

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (NUPEB)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (CBIOL)

**A INFLUÊNCIA DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SEVERA
SOBRE O COMPORTAMENTO E PERFIL GLICO-OXIDATIVO
DE RATOS WISTAR**

Lucas Viana Rodrigues

Ouro Preto, 2023

A INFLUÊNCIA DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SEVERA SOBRE O COMPORTAMENTO E PERFIL GLICO-OXIDATIVO DE RATOS WISTAR

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Fisiologia, bioquímica e biologia molecular.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Fernanda Cacilda dos Santos Silva

Coorientadores: Prof.^a Dr.^a. Sílvia de Paula Gomes e Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Jr

Ouro Preto
2023

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

R696a Rodrigues, Lucas Viana.

A influência da restrição alimentar severa sobre o comportamento e perfil glico-oxidativo de ratos wistar. [manuscrito] / Lucas Viana Rodrigues. - 2023.

59 f.: il.: color., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Cacilda dos Santos Silva.

Coorientadores: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Jr, Profa. Dra. Sílvia de Paula Gomes.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Animais - Comportamento. 2. Estresse oxidativo. 3. Distúrbios do metabolismo em animais. 4. Animais - Alimentos. 5. Ratos. I. Silva, Fernanda Cacilda dos Santos. II. Chianca Jr, Deoclécio Alves. III. Gomes, Sílvia de Paula. IV. Universidade Federal de Ouro Preto. V. Título.

CDU 577.12

Bibliotecário(a) Responsável: Paulo Vitor Oliveira - CRB6/2551



FOLHA DE APROVAÇÃO

Lucas Viana Rodrigues

A Influência da Restrição Alimentar Severa sobre o Comportamento e Perfil Glico-oxidativo de Ratos Wistar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de mestre

Aprovada em 14 de novembro de 2023

Membros da banca

Profa. Dra. Fernanda Cacilda dos Santos Silva - Orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)
Profa. Dra. Sílvia de Paula Gomes - Coorientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)
Profa. Dra. Sylvana Izaura Salyba Rendeiro de Noronha - (Universidade Federal de Ouro Preto)
Prof. Dr. Thyago Moreira de Queiroz - (Universidade Federal de Pernambuco)

Fernanda Cacilda dos Santos Silva, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 10/02/2024



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Cacilda dos Santos Silva, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 10/02/2024, às 13:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0667601** e o código CRC **4DF44A25**.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho, contemplado com bolsa CAPES, foi realizado no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, com auxílio da Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Antônio Carlos (*In Memoriam*) e Neuza Viana, pelo tempo e esforço dedicado à minha educação, incentivando e batalhando para que nunca faltasse o necessário para concluir as lutas diárias. Ao meu irmão Filipe que nunca me desamparou e sempre esteve na linha de frente da batalha! Aos meus irmãos do coração Allan Cristian, Denner Dias, Emerson Cícero, Leonardo Perdigão, Gabriel Viana, Milene Conceição e Vítor Viana por compartilhar os momentos bons e ruins, estando presentes sempre!

Agradecimentos

Agradeço a H'shem que me deu a oportunidade, forças e tem me sustentado até aqui.

Ao meu pai Antônio Carlos Rodrigues (*in memoriam*). "As pessoas especiais nunca morrem, elas continuam vivas em nossos corações e memórias para sempre". Obrigado por tudo!

A minha mãe Neuza da Conceição Viana Costa Rodrigues que é a pessoa mais importante da minha vida, o seu amor incondicional a mim dedicado fez toda diferença nessa etapa. Te amo!

Ao meu irmão Filipe Viana Rodrigues, que sempre me incentivou e nunca me deixou desistir. Como sempre dizemos "andamos juntos, morremos juntos Bad Boys para sempre"! A minha cunhada Fabiana Câmara, obrigado pelo carinho e compreensão, vocês dois são um belo time!

As minhas orientadoras, Prof^a. Dr^a. Fernanda Cacilda dos Santos Silva e Prof^a. Dr^a. Silvia de Paula Gomes, agradeço por todo tempo dedicado, os ensinamentos e principalmente pela paciência, que reconheço não ter sido fácil mantê-la, vocês foram essenciais para todo meu crescimento e aprendizado, eu agradeço por tudo!

Aos meus tios Benedito Viana, Neide Viana e Regíl Viana, que foram peças fundamentais para que desse início a minha graduação, permanecendo presentes, sendo receptivos, gentis e amáveis todo o tempo.

Ao meu irmão Professor Me. Allan Cristian Gonçalves em breve PhD, pelo incentivo desde a graduação. Pela amizade nesses dias de grandes lutas, pelas horas divertidas e trocas de conhecimento, obrigado por tudo!

Ao meu grande amigo Emerson Cícero pelo apoio, amizade, confiança e principalmente paciência/compreensão durante essa jornada. Em breve estaremos arrebetando.

Aos meus pais (de coração) Sra. Therezinha Gonçalves e Sr. José Gonçalves de Arruda (Soninho) por me "adotarem", abrindo as portas de sua casa me recebendo como filho, pelos conselhos, paciência e momentos de diversão. Gostaria que soubessem que me senti em casa. Sempre serei grato!

Aos meus amigos que considero como minha família marianense Ingrid Gonçalves, Maxsuell Mendes, Marina Oliveira, Whinter Gonçalves, Flávia Gonçalves, Gustavo

Gomides, Sinval Julião, Dani Maia, Adriana Cotta e Alysson Teixeira pela amizade e parceria, pelos momentos engraçados e diversos churrascos e por deixar os momentos de estresse mais amenos, caminhando lado a lado nessa difícil jornada. Agradeço de coração!

Agradeço aos meus grandes amigos Vitor Viana, Gabriel Viana, Leonardo Perdigão, Maria Luzia Viana, Raimundo Figueiredo, Denner Dias, Letícia Gabriela, Matheus das Dores, Remy Júnior e Milene Conceição agradeço pelas horas divertidas, por tantos conhecimentos repassados, aventuras, dedicação e companheirismo. Por tantos momentos receptivos e confiança. Vocês são um porto seguro, em que a amizade nunca faltou. Amo vocês!

Aos meus amigos do tempo de graduação, Lucas Gualberto, Ricardo Alves e Leonardo Fernandes. A amizade e confiança de vocês sempre foi e é um grande incentivo para batalhar todos os dias nos trilhos da nossa profissão. Obrigado por tudo!

As minhas amigas nutris, que também estão do meu lado desde a graduação, agradeço a Ana Clara Lommez, Janice Teles e Vera Martins pela amizade e apoio nesses momentos! Adoro vocês.

Algumas pessoas nos incentivam e nos dão forças pra continuar, por isso agradeço aos meus primos Júlio e Bianca e agradeço as duas lindas Bruna Alcântara e Bárbara Alcântara pelo apoio nos momentos mais difíceis e pela presença em minha vida mesmo estando tão longe, com uma mensagem ou ligação, e por todo carinho que me foram ofertados.

Ao meu Psicólogo Alexandre Pedrassoli que me estendeu as mãos em um momento extremamente difícil, sendo compreensivo e compassivo nos momentos mais difíceis das severas jornadas me ajudando de maneiras que não posso expressar. Muito obrigado!

Ao Excelentíssimo Brigadeiro Médico Geraldo José, meus sinceros agradecimentos pelo encorajamento e inspiração que me foram transmitidos enquanto ainda trilhava as fronteiras da Força Aérea Brasileira.

Aos meus professores da Faculdade Estácio de Belo Horizonte, principalmente aos que foram e ainda são meus exemplos. Agradeço imensamente a Juliana Ceccato,

Ronaldo Ângelo, Auro Freire, Alessandra Coca, Beatriz Bicalho, Gabriel Quinan, Ronaldo Celso, Gabriel Cordeiro, Gustavo Lara, Gustavo Palhares, Taline, Marco Lobo, Cristiano Arruda, Carla Jeane, Cláudia Braga e Allan Cristian. Vocês são meus exemplos. Obrigado por todo ensinamento transmitido!

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Amanda Nunes e Lucas Gabriel, obrigado por todo tempo dedicado durante os experimentos e ensinamentos, pelos finais de semana tomados e por tornar os momentos leves e divertidos. Aos companheiros(as) do LFC Paulo, Pâmela e a Gabriela, obrigado pelo tempo dedicado aos ensinamentos e disponibilidade a todo momento.

Aos meus queridos amigos e companheiros de curso na UFOP. Josiane Nunes Costa, Marcel Severino, Bruno Teixeira, Aline Coelho, Orlando Pineda, Pedro Alves, Arthur Silveira, Calos A. Carvalho, Edymara Anjos, Sayonara Quaresma e André (in memoriam), a amizade de vocês foi essencial para essa conquista. Muito obrigado por tudo!

Aos técnicos do laboratório, Sra. Marly e Sr Milton, vocês foram imprescindíveis para esse trabalho, não só pelo trabalho dedicado, mas pela amizade, conselhos e ensinamentos. Muito Obrigado!

Aos professores do LFC Prof PhD Deoclécio Chianca Jr, Prof PhD Rodrigo de Menezes, Prof PhD Sylvana de Noronha, Prof Phd Roberto Farina. Obrigado por me receber nessa família, por todo ensinando e auxílio.

A minha casa em Ouro Preto a grande República Serigy e meus irmãos moradores Matheus Kellermann (Etolfo) Samuel Felipe (Laskado), Marcus Vinicius (Aleijadim), Felipe Guedes (Corega) Samuel Santos (Sancho), Giovanni Porto (Zeka), Nicolas (Fukushima), Guilherme Carvalho, Humberto (Gaixparzim) e Humberto Porto (Pré-Natal) não só por me receberem, mas por toda amizade, festas e partidas de sinuca. Ao ex-morador Guilherme Peret pela amizade e conselhos. Aos ex-moradores João Paulo (Pampers), Rafael Montsserrat (Kimba), Gabriel Thadeu (Bucho), Willian Duque (Alface), Arthur Bertoni (Bilbo) e Pedro Teixeira (Januária) pelos momentos compartilhados e pelo reconhecimento, onde sempre fui tratado como um membro da casa. E a nossa Nadir que sempre cuidou e zelou por nós e por nossa casa! Vocês são os melhores! Muito obrigado por tudo!

As Repúblicas Eternamente, Ohana, Minas de Ouro, Meninas Gerais, Harém, Joselitas, Sedução e Mistura Perfeita, os momentos compartilhados jamais serão esquecidos, as moradoras e ex-moradoras a quem tive o prazer de conhecer e desfrutar da companhia, meu muito obrigado! Aos amigos da República Mata Virgem, meu muito obrigado por todo tempo juntos e amizade!

