2013). Além disto é sabido

que a ingestão de alimentos palatáveis ativa sistema mesolímbico dopaminérgico envolvido nos circuitos de recompensa (Nicola 2016). DLPFC, importante área do encéfalo responsável pela motivação e tomada de decisão, tem sido investigado no tratamento de comportamentos de vício e compulsão. Estudos têm mostrado que DLPFC desempenha um importante papel no paladar (Brody, Mandelkern et al. 2002, Wilson, Sayette et al. 2004, McBride, Barrett et al. 2006). Além disso, tratamento com ETCC no DLPFC reduz o *craving* por alimentos palatáveis (Uher, Yoganathan et al. 2005, Fregni, Orsati et al. 2008), pelo álcool (Boggio, Liguori et al. 2009) e pela nicotina (Amiaz, Levy et al. 2009). Prévio estudo demonstrou que a aplicação cortical de ETCC modulou vias dopaminérgicas (Nitsche, Lampe et al. 2006).

A obesidade resulta em um estado inflamatório de baixo grau com aumento do tecido adiposo, especialmente do tecido adiposo visceral, participa no controle metabólico e do peso corporal. Este nível inflamatório de baixo grau produz efeitos em outras regiões, como o fígado, pâncreas e cérebro (Gregor e Hotamisligil 2011). Tem sido descritas alterações metabólicas induzidas pela obesidade e a sensibilidade do cérebro a essas alterações (Kanoski, Meisel et al. 2007, Lopez, Tovar et al. 2007, Velloso and Schwartz 2011). Nesta dissertação demonstramos que o consumo de dieta hipercalórica está associada com diminuição dos níveis de BDNF (Franco-Robles e Lopez 2016, Meireles, Rodriguez-Alcala et al. 2016) e de IL-10 em córtex cerebral. BDNF é uma neurotrofina responsável pela sobrevivência e plasticidade sináptica (Bekinschtein, Cammarota et al. 2014, Leal, Comprido et al. 2014) e IL-10 desempenha importante ação anti-inflamatória no SNC (Valdearcos, Xu et al. 2015). Infusão de IL-10 de diretamente no hipotálamo inibe a ação inflamatória nesta região do cérebro de ratos obesos, contribuindo para a diminuição de ingesta calórica e melhora no controle do balanço energético (Ropelle, Flores et al. 2010). Nossos dados corroboram dados da literatura que demonstram que no processo de obesidade, ocorre aumento de interleucinas pró-inflamatórias e diminuição de interleucinas anti-inflamatórias (Arslan, Erdur et al. 2010, Galic, Oakhill et al. 2010). No entanto, nesta dissertação não foi observado aumento nos níveis centrais de interleucinas pró-inflamatórias, isto pode ser decorrente de um processo adaptativo para manter a homeostase do SNC. Além disto, é possível sugerir que aqueles parâmetros estejam relacionados com o tipo de dieta e tempo de exposição a dieta. É importante salientar que o tratamento com ETCC bicefálico diminuiu níveis IL-1 β e de TNF- α nos animais tratados com dieta hipercalórica. O papel do TNF- α é complexo, tem efeitos pleiotrópicos e pode ter efeitos positivos ou negativos no cérebro (Parimisetty, Dorsemans et al. 2016). O tratamento com ETCC bicefálico diminuiu os níveis de interleucinas pró-

inflamatórias apenas nos animais obesos, o que demonstra que e os mecanismos da ETCC são estado dependente.

Os mecanismos pelos quais tratamento com ETCC bicefálico exerce os seus efeitos não são completamente compreendidos. Nosso estudo mostra que a dieta de hipercalórica desempenha importante papel em parâmetros bioquímicos e comportamentais envolvidas na compulsão alimentar. Além disso, o tratamento com ETCC bicefálico foi capaz de alterar estes circuitos neurais e um efeito modulador nestas vias. Os nossos resultados suportam a hipótese de que o tratamento com ETCC bicefálico é eficaz na redução da compulsão por alimentos palatáveis, já demonstrado em estudo prévio com ratos (Macedo et al. 2016) e com humanos (Fregni, Orsati et al. 2008). O mecanismo pelo qual o ETCC inibe o “*food craving*”, provavelmente envolva processos neurobiológicos associados a tomada de decisão, processos motivacionais e sistema de recompensa (Wang, Yang et al. 2006).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta dissertação demonstram que o tratamento com ETCC bicefálica reduz a compulsão por alimento palatável em ratos obesos após o jejum e reverte o aumento do Índice de Lee e do peso do tecido adiposo visceral nestes animais. Além disso, verificou-se que a obesidade altera parâmetros de neuroplasticidade e neuroinflamatórios (diminui níveis corticais de BDNF e IL-10). Por outro lado, o tratamento com ETCC bicefálica diminui os níveis de IL-1 β e TNF- α em córtex de animais obesos. A exposição à dieta hipercalórica teve efeito ansiolítico que foi revertido pelo tratamento com ETCC. Portanto, a exposição a tratamento repetido com ETCC parece atuar em vias envolvidas em comportamento alimentar modulando alterações neuroplásticas características da obesidade.

É importante salientar que este estudo apresenta algumas limitações, entre elas a dificuldade do emprego da técnica devido às pequenas dimensões da cabeça do rato que contribuiu para designação de “tratamento com ETCC bicefálico” e não ter sido avaliadas outras estruturas envolvidas com comportamento alimentar e sistema de recompensa. Desta forma são consideradas como perspectivas, a partir dos resultados obtidos nesta dissertação, a avaliação de estruturas específicas do encéfalo, incluindo córtex frontal, tronco cerebral, estriado e núcleo accumbens. Assim como a avaliação de níveis de dopamina e a expressão de seus receptores diretamente relacionados ao sistema de recompensa.

O presente estudo fornece uma melhor compreensão dos efeitos da ETCC na prevenção ou tratamento da obesidade e na compulsão por alimentos palatáveis. No entanto,

são necessários mais estudos para investigar os sistemas de neurotransmissores envolvidos no comportamento alimentar, com ênfase para os sistemas opioideérgico, dopaminérgico, glutamatérgico e gabaérgico.

Referências da revisão da literatura

- Acosta, A., B. K. Abu Dayyeh, J. D. Port and M. Camilleri (2014). "Recent advances in clinical practice challenges and opportunities in the management of obesity." *Gut* 63(4): 687-695.
- Amiaz, R., D. Levy, D. Vainiger, L. Grunhaus and A. Zangen (2009). "Repeated high-frequency transcranial magnetic stimulation over the dorsolateral prefrontal cortex reduces cigarette craving and consumption." *Addiction* 104(4): 653-660.
- Andrews, Z. B. (2011). "Central mechanisms involved in the orexigenic actions of ghrelin." *Peptides* 32(11): 2248-2255.
- Antal, A., D. Terney, S. Kuhnle and W. Paulus (2010). "Anodal transcranial direct current stimulation of the motor cortex ameliorates chronic pain and reduces short intracortical inhibition." *J Pain Symptom Manage* 39(5): 890-903.
- Antuna-Puente, B., B. Feve, S. Fellahi and J. P. Bastard (2008). "Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity." *Diabetes Metab* 34(1): 2-11.
- Arslan, N., B. Erdur and A. Aydin (2010). "Hormones and cytokines in childhood obesity." *Indian Pediatr* 47(10): 829-839.
- Bastien, M., P. Poirier, I. Lemieux and J. P. Despres (2014). "Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease." *Prog Cardiovasc Dis* 56(4): 369-381.
- Bekinschtein, P., M. Cammarota and J. H. Medina (2014). "BDNF and memory processing." *Neuropharmacology* 76 Pt C: 677-683.
- Bewick, G. A. (2012). "Bowels control brain: gut hormones and obesity." *Biochem Med (Zagreb)* 22(3): 283-297.
- Bikson, M., P. Grossman, C. Thomas, A. L. Zannou, J. Jiang, T. Adnan, A. P. Mourdoukoutas, G. Kronberg, D. Truong, P. Boggio, A. R. Brunoni, L. Charvet, F. Fregni, B. Fritsch, B. Gillick, R. H. Hamilton, B. M. Hampstead, R. Jankord, A. Kirton, H. Knotkova, D. Liebetanz, A. Liu, C. Loo, M. A. Nitsche, J. Reis, J. D. Richardson, A. Rotenberg, P. E. Turkeltaub and A. J. Woods (2016). "Safety of Transcranial Direct Current Stimulation: Evidence Based Update 2016." *Brain Stimul.*
- Blevins, J. E. and D. G. Baskin (2010). "Hypothalamic-brainstem circuits controlling eating." *Forum Nutr* 63: 133-140.
- Blüher, M. (2014). "Are metabolically healthy obese individuals really healthy?" *Eur J Endocrinol* 171(6): R209-219.
- Boggio, P. S., F. Berman, A. O. Vergara, A. L. Muniz, F. H. Nahas, P. B. Leme, S. P. Rigonatti and F. Fregni (2007). "Go-no-go task performance improvement after anodal transcranial DC stimulation of the left dorsolateral prefrontal cortex in major depression." *J Affect Disord* 101(1-3): 91-98.