Agradeço ao Centro de Ciência Animal da Ufop e funcionários pelo auxílio e ensinamentos.

Aos professores e componentes dos Laboratórios de Bioquímica Metabólica (LBM), Laboratório de Biotecnologia Metabólica (LBTM), Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM), Laboratório de Fisiopatologia Experimental (LaFEx) por permitir e auxiliar no uso dos equipamentos.

Ao secretário do CBiol, Robson Santiago, por ser sempre prestativo e atencioso na resolução de imprevistos e problemas.

A Universidade Federal de Ouro Preto e ao Laboratório de Fisiologia Cardiovascular pela oportunidade de aprendizagem e crescimento.

“O papel queima, mas as palavras voam para longe”

Rabbi Akiva

Resumo

A restrição alimentar (RA), definida como uma limitação na quantidade de calorias consumidas por um indivíduo, quando severa, provoca déficits nutricionais, metabólicos e comportamentais. Estudos experimentais demonstraram comportamento relacionado à ansiedade em ratas submetidas à RA severa. Além disso, dados da literatura apontaram relação entre danos oxidativos no cérebro (e.g.: na amígdala e no hipocampo), comprometimento do sistema nervoso e aumento dos níveis de ansiedade. Neste estudo, avaliamos os efeitos da restrição alimentar severa, por 14 dias, sobre o comportamento e perfil glico-oxidativo de ratos Wistar. Aos 90 dias de vida, os ratos foram submetidos a uma avaliação alimentar por 14 dias para determinação da média alimentar diária. Posteriormente, foram divididos em grupo controle (GC) e restrito (GR; que recebeu 40% da dieta do GC), e submetidos à 14 dias de protocolo nutricional, seguidos da realização dos testes comportamentais de labirinto em cruz elevado (LCE), caixa claro/escuro (CE) e campo aberto (CA) para avaliação do comportamento do tipo ansiedade e atividade locomotora. Após os testes comportamentais, foram eutanasiados para coleta do plasma, órgãos e tecidos destinados as análises biométricas, metabólicas e de estresse oxidativo. Neste estudo, a RAS promoveu alterações biométricas e metabólicas (i.e.: redução da massa corporal, das massas do fígado e dos tecidos adiposos brancos, e da concentração plasmática de triacilglicerol), mas não alterou a homeostase redox na amígdala e hipocampo. Ademais, aumentou o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos do LCE e reduziu o tempo de permanência nos braços fechados deste aparato. Também elevou o tempo de tomada de decisão e reduziu o tempo no escuro na caixa claro/escuro, indicando um aumento do comportamento exploratório – respostas sugestivas da busca por alimento, cuja motivação de suprir uma necessidade vital potencialmente superou a ansiedade gerada no aparato. Estes achados, contrários aos dados da literatura obtidos em ratas, sugerem um possível dimorfismo sexual na resposta neurobiológica comportamental à RAS e fomenta um novo direcionamento para futuras pesquisas acerca da neurobiologia dos comportamentos relacionados à ansiedade nos contextos de restrição alimentar.

Palavras-chave: restrição alimentar severa, comportamento, estresse oxidativo, labirinto em cruz elevado, caixa claro-escuro.

Abstract

Caloric restriction (CR), defined as a limitation in the calories consumed by an individual, when severe, induces nutritional, metabolic, and behavioral deficits. Experimental studies have demonstrated anxiety-like behavior in female rats subjected to severe CR. Additionally, literature data have indicated a connection between oxidative damage in the brain (e.g., in the amygdala and hippocampus), impairment of the nervous system, and increased levels of anxiety. In this study, we evaluated the effects of severe dietary restriction for 14 days on the behavior and glycoxidative profile of Wistar rats. At 90 days of life, rats were subjected to dietary assessment for 14 days to determine the daily food intake average. Subsequently, they were divided into a control group (CG) and a restricted group (RG; receiving 40% of the CG diet) and subjected to nutritional protocol for 14 days, followed by behavioral tests using the elevated plus-maze (EPM), light/dark box (LD), and open field (OF) to assess anxiety-like behavior and locomotor activity. After the behavioral tests, they were euthanized for plasma, organs, and tissue collection for biometric, metabolic, and oxidative stress analyses. In this study, CR induced biometric and metabolic changes (i.e., reduced body, liver and white adipose tissue masses, and plasma triacylglycerol concentration), but did not alter redox homeostasis in the amygdala and hippocampus. Furthermore, it increased the time spent and the number of entries into the open arms of the EPM and reduced the time spent in the closed arms of this apparatus. It also increased decision-making time and reduced the time in the dark compartment in the light/dark box, indicating an increase in exploratory behavior – suggestive responses of a search for food, whose motivation to meet a vital need potentially overcame the anxiety generated in the apparatus. These findings, contrary to literature data obtained in female rats, suggest a possible sexual dimorphism in the behavioral neurobiological response to RAS and encourage a new direction for future research on the neurobiology of anxiety-related behaviors in contexts of food restriction.

Keywords: dietary restriction, behavior, oxidative stress, elevated plus-maze, light/dark box.

Lista de figuras:

Figura 1 – Labirinto em Cruz Elevado (LCE).	27
Figura 2 – Caixa Claro Escuro (CE).	28
Figura 3 – Campo Aberto (CA).	29
Figura 4 – Variação da massa corporal inicial e final.	32
Figura 5 – Comparação entre massa dos tecidos do coração e do fígado.	33
Figura 6 – Comparação entre a massa dos tecidos rim direito, rim esquerdo, adrenal direita e adrenal esquerda.....	34
Figura 7 – Comparação entre as massas dos tecidos adiposos Retroperitoneal, Inguinal e Epididimal.	35
Figura 8 – LCE: tempo de permanência e número de entradas no braço aberto, braço fechado, quadrante central e número de explorações verticais durante exposição em 300s.....	36
Figura 9 - Caixa Claro Escuro: tempo de permanência e número de entradas nos compartimentos claro e escuro, tempo de reentrada no compartimento claro e tempo de tomada de decisão durante exposição em 300s.....	38
Figura 10 - Campo Aberto: tempo de permanência e número de quadrantes percorridos no centro e na periferia, número de explorações verticais e groomings durante exposição em 300s.....	40
Figura 11 – Comparação no estado oxidativo encefálico por catalase na amígdala e hipocampo e proteína carbonilada na amígdala.	42

Lista de tabelas:

Tabela 1– Efeito da restrição alimentar severa sobre o perfil metabólico de Glicemia, Triacilglicerol e colesterol.....	41
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Lista de abreviaturas:

CA - Campo Aberto

CCA - Centro de Ciência animal

CE - Caixa Claro Escuro

GC - Grupo Controle

GR - Grupo Restrito

LCE - Labirinto em Cruz Elevado

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCO - Proteína Carbonilada

RA - Restrição Alimentar

RAS - Restrição Alimentar Severa

RC - Restrição Calórica

Sumário:

1.	INTRODUÇÃO	18
1.1.	RESTRIÇÃO ALIMENTAR	18
1.2.	CONSEQUÊNCIAS METABÓLICAS E FISIOLÓGICAS DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SEVERA:	19
1.3.	RESTRIÇÃO ALIMENTAR E SUA INFLUÊNCIA NO COMPORTAMENTO	21
1.4.	RESTRIÇÃO ALIMENTAR E ESTRESSE OXIDATIVO ENCEFÁLICO NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS	23
2.	JUSTIFICATIVA:.....	25
3.	OBJETIVOS:.....	26
3.1.	OBJETIVO GERAL:	26
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	26
4.	MATERIAIS E MÉTODOS:.....	27
4.1.	ANIMAIS:	27
4.2.	PROTOCOLO DIETÉTICO:	27
4.3.	TESTES COMPORTAMENTAIS:.....	27
4.3.1.	Labirinto em cruz elevado:	28
4.3.2.	Caixa claro/escuro:	29
4.3.3.	Campo aberto:	29
4.4.	ANÁLISES DO PERFIL METABÓLICO E OXIDATIVO	30
4.4.1.	Perfil metabólico.....	30
4.4.2.	Perfil oxidativo.....	31
4.5.	EUTANÁSIA:	32
4.6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA:.....	32
5.	RESULTADOS:	33
5.1.	EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SEVERA SOBRE A MASSA CORPORAL	33
5.2.	EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SEVERA SOBRE A MASSA DO CORAÇÃO E DO FÍGADO	33
5.3.	EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SEVERA SOBRE A MASSA DOS RINS E ADRENAS	34
5.4.	EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SEVERA SOBRE A MASSA DOS TECIDOS ADIPOSOS: RETROPERITONEAL, INGUINAL E EPIDIDIMAL	35
5.5.	EFEITOS DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SEVERA SOBRE A RESPOSTA COMPORTAMENTAL	36
5.6.	EFEITOS DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SEVERA O PERFIL METABÓLICO	41
5.7.	EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SEVERA SOBRE O ESTADO OXIDATIVO ENCEFÁLICO.....	42

6.	DISCUSSÃO:.....	44
7.	CONCLUSÃO:	50
8.	REFERÊNCIAS:.....	51

1. INTRODUÇÃO

1.1. RESTRIÇÃO ALIMENTAR

A restrição alimentar (RA) é definida como uma limitação na quantidade de calorias consumidas por um indivíduo (De Souza et.al 2021; Apte 2014). Estudos a datar de 1935, realizados por McCay e colaboradores investigaram os efeitos da restrição calórica, em variadas intensidades, sobre o organismo em diferentes contextos na saúde.

A RA pode exercer influências negativas sobre o organismo, proporcionando mudanças nas características físicas, na maturação corporal e na regulação metabólica, dificultando a manutenção da homeostase (Mattson et.al 2014). Barret (2009), aponta que a insegurança alimentar - um fator onde o acesso inadequado a alimentos - fatores econômicos e sociais, podem contribuir para que indivíduos passem por condições e/ou períodos de restrição alimentar. Reduções significativas no consumo alimentar podem promover ao organismo déficits nutricionais de macronutrientes (carboidratos, lipídeos e proteínas) que são fundamentais para a manutenção energética, nutrição dos tecidos e prevenção de doenças crônicas, trazendo suporte a saúde em geral (Venn et.al. 2020); e micronutrientes que fornecem compostos vitamínicos e minerais, os quais são essenciais para manutenção do organismo e sistema imunológico (Berger *et.al* 2021).