Boggio, P. S., P. Liguori, N. Sultani, L. Rezende, S. Fecteau and F. Fregni (2009). "Cumulative priming effects of cortical stimulation on smoking cue-induced craving." *Neurosci Lett* 463(1): 82-86.

Brody, A. L., M. A. Mandelkern, E. D. London, A. R. Childress, G. S. Lee, R. G. Bota, M. L. Ho, S. Saxena, L. R. Baxter, Jr., D. Madsen and M. E. Jarvik (2002). "Brain metabolic changes during cigarette craving." *Arch Gen Psychiatry* 59(12): 1162-1172.

Buhmann, H., C. W. le Roux and M. Bueter (2014). "The gut-brain axis in obesity." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 28(4): 559-571.

Cioato, S. G., L. F. Medeiros, P. R. Marques Filho, R. Vercelino, A. de Souza, V. L. Scarabelot, C. de Oliveira, L. N. Adachi, F. Fregni, W. Caumo and I. L. Torres (2016). "Long-Lasting Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in the Reversal of Hyperalgesia and Cytokine Alterations Induced by the Neuropathic Pain Model." *Brain Stimul* 9(2): 209-217.

Cooke, A. A., R. M. Connaughton, C. L. Lyons, A. M. McMorrow and H. M. Roche (2016). "Fatty acids and chronic low grade inflammation associated with obesity and the metabolic syndrome." *Eur J Pharmacol* 785: 207-214.

Cordeira, J. and M. Rios (2011). "Weighing in the role of BDNF in the central control of eating behavior." *Mol Neurobiol* 44(3): 441-448.

Culbert, K. M., S. E. Racine and K. L. Klump (2016). "Hormonal Factors and Disturbances in Eating Disorders." *Curr Psychiatry Rep* 18(7): 65.

Dallman, M. F., S. E. la Fleur, N. C. Pecoraro, F. Gomez, H. Houshyar and S. F. Akana (2004). "Minireview: glucocorticoids--food intake, abdominal obesity, and wealthy nations in 2004." *Endocrinology* 145(6): 2633-2638.

Dalton, M., J. Blundell and G. Finlayson (2013). "Effect of BMI and binge eating on food reward and energy intake: further evidence for a binge eating subtype of obesity." *Obes Facts* 6(4): 348-359.

Duclos, M. (2016). "Osteoarthritis, obesity and type 2 diabetes: The weight of waist circumference." *Ann Phys Rehabil Med* 59(3): 157-160.

Esser, N., N. Paquot and A. J. Scheen (2015). "Inflammatory markers and cardiometabolic diseases." *Acta Clin Belg* 70(3): 193-199.

Fargali, S., M. Sadahiro, C. Jiang, A. L. Frick, T. Indall, V. Cogliani, J. Welagen, W. J. Lin and S. R. Salton (2012). "Role of neurotrophins in the development and function of neural circuits that regulate energy homeostasis." *J Mol Neurosci* 48(3): 654-659.

Farr, O. M., C. S. Li and C. S. Mantzoros (2016). "Central nervous system regulation of eating: Insights from human brain imaging." *Metabolism* 65(5): 699-713.

- Faulconbridge, L. F. and M. R. Hayes (2011). "Regulation of energy balance and body weight by the brain: a distributed system prone to disruption." *Psychiatr Clin North Am* 34(4): 733-745.
- Foltran, R. B. and S. L. Diaz (2016). "BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin?" *J Neurochem* 138(2): 204-221.
- Franco-Robles, E. and M. G. Lopez (2016). "Agavins Increase Neurotrophic Factors and Decrease Oxidative Stress in the Brains of High-Fat Diet-Induced Obese Mice." *Molecules* 21(8).
- Fregni, F., F. Orsati, W. Pedrosa, S. Fecteau, F. A. Tome, M. A. Nitsche, T. Mecca, E. C. Macedo, A. Pascual-Leone and P. S. Boggio (2008). "Transcranial direct current stimulation of the prefrontal cortex modulates the desire for specific foods." *Appetite* 51(1): 34-41.
- Fregni, F. and A. Pascual-Leone (2007). "Technology insight: noninvasive brain stimulation in neurology-perspectives on the therapeutic potential of rTMS and tDCS." *Nat Clin Pract Neurol* 3(7): 383-393.
- Fujisaka, S., I. Usui, A. Bukhari, M. Ikutani, T. Oya, Y. Kanatani, K. Tsuneyama, Y. Nagai, K. Takatsu, M. Urakaze, M. Kobayashi and K. Tobe (2009). "Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice." *Diabetes* 58(11): 2574-2582.
- Galic, S., J. S. Oakhill and G. R. Steinberg (2010). "Adipose tissue as an endocrine organ." *Mol Cell Endocrinol* 316(2): 129-139.
- Goldman, R. L., J. J. Borckardt, H. A. Frohman, P. M. O'Neil, A. Madan, L. K. Campbell, A. Budak and M. S. George (2011). "Prefrontal cortex transcranial direct current stimulation (tDCS) temporarily reduces food cravings and increases the self-reported ability to resist food in adults with frequent food craving." *Appetite* 56(3): 741-746.
- Gosnell, B. A. (2000). "Sucrose intake predicts rate of acquisition of cocaine self-administration." *Psychopharmacology (Berl)* 149(3): 286-292.
- Gregor, M. F. and G. S. Hotamisligil (2011). "Inflammatory mechanisms in obesity." *Annu Rev Immunol* 29: 415-445.
- Harrold, J. A., T. M. Dovey, J. E. Blundell and J. C. Halford (2012). "CNS regulation of appetite." *Neuropharmacology* 63(1): 3-17.
- Hussain, S. S. and S. R. Bloom (2013). "The regulation of food intake by the gut-brain axis: implications for obesity." *Int J Obes (Lond)* 37(5): 625-633.
- Jauch-Chara, K., A. Kistenmacher, N. Herzog, M. Schwarz, U. Schweiger and K. M. Oltmanns (2014). "Repetitive electric brain stimulation reduces food intake in humans." *Am J Clin Nutr* 100(4): 1003-1009.
- Johnson, M. D., H. H. Lim, T. I. Netoff, A. T. Connolly, N. Johnson, A. Roy, A. Holt, K. O. Lim, J. R. Carey, J. L. Vitek and B. He (2013). "Neuromodulation for brain disorders: challenges and opportunities." *IEEE Trans Biomed Eng* 60(3): 610-624.

Kanoski, S. E., R. L. Meisel, A. J. Mullins and T. L. Davidson (2007). "The effects of energy-rich diets on discrimination reversal learning and on BDNF in the hippocampus and prefrontal cortex of the rat." *Behav Brain Res* 182(1): 57-66.

Keen-Rhinehart, E., K. Ondek and J. E. Schneider (2013). "Neuroendocrine regulation of appetitive ingestive behavior." *Front Neurosci* 7: 213.

Kekic, M., J. McClelland, I. Campbell, S. Nestler, K. Rubia, A. S. David and U. Schmidt (2014). "The effects of prefrontal cortex transcranial direct current stimulation (tDCS) on food craving and temporal discounting in women with frequent food cravings." *Appetite* 78: 55-62.

Kershaw, E. E. and J. S. Flier (2004). "Adipose tissue as an endocrine organ." *J Clin Endocrinol Metab* 89(6): 2548-2556.

Kim, J. D., S. Leyva and S. Diano (2014). "Hormonal regulation of the hypothalamic melanocortin system." *Front Physiol* 5: 480.

Krashes, M. J., B. B. Lowell and A. S. Garfield (2016). "Melanocortin-4 receptor-regulated energy homeostasis." *Nat Neurosci* 19(2): 206-219.

Krolow, R., C. G. Noschang, D. Arcego, A. C. Andreazza, W. Peres, C. A. Goncalves and C. Dalmaz (2010). "Consumption of a palatable diet by chronically stressed rats prevents effects on anxiety-like behavior but increases oxidative stress in a sex-specific manner." *Appetite* 55(1): 108-116.

Lackey, D. E. and J. M. Olefsky (2016). "Regulation of metabolism by the innate immune system." *Nat Rev Endocrinol* 12(1): 15-28.