No âmbito da nutrição e saúde global, estudos como os realizados por Black et.al. (2008) e Müller et.al. (2005) têm enfatizado a relação entre desnutrição e suas consequências adversas para saúde, especialmente em países em desenvolvimento. Dados apontados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2021, apresentam resultados semelhantes, indicando que mesmo com essa lacuna entre as pesquisas, a desnutrição e insegurança alimentar ainda é um problema persistente atualmente. Black et.al. (2008) apontam que o acesso adequado aos alimentos é uma dificuldade de âmbito mundial, frequentemente desencadeada pela falta de recursos financeiros, o que resulta em escassez de nutrientes, afetando indivíduos em todo o mundo, podendo ser responsável por condições como desnutrição, doenças e óbitos. A privação ao acesso de alimentos representa apenas uma das razões que podem levar

os indivíduos à restrição alimentar. Os motivos recorrentes em indivíduos que passam por períodos de restrição alimentar extrema ou mesmo inanição auto-induzida podem ocorrer por meios de dietas para perda de peso com objetivo estético (Polivy 1996; Neyman-Carlsson 2015), doenças que impossibilitam a alimentação adequada e/ou absorção de nutrientes (por exemplo, anorexia nervosa e depressão) e situações de desastres ou falta de recursos financeiros (Pereira 2005; Rodrigues, Schmitz et.al. 2007; Decrock et.al. 2008). Um estudo realizado por Muller e Krawinkel (2005), apresentou dados que apontam cerca de 300 mil óbitos de crianças em todo mundo em consequência da insuficiência alimentar, fator esse que pode levar indivíduos a desnutrição de macros e micronutrientes.

As condições de diversas populações em que o acesso a alimentos é restrito ou até mesmo nulo, ainda configura um problema socio-econômico apresentado pela OMS em 2021. Estudos pioneiros como o McCay et.al (1935) e Weindruch (1996), apresentam consequências ao organismo de ratos e primatas que a redução na alimentação diária produziu. Esses estudos, com objetivo de apresentar a modulação na maturação dos tecidos, indicavam que a RA poderia produzir efeitos sobre a longevidade, sendo uma possível intervenção contra o envelhecimento. Porém estudos mais recentes apontam que a RAS pode desencadear doenças cardiovasculares (Szafransk *et.al.* 2014 e Masoro 2009) e também comprometer a saúde mental (Fontana et al. 2004 e Cerqueira e Kowaltowski 2010).

Nesse sentido, a RA pode ser classificada de acordo com seu grau de severidade: leve e moderada quando não promovem modificações no funcionamento do organismo, abrangendo uma redução de 10 a 40% da ingestão calórica basal (Garcia-Matas *et. al.* 2015), e severa quando essa redução é igual ou superior a 40% da ingestão, promovendo prejuízos homeostáticos, que podem levar a desequilíbrios metabólicos e fisiológicos (Cerqueira e Kowaltowski 2010).

1.2. CONSEQUÊNCIAS METABÓLICAS E FISIOLÓGICAS DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SEVERA

Estudos relacionam a restrição alimentar a mudanças no funcionamento fisiológico e no metabolismo dos indivíduos. Caballero (2019) aponta os efeitos da RA no tratamento de obesidade, como a redução da massa corporal, mas sugere que a RA pode desencadear distúrbios alimentares posteriores ao período de restrição.

Polivy (1996) explorou as consequências psicológicas que a RA pode desencadear, destacando os aspectos negativos dessa prática, tais como: deficiências cognitivas e distúrbios alimentares (e.g. anorexia e bulimia nervosa). Nyman-Carlsson et.al. (2014) também relaciona distúrbios e doenças alimentares à RA. Considerando que aspectos hormonais e neuroquímicos são igualmente relevantes na investigação dos efeitos da RA, Gauthier *et.al* (2014) aponta transtornos de ansiedade em indivíduos que passaram pela RAS. Adicionalmente, Campos et.al. (2018) aponta alterações no sistema serotoninérgico, que podem ser relacionados a disfunções no controle de ansiedade e pânico. Em se tratando da regulação cardiovascular, De Sousa et.al. (2020) identificou que, mesmo após a recuperação da RAS e da massa corporal, há persistência da sensibilização do sistema renina-angiotensina – o que pode impactar no controle da pressão arterial, na termorregulação, volume de líquidos e sais no corpo e modulações nos componentes da resposta ao estresse.

Os mecanismos moleculares subjacentes à RA também tem sido alvo de investigações. Wu et.al. (2010) e Lee et.al (2010) elucidam a influência de genes como NPAS2, gene codificador de proteínas que tem papel importante na regulação de aquisição de memórias específicas e proteínas Sestrin. Tais proteínas, que exercem função de proteção celular, atuam na resposta à RA auxiliando na manutenção do organismo contra a perda de massa muscular. Wu et al. (2010) e Lee et al.(2010) apontam que métodos dietéticos de RA controlada, como o jejum intermitente, tem sido amplamente estudado e utilizado no tratamento de distúrbios alimentares e no processo de redução da maturação tecidual precoce, porém suas aplicações sem um diagnóstico correto, pode causar implicações ao organismo. Segundo Longo e Mattson (2014), a utilização do jejum intermitente de forma severa, pode causar danos permanentes ao organismo, uma vez que períodos longos e redução severa na ingestão pode levar a períodos de RAS e desnutrição.

Nyman-Carlsson et.al. (2014) apontam que indivíduos que passam por distúrbios alimentares, como a anorexia e bulimia nervosa, também passam por transtornos de RA e sofrem com problemas na saúde mental. Estudos experimentais realizados por Campos et.al. (2018) apontam que a RA em ratas reduziu de tal forma os níveis de colesterol que afetou diretamente nos níveis de estrogênio, relacionando a RAS a alterações no comportamento do tipo ansiedade.

A privação de alimentos afeta diretamente na composição corporal de indivíduos. Essa restrição no padrão alimentar, quando severa, pode afetar o

metabolismo energético pela falta ou redução significativa de insumos, consequentemente influenciando nas funções hepáticas, sensibilidade à insulina, atividades das enzimas antioxidantes e enzimas envolvidas no metabolismo lipídico (de Souza et al.2020). Segundo Lee et.al. (2010), a redução da massa corporal induzida pela RAS, atinge diversos tecidos, como o tecido adiposo e o tecido muscular, levando o organismo a disfunções na termogênese e redução na taxa metabólica basal. Segundo Longo et.al. (2014) a RC pode ocasionar alterações no perfil lipídico, uma vez que, com a redução de nutrientes ingeridos, as reservas de glicogênio passam a ser a fonte energética utilizada, alterando também as funções enzimáticas da acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintase, reduzindo o estoque lipídico dos adipócitos e dos índices de triglicerídeos sanguíneos.

Segundo Oksana et.al. (1999) a RAS pode levar ratos, por meio de adaptações fisiológicas e metabólicas, a entrar em estado de torpor. Estado esse que o organismo, ao passar por condições de escassez de alimentos, secas ou baixas temperaturas, reduz significativamente as funções nos órgãos vitais, como cérebro, fígado e pâncreas, reduzindo a temperatura corporal e economizando energia, podendo levar de dias até seis meses, onde esses animais podem ter redução de até metade da sua massa corporal, apresentando baixas de glicose, triglicerídeos e colesterolis.

1.3. RESTRIÇÃO ALIMENTAR E SUA INFLUÊNCIA NO COMPORTAMENTO

A RA, além das repercussões supracitadas, pode levar a alterações comportamentais. Estudos como o de DiVasta *et.al.* (2010) sugerem que há uma relação entre a restrição alimentar severa e os transtornos alimentares, como a anorexia nervosa, que por sua vez pode ser relacionada a distúrbios comportamentais ansiogênicos, compulsivos e depressivos, causando redução na qualidade de vida e aumentando a taxa de mortalidade (Nyman-Carlsson 2014). Campos *et.al.* (2018), aponta que indivíduos que sofrem com o transtorno de anorexia nervosa, que é caracterizada por restrições severas ou totais na alimentação, apresentam altos níveis de ansiedade (Campos *et.al.* 2018).

Com a extensão dos distúrbios alimentares, a progressão de doenças cardiovasculares e renais provenientes da restrição alimentar severa ou de nutrientes específicos depõe como um problema de saúde pública (Gauthier *et.al.* 2014).

Segundo Jean-Patrice *et.al.* (2008), os transtornos restritivos evitativos, quando persistentes, podem conduzir indivíduos a uma deficiência nutricional grave, como a má formação e maturação acarretando até mesmo disfunções psicossociais (Jean-Patrice *et.al.* 2008). Já Gauthier *et.al.* (2014), apresenta que a ligação entre o estado de restrição alimentar e comportamento de ansiedade, depressão, compulsão alimentar e impulsividade se relacionam a modulações nas vias serotoninérgicas que são capazes de influenciar neste contexto (Gauthier *et.al.* 2014).

Na estrutura do sistema neural, o conceito de apetite é denominado por Halford *et.al.* 2000, como um controle fisiológico para garantir substratos para despesas energéticas do organismo, sendo descritas como traduções para necessidades de impulso. Ao sinal de necessidade de combustíveis, o próprio sistema tem alternativas para ofertá-los sem que seja necessária a ingestão, utilizando de reservas onde a ação de hormônios e peptídeos são fundamentais para saciedade de ação rápida (Halford *et.al.* 2000). A restrição alimentar prolongada, segundo Morley e Blundell (1988) em estudo pioneiro, promove alterações neurobiológicas e metabólicas, diminui a ativação do sistema dopaminérgico e causa disfunção no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), podendo levar indivíduos a desenvolverem transtornos alimentares relacionados à saciedade e apetite (Morley e Blundell 1988). Estudos sobre os aspectos comportamentais derivados da privação alimentar, indicam que tal estado pode ocasionar comportamento do tipo ansiedade, redução na atividade locomotora e alterações de memória e aprendizado (Halagappa *et.al.* 2007).

Em face à RA, RAS, fome ou jejum prolongado pode ocorrer déficits na produção de leptina, peptídeo que desempenha papel importante na regulação energética e ingestão alimentar, acarretando déficit de consumo de nutrientes importantes para manutenção energética com consequente aumento da utilização dos tecidos adiposos como fonte energética. Com a redução ou inibição da alimentação, pode ocorrer ao organismo a redução da sensibilização dos receptores de dopaminas, afetando também os receptores de serotonina e aumentando as chances de desenvolvimento de ansiedade (Morley *et.al.* 1988, Schwartz *et.al.* 2000).

Mattson *et.al.* (2015) e Mark *et.al.* (2005) apontam a influência dessas alterações neuroquímicas na produção e captação de serotonina, dopamina, noradrenalina, cortisol e hormônio do crescimento de com distúrbios comportamentais em ratos. Estudos como o de Soubrie *et.al.* (1986) indicam a regulação de serotonina em humanos e animais, sendo um fator primordial na regulação do humor, emoções,

sono, apetite e comportamento. Estudo esse que pode ser relacionado ao estudo de Kaye (2007) que indica os mecanismos que influenciam os distúrbios alimentares, apresentando redução na capacidade de liberação e captações hormonais, indicando que tais reduções podem ser relacionadas a transtornos comportamentais, como ansiedade, depressão, anorexia e bulimia nervosa, abrindo um leque para que se promova estudos que relacione os fatores alimentares ao comportamento.