Laste, G., W. Caumo, L. N. Adachi, J. R. Rozisky, I. C. de Macedo, P. R. Filho, W. A. Partata, F. Fregni and I. L. Torres (2012). "After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation." *Exp Brain Res* 221(1): 75-83.

Leal, G., D. Comprido and C. B. Duarte (2014). "BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity." *Neuropharmacology* 76 Pt C: 639-656.

Lebrun, B., B. Bariohay, E. Moyse and A. Jean (2006). "Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and food intake regulation: a minireview." *Auton Neurosci* 126-127: 30-38.

Lehnert, T., D. Sonntag, A. Konnopka, S. Riedel-Heller and H. H. König (2013). "Economic costs of overweight and obesity." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 27(2): 105-115.

Liao, G. Y., J. J. An, K. Gharami, E. G. Waterhouse, F. Vanevski, K. R. Jones and B. Xu (2012). "Dendritically targeted Bdnf mRNA is essential for energy balance and response to leptin." *Nat Med* 18(4): 564-571.

Liebetanz, D., F. Klinker, D. Hering, R. Koch, M. A. Nitsche, H. Potschka, W. Loscher, W. Paulus and F. Tergau (2006). "Anticonvulsant effects of transcranial direct-current stimulation (tDCS) in the rat cortical ramp model of focal epilepsy." *Epilepsia* 47(7): 1216-1224.

Lopez, M., S. Tovar, M. J. Vazquez, L. M. Williams and C. Dieguez (2007). "Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake." *Proc Nutr Soc* 66(1): 131-155.

Lu, Y., K. Christian and B. Lu (2008). "BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory?" *Neurobiol Learn Mem* 89(3): 312-323.

Macedo, Isabel Cristina. Modelo de obesidade e estresse crônico em ratos wistar: avaliação do comportamento alimentar, de anedonia e de níveis centrais de BDNF. 2015. 128f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2015. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/122348>>

Macedo, I. C., C. de Oliveira, R. Vercelino, A. Souza, G. Laste, L. F. Medeiros, V. L. Scarabelot, E. A. Nunes, J. Kuo, F. Fregni, W. Caumo and I. L. Torres (2016). "Repeated transcranial direct current stimulation reduces food craving in Wistar rats." *Appetite* 103: 29-37.

McBride, D., S. P. Barrett, J. T. Kelly, A. Aw and A. Dagher (2006). "Effects of expectancy and abstinence on the neural response to smoking cues in cigarette smokers: an fMRI study." *Neuropsychopharmacology* 31(12): 2728-2738.

Meireles, M., L. M. Rodriguez-Alcala, C. Marques, S. Norberto, J. Freitas, I. Fernandes, N. Mateus, A. Gomes, A. Faria and C. Calhau (2016). "Effect of chronic consumption of blackberry extract on high-fat induced obesity in rats and its correlation with metabolic and brain outcomes." *Food Funct* 7(1): 127-139.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2012) VIGITEL BRASIL 2012-VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO. (<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/portal-dcnt/mais-sobre-portal-dcnt?start=10>, acesso em 20 de julho de 2016).

Montenegro RA, Okano AH, Cunha FA, Gurgel JL, Fontes EB, Farinatti PT (2012). "Prefrontal cortex transcranial direct current stimulation associated with aerobic exercise change aspects of appetite sensation in overweight adults". *Appetite* 58(1): 333-8.

Morton, G. J., T. H. Meek and M. W. Schwartz (2014). "Neurobiology of food intake in health and disease." *Nat Rev Neurosci* 15(6): 367-378.

Morton, G. J. and M. W. Schwartz (2011). "Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism." *Physiol Rev* 91(2): 389-411.

Nakata, M., S. Yamamoto, T. Okada, D. Gantulga, H. Okano, K. Ozawa and T. Yada (2016). "IL-10 gene transfer upregulates arcuate POMC and ameliorates hyperphagia, obesity and diabetes by substituting for leptin." *Int J Obes (Lond)* 40(3): 425-433.

Naslund, E. and P. M. Hellstrom (2007). "Appetite signaling: from gut peptides and enteric nerves to brain." *Physiol Behav* 92(1-2): 256-262.

Naugler, W. E. and M. Karin (2008). "The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer." *Trends Mol Med* 14(3): 109-119.

Nicola, S. M. (2016). "Reassessing wanting and liking in the study of mesolimbic influence on food intake." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*: ajpregu 00234 02016.

Nitsche, M. A., C. Lampe, A. Antal, D. Liebetanz, N. Lang, F. Tergau and W. Paulus (2006). "Dopaminergic modulation of long-lasting direct current-induced cortical excitability changes in the human motor cortex." *Eur J Neurosci* 23(6): 1651-1657.

Noble, E. E., C. J. Billington, C. M. Kotz and C. Wang (2011). "The lighter side of BDNF." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300(5): R1053-1069.

Numakawa, T., N. Adachi, M. Richards, S. Chiba and H. Kunugi (2013). "Brain-derived neurotrophic factor and glucocorticoids: reciprocal influence on the central nervous system." *Neuroscience* 239: 157-172.

Obiany, O. and K. Ye (2013). "Novel small molecule activators of the Trk family of receptor tyrosine kinases." *Biochim Biophys Acta* 1834(10): 2213-2218.

Oliveira, C., C. M. Oliveira, I. C. de Macedo, A. S. Quevedo, P. R. Filho, F. R. Silva, R. Vercelino, I. C. de Souza, W. Caumo and I. L. Torres (2015). "Hypercaloric diet modulates effects of chronic stress: a behavioral and biometric study on rats." *Stress* 18(5): 514-523.

Ooi, C. L., J. L. Kennedy and R. D. Levitan (2012). "A putative model of overeating and obesity based on brain-derived neurotrophic factor: direct and indirect effects." *Behav Neurosci* 126(4): 505-514.

Pandit, R., J. W. de Jong, L. J. Vanderschuren and R. A. Adan (2011). "Neurobiology of overeating and obesity: the role of melanocortins and beyond." *Eur J Pharmacol* 660(1): 28-42.

Parimisetty, A., A. C. Dorsemans, R. Awada, P. Ramanan, N. Diotel and C. Lefebvre d'Hellencourt (2016). "Secret talk between adipose tissue and central nervous system via secreted factors-an emerging frontier in the neurodegenerative research." *J Neuroinflammation* 13(1): 67.

Pecoraro, N., F. Reyes, F. Gomez, A. Bhargava and M. F. Dallman (2004). "Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress." *Endocrinology* 145(8): 3754-3762.

Pelchat, M. L. (2002). "Of human bondage: food craving, obsession, compulsion, and addiction." *Physiol Behav* 76(3): 347-352.

Polania, R., W. Paulus and M. A. Nitsche (2012). "Modulating cortico-striatal and thalamo-cortical functional connectivity with transcranial direct current stimulation." *Hum Brain Mapp* 33(10): 2499-2508.

Rios, M. (2013). "BDNF and the central control of feeding: accidental bystander or essential player?" *Trends Neurosci* 36(2): 83-90.

Rodriguez-Hernandez, H., L. E. Simental-Mendia, G. Rodriguez-Ramirez and M. A. Reyes-Romero (2013). "Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation." *Int J Endocrinol* 2013: 678159.

Rogoz, Z., G. Skuza and B. Legutko (2008). "Repeated co-treatment with fluoxetine and amantadine induces brain-derived neurotrophic factor gene expression in rats." *Pharmacol Rep* 60(6): 817-826.

Ropelle, E. R., M. B. Flores, D. E. Cintra, G. Z. Rocha, J. R. Pauli, J. Morari, C. T. de Souza, J. C. Moraes, P. O. Prada, D. Guadagnini, R. M. Marin, A. G. Oliveira, T. M. Augusto, H. F. Carvalho, L. A. Velloso, M. J. Saad and J. B. Carvalheira (2010). "IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition." *PLoS Biol* 8(8).

Rosas-Vargas, H., J. D. Martinez-Ezquerro and T. Bienvenu (2011). "Brain-derived neurotrophic factor, food intake regulation, and obesity." *Arch Med Res* 42(6): 482-494.

Rosen, A. C., M. Ramkumar, T. Nguyen and F. Hoeft (2009). "Noninvasive transcranial brain stimulation and pain." *Curr Pain Headache Rep* 13(1): 12-17.

Rui, L. (2013). "Brain regulation of energy balance and body weight." *Rev Endocr Metab Disord* 14(4): 387-407.

Sam, A. H., R. C. Troke, T. M. Tan and G. A. Bewick (2012). "The role of the gut/brain axis in modulating food intake." *Neuropharmacology* 63(1): 46-56.

Sanchez-Lasheras, C., A. C. Konner and J. C. Bruning (2010). "Integrative neurobiology of energy homeostasis-neurocircuits, signals and mediators." *Front Neuroendocrinol* 31(1): 4-15.