1.4. RESTRIÇÃO ALIMENTAR E ESTRESSE OXIDATIVO ENCEFÁLICO NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS

Doenças e distúrbios alimentares que tem relações diretas com a RA tem sido associadas à alterações comportamentais, como ansiedade e depressão. Estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo encefálico desempenha um papel fundamental na regulação do comportamento (Gavrilova et al. 1999) e tem despertado crescente interesse nas áreas da neurociência e da saúde. Recentemente, pesquisas reforçaram que o estresse oxidativo (EO) encefálico pode influenciar a saúde mental e comportamento (Sies 2015; Sies 2017). Maes et al. (2011) analisaram as vias de estresse oxidativo e sua influência na depressão, e sua possível contribuição para os processos neurodegenerativos associados a essa doença. Maes *et.al* (2011) e Li *et.al* (2015) citam a associação de doenças neuropsiquiátricas com o comprometimento da plasticidade neuronal e funções cognitivas por meio do EO.

No campo da psicologia e neurociência comportamental, Bahi (2016) evidencia as modulações de comportamentos associados à ansiedade derivadas de uma restrição de nutrientes, fornecendo uma compreensão mais profunda dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação emocional e no desenvolvimento neurológico. Essa abordagem é fundamental para compreender os efeitos dos radicais livres e dos antioxidantes no organismo, uma vez que foram relacionados a doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e cancerígenas (Valko et al., 2007), evidenciando os prejuízos na plasticidade neural e implicações derivadas do EO no hipocampo e alterações no comportamento das células da glia, gerando respostas inflamatórias no cérebro (Cerqueira *et.al* 2007 e Hao *et.al* 2015), propondo alternativas, no tratamento e possíveis estratégias para atenuar os danos oxidativos e comportamentais, promovendo a melhora na saúde cerebral (Pereira *et.al* 2007).

Além disso, estudos sobre a RC e jejum intermitente têm revelado modulações por meio do EO no sistema cardiovascular e cerebral em escalas leves e severas

(Mattson & Wan, 2005). Essas investigações destacam a importância de compreender os mecanismos do EO no âmbito das doenças psiquiátricas e neurodegenerativas. (Maes *et.al* 2011).

Neste contexto, é relevante investigar os mecanismos envolvidos na resposta comportamental e no perfil glico-oxidativo decorrente da RAS. Sendo assim, hipotetizamos que a RAS causaria resposta comportamental do tipo ansiedade associada à alterações no perfil glico-oxidativo e ao comprometimento da homeostase redox na amígdala e hipocampo.

2. JUSTIFICATIVA

Grande parte da população mundial enfrenta períodos de privação de alimentos por meio da insegurança alimentar (i.e: falta/ acesso inadequado aos alimentos), doenças, e/ou distúrbios alimentares, motivo esse que é causa de inúmeros óbitos em todo mundo. Igualmente atingindo uma grande parte da população, doenças comportamentais, como a ansiedade, apresenta alta prevalência e isso tem se tornado motivo de diversos estudos, onde o tratamento eficaz é algo a ser descoberto.

Com toda a atenção voltada para resoluções dessas doenças psicológicas e combate a fome no mundo, estudos relacionando a RAS e o comportamento do tipo ansiedade vem se tornando cada vez mais necessários, para melhor compreensão e resolução de tratamentos. Estudos tem apresentado evidencias que déficits nutricionais estão associados a prejuízos no desenvolvimento e maturação corporal, afetando regiões encefálicas, podendo causar prejuízos hormonais e problemas cognitivos ligados a memória, emoções e comportamento.

A falta de consistência nos resultados obtidos até o presente momento acerca da relação entre RA e resposta comportamental, indica a necessidade de novos estudos para investigar as relações e causas que podem ser gatilhos para o desenvolvimento e evolução da ansiedade, compreendendo os aspectos fisiológicos e moleculares envolvidos. Portanto, torna-se fundamental investigar os mecanismos envolvidos e as consequências decorrentes da RAS sobre o comportamento e perfil glico-oxidativo.

Os resultados obtidos a partir desta pesquisa têm o potencial de contribuir para uma melhor compreensão fisiopatológica dos efeitos da restrição alimentar severa nas alterações comportamentais, além de fornecer informações relevantes para novos estudos e desenvolvimento de medidas de prevenção e tratamento dessas alterações em indivíduos submetidos a condições de restrição alimentar severa.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL:

Avaliar os efeitos da restrição alimentar severa sobre o comportamento e perfil glico-xidativo de ratos wistar.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Avaliar os efeitos da restrição alimentar severa, por 14, dias em ratos Wistar sobre os seguintes parâmetros:

- Massa corporal e dos seguintes órgãos e tecidos: coração, fígado, rins, adrenais e tecidos adiposos retroperitoneal, inguinal e epididimal;
- Comportamento do tipo ansiedade e atividade locomotora;
- Níveis plasmáticos de glicose, triacilglicerol e colesterol total;
- Perfil oxidativo na amígdala e no hipocampo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS:

Foram utilizados 60 ratos da linhagem Wistar com 21 dias de vida, pesando entre 45g e 55g, provenientes do Centro de Ciência Animal – CCA da Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP. Os animais foram alocados no biotério do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular – LFC, onde permaneceram por 69 dias em gaiolas coletivas 17cmx41cmx34cm (4 animais por gaiola). Foram mantidos em temperatura de $23^{\circ}\pm 1^{\circ}$, com ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 06:00 da manhã) com ração padrão e água filtrada *ad libitum*. Ao completarem os 90 dias de vida, os animais foram separados aleatoriamente em pares por gaiola. Permaneceram até o fim do protocolo experimental, onde todos os procedimentos foram aprovados pelo do Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP (CEUA-UFOP Protocolo n° 7865131021).

4.2. PROTOCOLO DIETÉTICO:

Após completarem 90 dias de vida os animais foram submetidos a uma avaliação alimentar por 14 dias, sendo ofertado 30g de ração por rato/por dia. As sobras foram pesadas semanalmente para obter uma média alimentar diária. Ao finalizar os 14 dias de protocolo os animais foram pesados e separados em grupos controle (GC) e restritos (GR). Ambos os grupos receberam água *ad libitum*, o GC recebeu dieta *ad libitum* e o GR recebeu 40% da dieta anteriormente mensurada (i.e.: foi submetido à restrição alimentar de 60%) (de Souza *et.al.* 2015 e de Souza *et.al.* 2020). Para garantir o consumo supracitado, foi colocado uma barreira de acrílico separando os animais durante o período de alimentação (tempo aproximado de 3 horas). O GC também foi separado pela barreira de acrílico, pelo mesmo período que o GR para submeter ambos os grupos à mesma condição de separação temporária.

4.3. TESTES COMPORTAMENTAIS:

Ao final dos 14 dias de restrição alimentar, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de labirinto em cruz elevado (LCE), caixa claro/escuro (CE) e campo aberto (CA) por 300 segundos cada, para avaliação do comportamento do tipo ansiedade e atividade locomotora. A sala de experimento foi mantida livre de ruídos e

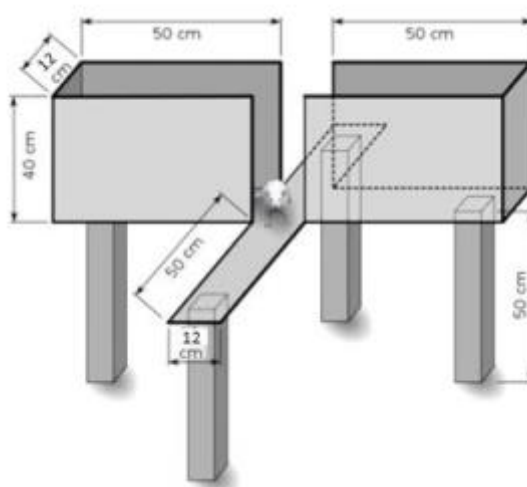
em iluminação de 60 lux. Os animais foram colocados na sala 30 minutos antes do início do experimento para ambientalização. Os testes foram filmados por uma câmera, instalada acima dos aparatos para execução das análises. Após finalizar os testes de cada animal os aparatos foram higienizados com álcool 20% (de Noronha *et.al.*2017 e de Souza *et.al.* 2020)

4.3.1. Labirinto em cruz elevado:

O labirinto em cruz elevado é um aparato constituído por dois braços fechados com paredes de 40 cm de altura, por dois braços abertos e um quadrante central que liga os braços. Ambos os braços possuem a mesma proporção (50 cm de comprimento x 12 cm de largura) e 50cm elevados do chão. O teste é fundamentado pela premissa de que os roedores têm comportamento de medo inato a altura e locais abertos e têm preferências a locais escuros e fechados (Handley *et.al.* 1984).

Para realizar o teste, os ratos foram colocados no centro do aparato com o focinho direcionado para a entrada de um dos braços fechados, ficando livre para exploração do aparato por 300 segundos. Foram avaliados o número de entradas e o tempo de permanência em cada braço, bem como no centro do aparato. Também foi avaliado o número de explorações verticais. Assim, os testes são interpretados com alterações no comportamento defensivos do tipo ansiedade, quando os roedores evitam o ambiente aberto e permanecem mais tempo nos braços fechados (Handley *et.al.* 1984, Treit *et.al.* 1993, Walf *et.al.* 2007).

Figura 1 – Labirinto em Cruz Elevado

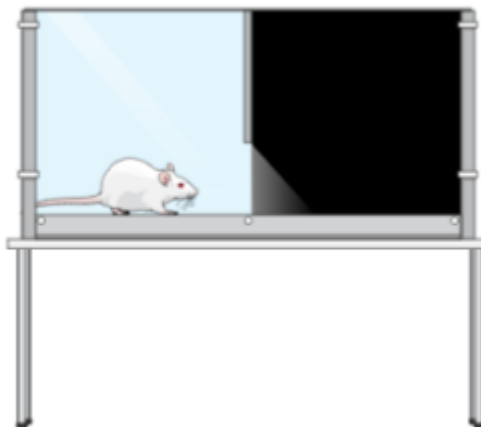


Fonte: Adaptado de commons.wikimedia.org

4.3.2. Caixa claro/escuro:

A caixa claro/escuro é um aparato que tem duas repartições, sendo um compartimento transparente e um compartimento escuro, ligados por uma abertura de aproximadamente 10 cm para que animal possa ir de um lado ao outro. Os animais têm comportamento inato de aversão à luminosidade e exploração do aparato (Crawley e Goodwin 1980). Foram colocados no compartimento claro da caixa dando início ao teste somente após a primeira entrada no compartimento escuro. Neste teste de duração de 300 segundos, foram avaliados os tempos e número de entradas nos compartimentos claro e escuro, tempo de reentrada, tempo de tomada de decisão (i.e.:o tempo em que o animal fica parado entre os ambientes sem explorá-los). Foram interpretadas pelo comportamento do tipo ansiedade, demonstrado quando os animais neste estado permanecem mais tempo no compartimento escuro evitando o ambiente aversivo que é o ambiente com luminosidade (de Noronha *et.al* 2017, Crawley e Goodwin 1980, Bourin 2003).