Sauvaget, A., B. Trojak, S. Bulteau, S. Jimenez-Murcia, F. Fernandez-Aranda, I. Wolz, J. M. Menchon, S. Achab, J. M. Vanelle and M. Grall-Bronnec (2015). "Transcranial direct current stimulation (tDCS) in behavioral and food addiction: a systematic review of efficacy, technical, and methodological issues." *Front Neurosci* 9: 349.

Schmoller, A., T. Hass, O. Strugovshchikova, U. H. Melchert, H. G. Scholand-Engler, A. Peters, U. Schweiger, F. Hohagen and K. M. Oltmanns (2010). "Evidence for a relationship between body mass and energy metabolism in the human brain." *J Cereb Blood Flow Metab* 30(7): 1403-1410.

Schneeberger, M., R. Gomis and M. Claret (2014). "Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance." *J Endocrinol* 220(2): T25-46.

Schwartz, E. and C. V. Mobbs (2012). "Hypothalamic BDNF and obesity: found in translation." *Nat Med* 18(4): 496-497.

Simpson, K. A., N. M. Martin and S. R. Bloom (2009). "Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications." *Arq Bras Endocrinol Metabol* 53(2): 120-128.

Skaper, S. D. (2012). "The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview." *Methods Mol Biol* 846: 1-12.

Sobrinho Crespo, C., A. Perianes Cachero, L. Puebla Jimenez, V. Barrios and E. Arilla Ferreiro (2014). "Peptides and food intake." *Front Endocrinol (Lausanne)* 5: 58.

Sohn, J. W., J. K. Elmquist and K. W. Williams (2013). "Neuronal circuits that regulate feeding behavior and metabolism." *Trends Neurosci* 36(9): 504-512.

Spezia Adachi, L. N., W. Caumo, G. Laste, L. Fernandes Medeiros, J. Ripoll Rozisky, A. de Souza, F. Fregni and I. L. Torres (2012). "Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model." *Brain Res* 1489: 17-26.

Stark, R., S. E. Ashley and Z. B. Andrews (2013). "AMPK and the neuroendocrine regulation of appetite and energy expenditure." *Mol Cell Endocrinol* 366(2): 215-223.

Stenlof, K., I. Wernstedt, T. Fjallman, V. Wallenius, K. Wallenius and J. O. Jansson (2003). "Interleukin-6 levels in the central nervous system are negatively correlated with fat mass in overweight/obese subjects." *J Clin Endocrinol Metab* 88(9): 4379-4383.

Suzuki, K., C. N. Jayasena and S. R. Bloom (2011). "The gut hormones in appetite regulation." *J Obes* 2011: 528401.

Suzuki, K., C. N. Jayasena and S. R. Bloom (2012). "Obesity and appetite control." *Exp Diabetes Res* 2012: 824305.

Suzuki, K., K. A. Simpson, J. S. Minnion, J. C. Shillito and S. R. Bloom (2010). "The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation." *Endocr J* 57(5): 359-372.

Tilg, H. and A. R. Moschen (2006). "Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity." *Nat Rev Immunol* 6(10): 772-783.

Tulloch, A. J., S. Murray, R. Vaicekonyte and N. M. Avena (2015). "Neural responses to macronutrients: hedonic and homeostatic mechanisms." *Gastroenterology* 148(6): 1205-1218.
Tzanavari, T., P. Giannogonas and K. P. Karalis (2010). "TNF-alpha and obesity." *Curr Dir Autoimmun* 11: 145-156.

Ueki, K., T. Kondo and C. R. Kahn (2004). "Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms." *Mol Cell Biol* 24(12): 5434-5446.

Uher, R., D. Yoganathan, A. Mogg, S. V. Eranti, J. Treasure, I. C. Campbell, D. M. McLoughlin and U. Schmidt (2005). "Effect of left prefrontal repetitive transcranial magnetic stimulation on food craving." *Biol Psychiatry* 58(10): 840-842.

Uysal, K. T., S. M. Wiesbrock, M. W. Marino and G. S. Hotamisligil (1997). "Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function." *Nature* 389(6651): 610-614.

Val-Laillet, D., E. Aarts, B. Weber, M. Ferrari, V. Quaresima, L. E. Stoeckel, M. Alonso-Alonso, M. Audette, C. H. Malbert and E. Stice (2015). "Neuroimaging and neuromodulation approaches to study eating behavior and prevent and treat eating disorders and obesity." *Neuroimage Clin* 8: 1-31.

Valdearcos, M., A. W. Xu and S. K. Koliwad (2015). "Hypothalamic inflammation in the control of metabolic function." *Annu Rev Physiol* 77: 131-160.

Vanevski, F. and B. Xu (2013). "Molecular and neural bases underlying roles of BDNF in the control of body weight." *Front Neurosci* 7: 37.

Varela, L. and T. L. Horvath (2012). "Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis." *EMBO Rep* 13(12): 1079-1086.

Velloso, L. A. and M. W. Schwartz (2011). "Altered hypothalamic function in diet-induced obesity." *Int J Obes (Lond)* 35(12): 1455-1465.

Volp, A. C., C. Alfenas Rde, N. M. Costa, V. P. Minim, P. C. Stringueta and J. Bressan (2008). "[Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome]." *Arq Bras Endocrinol Metabol* 52(3): 537-549.

Wang, C., R. J. Godar, C. J. Billington and C. M. Kotz (2010). "Chronic administration of brain-derived neurotrophic factor in the hypothalamic paraventricular nucleus reverses obesity induced by high-fat diet." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298(5): R1320-1332.

Wang, G. J., J. Yang, N. D. Volkow, F. Telang, Y. Ma, W. Zhu, C. T. Wong, D. Tomasi, P. K. Thanos and J. S. Fowler (2006). "Gastric stimulation in obese subjects activates the hippocampus and other regions involved in brain reward circuitry." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(42): 15641-15645.

Wasim, M., F. R. Awan, S. S. Najam, A. R. Khan and H. N. Khan (2016). "Role of Leptin Deficiency, Inefficiency, and Leptin Receptors in Obesity." *Biochem Genet*.

Waterhouse, E. G. and B. Xu (2013). "The skinny on brain-derived neurotrophic factor: evidence from animal models to GWAS." *J Mol Med (Berl)* 91(11): 1241-1247.

Wilson, S. J., M. A. Sayette and J. A. Fiez (2004). "Prefrontal responses to drug cues: a neurocognitive analysis." *Nat Neurosci* 7(3): 211-214.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity and overweight. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>, acesso em 20 de julho de 2016).

Xu, B., E. H. Goulding, K. Zang, D. Cepoi, R. D. Cone, K. R. Jones, L. H. Tecott and L. F. Reichardt (2003). "Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor." *Nat Neurosci* 6(7): 736-742.

Xu, H., G. T. Barnes, Q. Yang, G. Tan, D. Yang, C. J. Chou, J. Sole, A. Nichols, J. S. Ross, L. A. Tartaglia and H. Chen (2003). "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance." *J Clin Invest* 112(12): 1821-1830.

Yoshimura, R., M. Mitoma, A. Sugita, H. Hori, T. Okamoto, W. Umene, N. Ueda and J. Nakamura (2007). "Effects of paroxetine or milnacipran on serum brain-derived neurotrophic factor in depressed patients." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31(5): 1034-1037.

Yu, J. H. and M. S. Kim (2012). "Molecular mechanisms of appetite regulation." *Diabetes Metab J* 36(6): 391-398.

Yu, Y. H., J. R. Vasselli, Y. Zhang, J. I. Mechanick, J. Korner and R. Peterli (2015). "Metabolic vs. hedonic obesity: a conceptual distinction and its clinical implications." *Obes Rev* 16(3): 234-247.

Anexo

Aprovação da Comissão de Ética no Uso de animais

O projeto 11-0455 aprovado pela CEUA/HCPA é um projeto guarda-chuva que abrangeu uma tese de doutorado e esta dissertação de mestrado.



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão Científica e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisaram o projeto:

Projeto: 110455

Data da Versão do Projeto: 02/09/2011

Pesquisadores:

MARIA FLAVIA MARQUES RIBEIRO

ISABEL CRISTINA DE MACEDO

CARLA DE OLIVEIRA

CLEVERSON MORAES DE OLIVEIRA

IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

Título: MODELO DE OBESIDADE ASSOCIADO AO ESTRESSE CRÔNICO: EFEITO SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, MOLECULARES E COMPORTAMENTO ALIMENTAR EM RATOS WISTAR.

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 15 de setembro de 2011.

Dr. Alessandro Bersch Osvaldt
Coordenador da CEUA/HCPA