Figura 2 – Caixa Claro Escuro (CE)



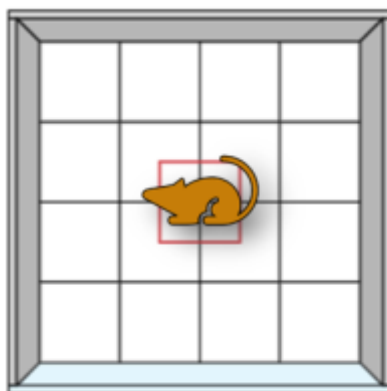
Fonte: plataforma *Mind the Graph* (www.mindthegraph.com).

4.3.3. Campo aberto:

O teste de campo aberto é realizado em uma caixa de acrílico quadrada na cor preta (60 cm de largura x 60 cm de altura x 40 cm de profundidade), cuja base é dividida em quadrantes (centrais e periféricos). Neste teste foi avaliado o

comportamento do tipo ansiedade e atividade locomotora, sendo o comportamento de conflito inato dos animais em explorar ambientes aversivos (i.e.: o centro do aparato) ou se manter na periferia que é um ambiente seguro (Carola *et.al* 2002, Prut *et.al*. 2003, Lovick 2021). Para início do teste que também apresenta duração de 300 segundos, o animal foi posicionado no centro do aparato (Carola *et.al* 2002). Neste teste foram avaliados o número de quadrantes percorridos ao todo, na periferia e no centro, bem como o número de explorações verticais, e o número e tempo de groomings (i.e: limpeza corporal) (Garcia *et.al*. 2005).

Figura 3 – Campo Aberto (CA)



Fonte: plataforma *Mind the Graph* (www.mindthegraph.com)

4.4. ANÁLISES DO PERFIL METABÓLICO E OXIDATIVO

4.4.1. Perfil metabólico

Dosagem da glicemia

A concentração de glicose foi determinada por amostras de plasma pelo método colorimétrico (absorbância de 505nm) utilizando o kit Glicose monoreagente (k082; Bioclin - Quibasa Química Básica Ltda; Minas Gerais, Brasil) e o Leitor de absorbância em microplacas ELX808 (Biospectro). Os cálculos foram efetuados segundo a fórmula: $Glicose\ (mg/dl) = (absorbância\ do\ teste / absorbância\ do\ padrão) \times 100$. $Glicose\ (mg/dl) = (absorbância\ da\ amostra \times fator\ de\ calibração)$. Os resultados foram expressos em mg/dl.

Dosagem do colesterol

A concentração sérica de colesterol total e colesterol-HDL foi mensurada pelo método colorimétrico (absorbância de 500nm) utilizando o kit Colesterol Monoreagente (K083; Bioclin – Quibasa Química Básica Ltda; Minas Gerais, Brasil) e o Leitor de absorbância em microplacas ELX808 (Biospectro). Os cálculos foram efetuados seguindo a fórmula: colesterol total (mg/dl) = (absorbância do teste – absorbância do padrão) x200. Os resultados foram expressos em mg/dl.

Dosagem do triacilglicerol (TAG)

A concentração sérica de TAG foi mensurada pelo método colorimétrico (absorbância de 505nm) utilizando o kit Triglicérides Monoreagente (K117; Bioclin – Quibasa Química Básica Ltda; Minas Gerais, Brasil) e o Leitor de absorbância em microplacas ELX808 (Biospectro). Os cálculos foram efetuados segundo a fórmula: TAG (mg/dl) = (absorbância do teste/ absorbância do padrão) x 200. Os resultados foram expressos em mg/dl.

4.4.2. Perfil oxidativo

Proteínas carboniladas

A concentração de proteínas carboniladas foi determinada pelo método descrito por Levine et al. (1994). Os grupos carbonilas foram detectados pela produção de 2,4-dinitrofenilhidrazona (370 nm) após a adição de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). A concentração de PCO na amostra foi estimada utilizando o coeficiente de extinção molar da hidrazona ($22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e os valores foram expressos em μmol de PCO/ mg de proteína.

Catalase

A atividade da enzima catalase foi determinada pelo método descrito por Beers & Sizer (1952), via monitoramento do desaparecimento do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em 230 nm. Os resultados foram expressos em mmol de H_2O_2 consumido/min/mg de proteína.

4.5. EUTANÁSIA:

No dia seguinte aos testes comportamentais, os animais foram individualmente pesados e anestesiados com Isoflurano por via inalatória, em uma dose de 2,5% em 3L/min de O₂. Em seguida, foram submetidos à decapitação, com auxílio de guilhotina (17). Posteriormente foram coletadas as regiões encefálicas (hipocampo e amígdalas) que foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Foram coletados coração, fígado, rins e adrenais, sendo pesados e congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em um freezer a menos 80°. Em seguida, a tibia foi coletada e medida. Os tecidos adiposos retroperitoneal, inguinal, epididimal também foram mensurados.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

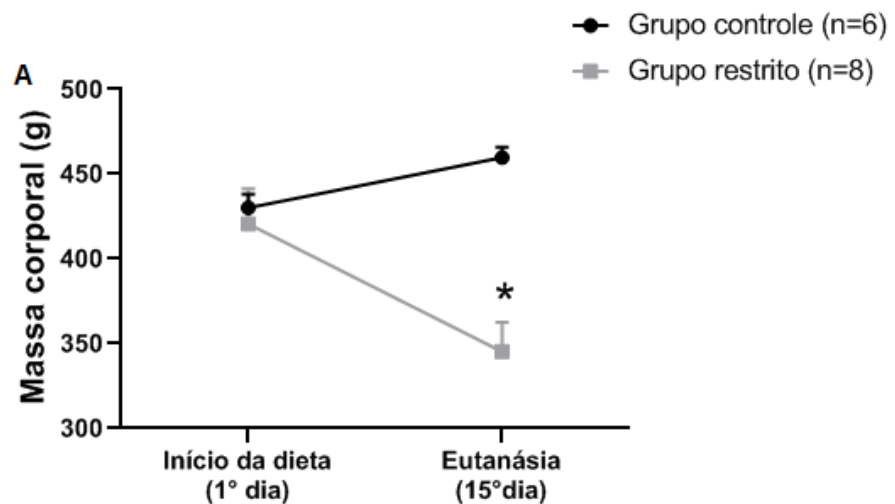
As análises estatísticas foram realizadas no Software GraphPad Prism (versão 8.0.2.263). *Outliers* foram identificados por meio do teste de Grubbs (ESD-*extreme studentized deviate*), considerando $\alpha=0,05$ e removidos das análises. Os dados foram avaliados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Para análise estatística foram realizados ANOVA two-way para avaliação da massa corporal e para os demais dados, Teste T de Student para dados paramétricos e teste *Mann-Whitney* para não paramétricos. Os resultados foram expressos como média, média \pm desvio padrão para dados paramétricos ou mediana e intervalo interquartil [mediana: (1° Quartil - 3° Quartil)] para dados não paramétricos. O nível de significância considerado para as análises foi de $p<0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SEVERA SOBRE A MASSA CORPORAL

A massa corporal basal foi aferida no dia inicial e após a conclusão do protocolo de restrição alimentar (i.e.: no dia da eutanásia), conforme demonstrado na Figura. 4. O teste ANOVA Two-way indicou que a restrição [$F(1, 22) = 93,49$; $p < 0,0001$], o tempo [$F(1, 22) = 12,66$; $p = 0,0018$] e a interação (restrição x tempo) [$F(1, 22) = 66,79$; $p < 0,0001$] alteraram a massa corporal dos grupos avaliados. O pós-teste de Sidak revelou que, no início do experimento os animais apresentaram massas corporais semelhantes, demonstrando um ponto de partida igualitário (GC: $430,1 \pm 7,92$ g vs. GR: $420,5 \pm 20,95$ g; $p = 0,8838$). Ao final do protocolo de RAS, os animais do GR apresentaram redução significativa da massa corporal (GR: $345,3 \pm 17,34$ g vs. GC: $459,7 \pm 5,98$ g; $p < 0,0001$).

Figura 4 - Massa corporal do início e final do protocolo de RAS

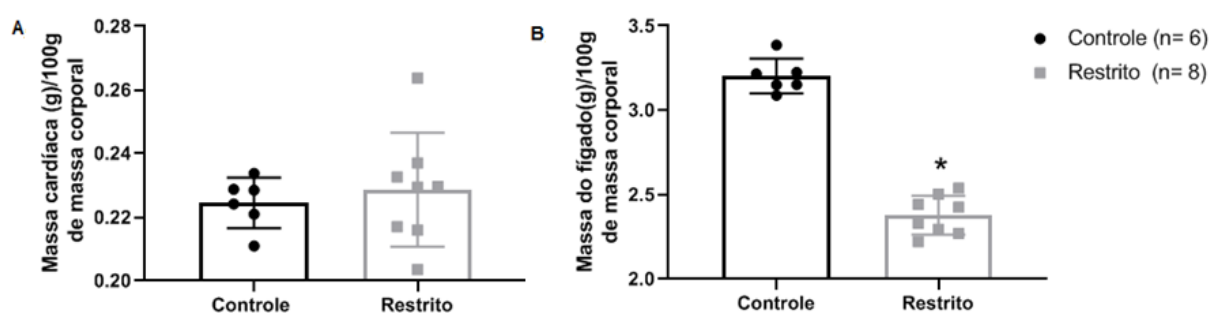


A: Massa corporal basal (g) (aferida no dia inicial do protocolo) e final (aferida no dia da eutanásia). Dados paramétricos: analisados por teste Anova two-way e pós-teste de Sidak e expressos em média \pm DP. Diferença significativa: $p < 0,05$.

5.2. EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SEVERA SOBRE A MASSA DO CORAÇÃO E DO FÍGADO

A figura 5 demonstra que a RAS não alterou a massa cardíaca (Fig. 5A: GR: $0,23 \pm 0,02$ vs. GC: $0,23 \pm 0,01$; $p = 0,6108$), mas reduziu a massa do fígado (Fig. 5B: GR: $2,38 \pm 0,12$ vs GC: $3,20 \pm 0,10$; $p = 0,001$).

Figura 5 - Efeitos da RAS sobre a massa do coração e do fígado

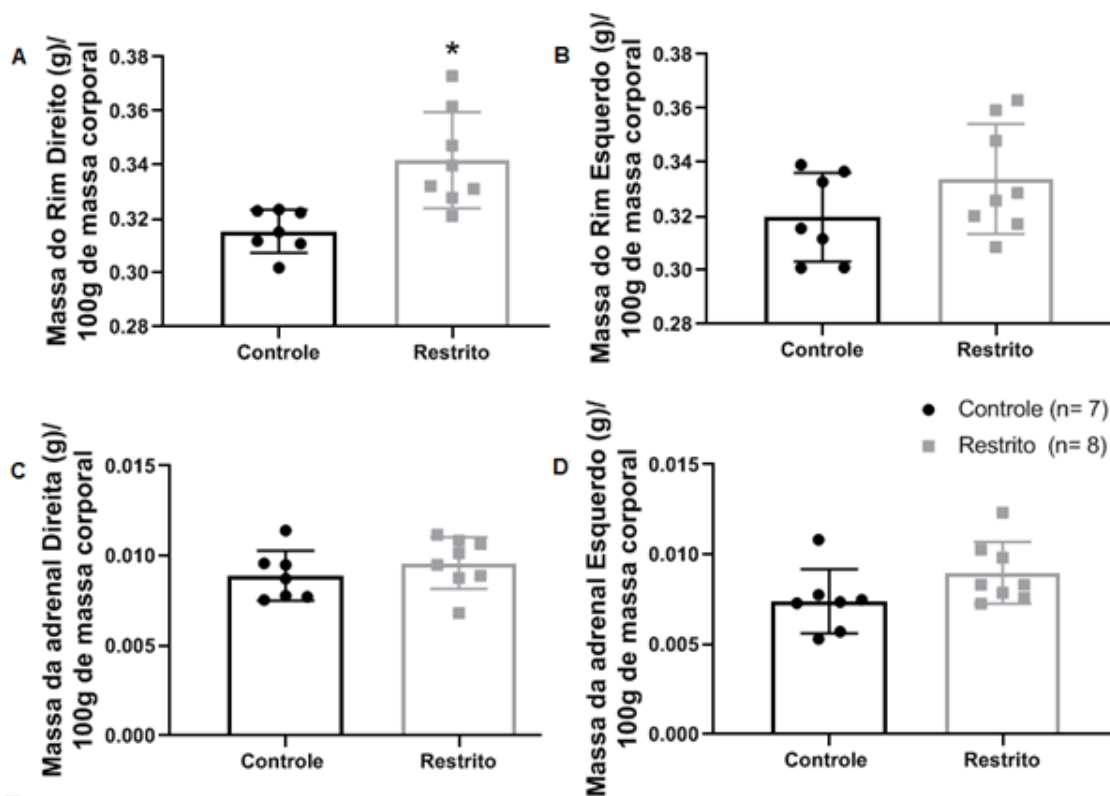


As massas cardíacas e dos fígados foram corrigidas por cada 100g de massa corporal do animal. A: Massa cardíaca (g); B: Massa do fígado (g). Os dados paramétricos: analisados por teste *t* não pareado e expressos em média \pm DP.

5.3. EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SEVERA SOBRE A MASSA DOS RINS E ADRENAIS

A figura 6 aponta que a RAS induziu um aumento na massa do rim direito (Fig. 6A: GR: $0,35 \pm 0,008$ vs. GC: $0,32 \pm 0,02$; $p = 0,0034$), mas não reduziu nem aumentou a massa do rim esquerdo (Fig. 6B: GR: $0,34 \pm 0,02$ vs. GC: $0,32 \pm 0,02$; $p = 0,1651$) no grupo restrito em comparação com o grupo controle. Em relação às adrenais, a RAS não provocou alterações na massa da adrenal direita (Fig. 6C: GR: $0,009 \pm 0,002$ vs. GC: $0,008 \pm 0,002$; $p = 0,3541$), bem como na adrenal esquerda (Fig. 6D: GR: $0,009 \pm 0,002$ vs. GC: $0,007 \pm 0,002$; $p = 0,1039$) em comparação do GR ao GC.

Figura 6 - Efeitos da RAS sobre parâmetros da massa dos tecidos do RD, RE, AD e AE.

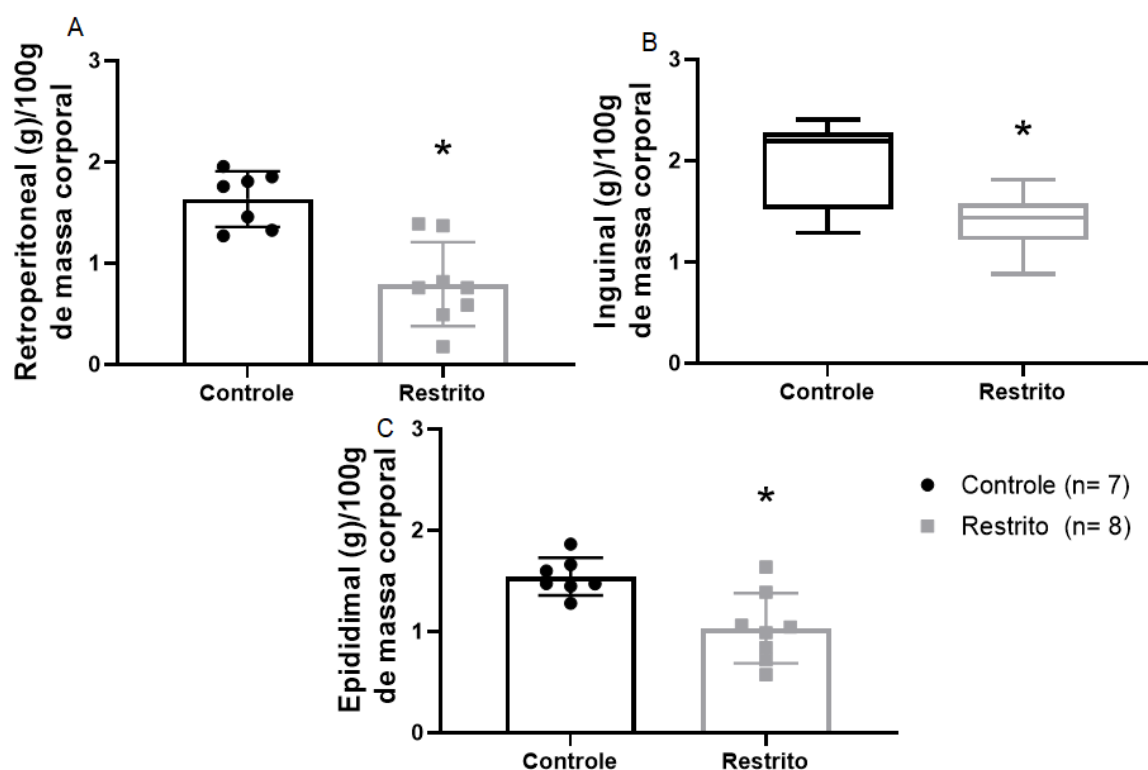


As massas dos tecidos foram corrigidas por cada 100g de massa corporal do animal A: Massa do Rim Direito (g); B: Massa do Rim Esquerdo (g); C: Massa da Adrenal Direita; D: Massa da Adrenal Esquerda. Dados paramétricos: analisados por teste t não pareado e expressos em média \pm DP. Diferença significativa: $p = <0,05$.

5.4. EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SEVERA SOBRE A MASSA DOS TECIDOS ADIPOSOS: RETROPERITONEAL, INGUINAL E EPIDIDIMAL

A figura 7 demonstra os efeitos da RAS sobre a massa dos tecidos adiposos brancos, onde foram apresentadas reduções no tecido adiposo retroperitoneal (Fig. 7A: GR: $0,79 \pm 0,41$ vs. GC: $1,64 \pm 0,27$; $p = 0,0006$), assim como no tecido adiposo inguinal (Fig. 7B: GR: $1,44$: ($1,22 - 1,58$) vs. GC: $2,19$: ($1,53 - 2,28$); $p = 0,0289$) e também no tecido adiposo epididimal (Fig. 7C: GR: $1,03 \pm 0,35$ vs. GC: $1,54 \pm 0,18$; $p = 0,0041$) em comparação do grupo restrito ao grupo controle.

Figura 7 - Efeito da RAS sobre os parâmetros dos tecidos adiposos Retroperitoneal, Inguinal e Epididimal.



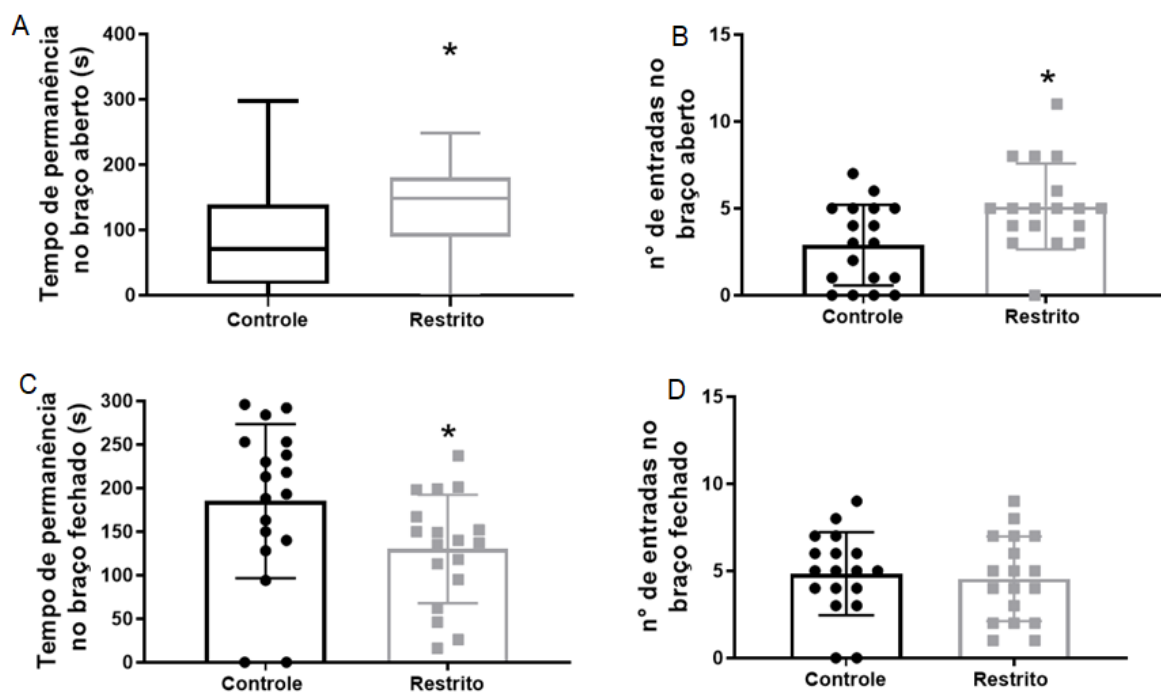
As massas dos tecidos foram corrigidas por cada 100g de massa corporal do animal A: Massa do Tecido adiposo Retroperitoneal (g); B: Massa do Tecido adiposo Inguinal (g); C: Massa do Tecido adiposo Epididimal (g). Dados paramétricos: analisados por teste t não pareado e expressos em média \pm DP. Dados não paramétricos: analisados por U-teste Mann-Whitney e expressos em mediana: (1º Quartil - 3º Quartil). Diferença significativa: $p < 0,05$.

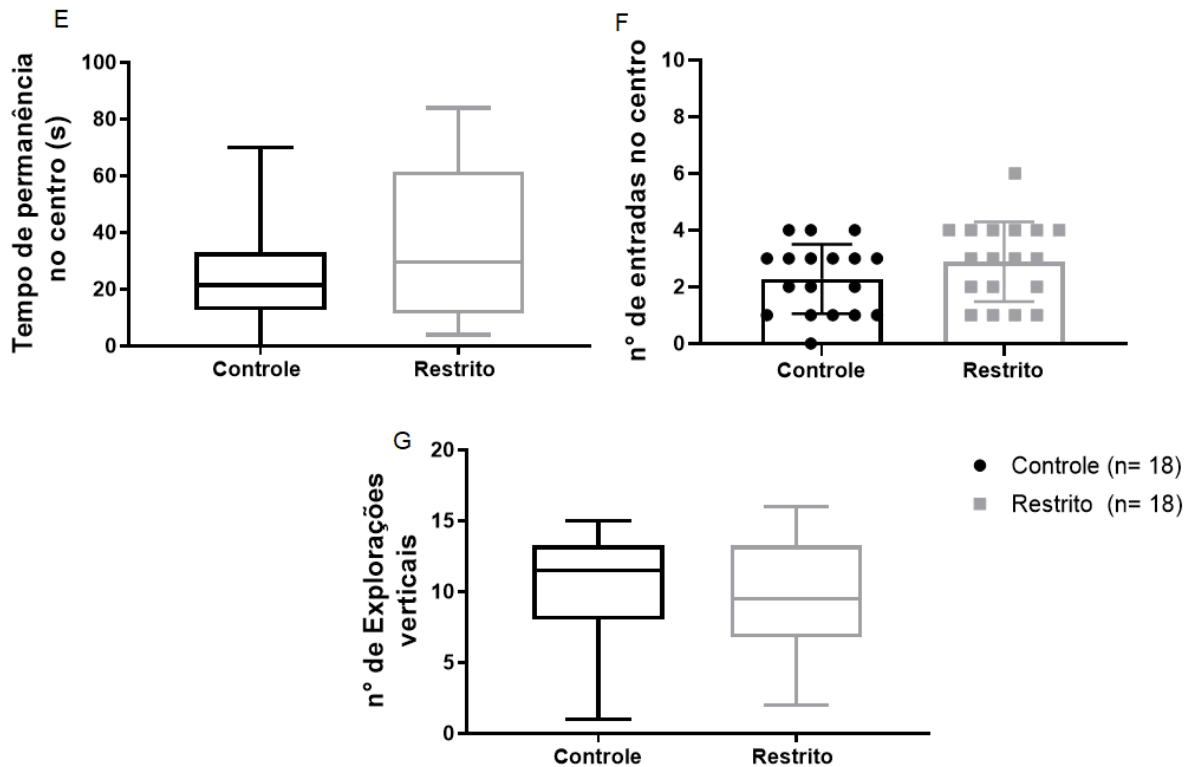
5.5. EFEITOS DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SEVERA SOBRE A RESPOSTA COMPORTAMENTAL

Na figura 8 foram expressos os efeitos da RAS sobre a resposta comportamental dos ratos avaliadas no labirinto em cruz elevado, onde foi apresentado aumento no tempo de permanência nos braços abertos (Fig. 8A: GR: 148,5: (89,75 – 180,5) s vs. GC: 70,5: (17,25 – 139,3) s; $p = 0,0362$). Também foi observado aumento no número de entradas nos braços abertos (Fig. 8B: GR: 5,12 \pm 2,47 vs. GC: 2,89 \pm 2,33; $p = 0,0088$) no grupo restrito em comparação com o grupo controle. Foi identificado redução no tempo de permanência nos braços fechados (Fig. 8C: GR: 130,1 \pm 62,22 s vs. GC: 185,2 \pm 88,55 s; $p = 0,0379$), mas não houve alteração no número de entradas nos braços fechados (Fig. 8D: GR: 4,56 \pm 2,43 vs. GC: 4,84 \pm 2,38; $p = 0,7313$) na comparação do GR ao GC. Não foi indicado alterações no tempo

de permanência no centro (Fig. 8E: GR: 29,50: (11,25 – 61,50) s vs. GC: 21,50: (12,50 – 33,00) s; $p = 0,3843$), bem como no número de entradas no centro (Fig. 8F: GR: $2,89 \pm 1,41$ vs. GC: $2,28 \pm 1,23$; $p = 0,1744$), nem no número de explorações verticais (Fig. 8G: GR: 9,5: (6,75 – 13,25) vs. GC: 11,5: (8,0 – 13,25); $p = 0,5242$) comparando o grupo restrito ao grupo controle.

Figura 8 – Labirinto em cruz elevado: tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos, fechados e quadrante central, e o número de explorações verticais em 300s

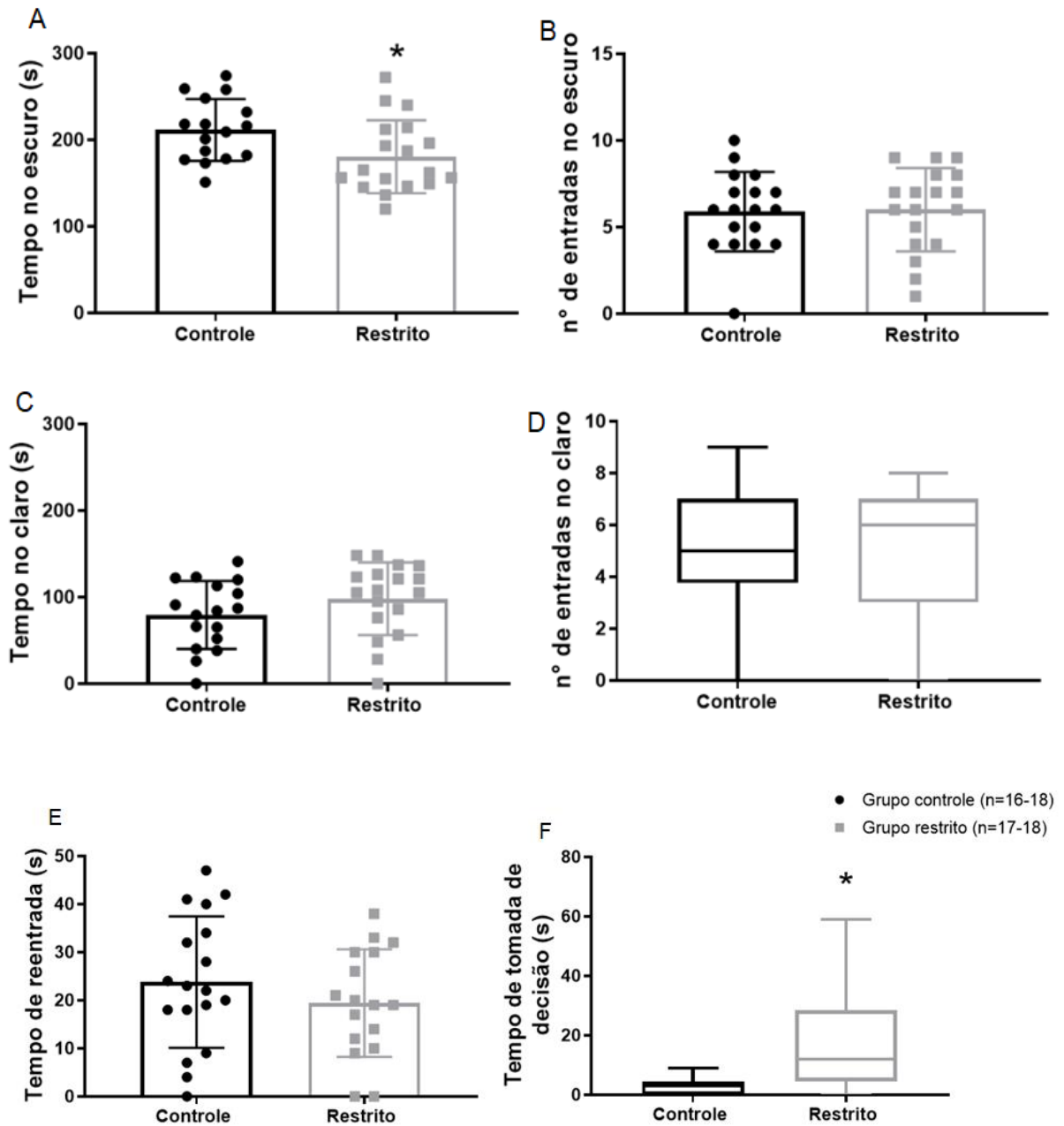




A: Tempo de permanência no braço aberto B: Número de entradas no braço aberto C: Tempo de permanência no braço fechado D: Número de entradas no braço fechado E: Tempo de permanência no centro F: Número de entradas no centro G: Número de explorações verticais. Dados paramétricos: analisados por teste *t* não pareado e expressos em média \pm DP. Dados não paramétricos: analisados por U-teste Mann-Whitney e expressos em mediana: (1º Quartil - 3º Quartil). Diferença significativa: $p < 0,05$.

Na figura 9 é apresentada as respostas comportamentais observadas na Caixa Claro/Escuro, onde foi encontrado redução significativa no tempo no escuro (Fig. 9A: GR: $163,5 \pm 42,11$ s vs. GC: $212,5 \pm 35,80$ s; $p = 0,0292$), já no número de entradas no escuro não foi encontrado alterações (Fig. 9B: GR: $6,00 \pm 2,41$ vs. GC: $5,89 \pm 2,29$; $p = 0,8880$) comparando o grupo restrito ao grupo controle. Na avaliação do tempo de permanência no claro não foram identificadas alterações (Fig. 9C: GR: $98,17 \pm 42,03$ s vs. GC: $79,47 \pm 39,26$ s; $p = 0,1837$), não apresentando também alterações no número de entradas no claro [Fig. 9D: GR: 6,00: (3,00 – 7,00) vs. GC: 5,00: (3,75 – 7,00); $p = 0,8064$], nem no tempo de reentrada (Fig. 9E: GR: $19,41 \pm 11,18$ s vs. GC: $23,78 \pm 13,69$ s; $p = 0,3106$). Contudo, foi identificado aumento no tempo de tomada de decisão [Fig. 9F: GR: 13,00: (4,50 – 28,50) s vs. GC: 3,00: (0,00 – 4,50) s; $p = 0,0009$] no grupo restrito em comparação com o grupo controle.

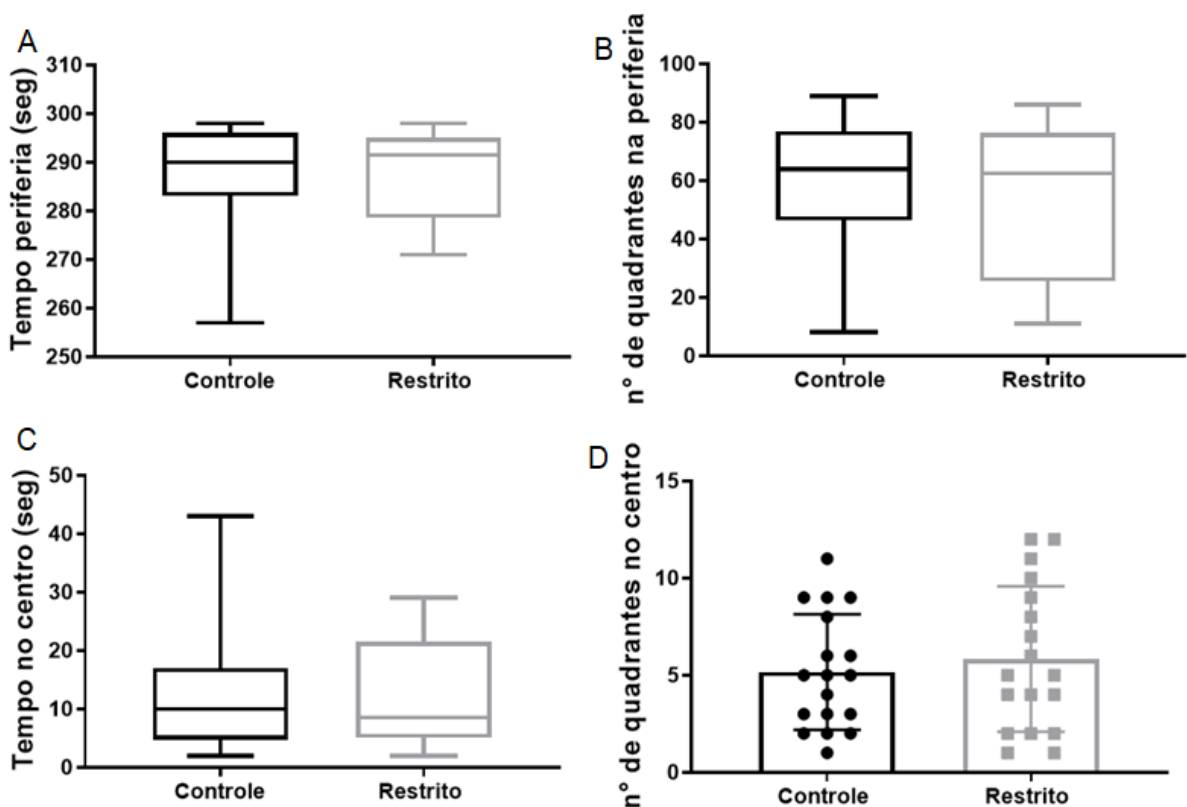
Figura 9 – Caixa claro/escuro: tempo e número de entradas no claro e no escuro tempo de reentrada e tempo no centro (tomada de decisão) em 300s

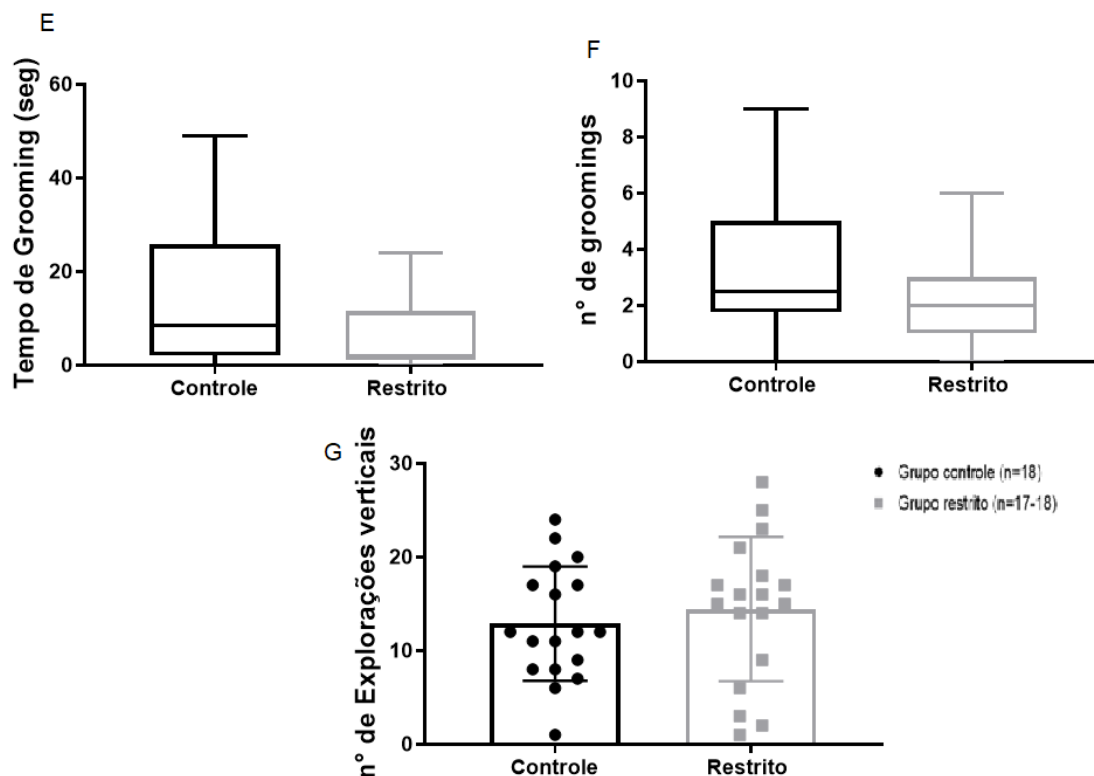


A: Tempo de permanência no escuro B: Número de entradas no escuro C: Tempo de permanência no claro D: Número de entradas no claro E: Tempo de reentrada F: Tempo de tomada de decisão. O N amostral dos grupos tiveram alterações dadas as retiradas dos outliers conforme a seguir: gráficos A (GR=18 e GC=16), B (GR=18 e GC=18), C (GR=18 e GC=17), D (GR=18 e GC=18), E (GR=17 e GC=18), e F (GR=17 e GC=17). Dados paramétricos: analisados por teste t não pareado e expressos em média \pm DP. Dados não paramétricos: analisados por U-teste Mann-Whitney e expressos em mediana: (1° Quartil - 3° Quartil). Diferença significativa: $p = <0,05$.

Na figura 10 foram expressos os parâmetros comportamentais e a atividade locomotora dos animais avaliados no teste de campo aberto. O teste não apontou alterações no tempo de permanência na periferia [Fig. 10A: GR: 291,5: (278,5 – 295,0) s vs. GC: 290,0: (283,0 – 296,0) s; $p= 0,9439$], bem como no número de quadrantes percorridos na periferia [Fig. 10B: GR: 62,50: (25,50 – 76,25); vs. 64,00: (46,25 – 77,00); $p= 0,5159$] comparando o grupo restrito ao grupo controle. Também não foi identificada alteração no tempo de permanência no centro [Fig. 10C: GR: 8,50: (5,00 – 21,50) s; vs. 10,00: (4,75 – 17,00) s; $p= 0,9688$], assim como não houve alteração no número de quadrantes percorridos no centro (Fig. 10D: GR: $5,83 \pm 3,75$ vs. GC: $5,17 \pm 2,98$; $p = 0,5582$). Não foi identificada alteração no tempo de grooming [Fig. 10E: GR: 2,00: (1,00 – 11,50) s vs. GC: 8,50: (2,00 – 25,75) s; $p= 0,0984$], nem no número de groomings [Fig. 10F: GR: 2,00: (1,00 – 3,00) vs. GC: 2,50: (1,75 – 5,00); $p= 0,1665$]. Também não houve alterações no número de explorações verticais (Fig. 10G: GR: $14,44 \pm 7,71$ vs. GC: $12,89 \pm 6,11$; $p = 0,5067$) comparando o GR com o GC.

Figura 10 – Campo aberto: tempo de permanência e quadrantes percorridos na periferia e centro do aparato, tempo e números de groomings e tempo de exploração vertical em 300s





A: Tempo de permanência na periferia B: Número de quadrantes na periferia C: Tempo de permanência no centro D: Número de quadrantes no centro E: Número de explorações verticais F: Tempo de groomings; G: Número de groomings. O N amostral dos grupos tiveram alterações dadas as retiradas dos outliers conforme à seguir: gráficos A (GR=18 e GC=18), B (GR=18 e GC=18), C (GR=18 e GC=18), D (GR=18 e GC=18), E (GR=18 e GC=18), F (GR=17 e GC=18) e G (GR=17 e GC=18). Dados paramétricos: analisados por teste t não pareado e expressos em média \pm DP. Dados não paramétricos: analisados por U-teste Mann-Whitney. e expressos em mediana: (1º Quartil - 3º Quartil). Diferença significativa: $p < 0,05$.

5.6. EFEITOS DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SEVERA O PERFIL METABÓLICO

A tabela 1 apresenta os efeitos da RAS sobre a Glicemia, Triacilglicerol e Colesterol total, onde observa-se que a RAS promoveu a redução dos níveis séricos de triacilglicerol, mas não alterou os níveis séricos do colesterol total. Já em relação a glicemia, embora tenha havido uma redução deste parâmetro no grupo RAS, a glicemia deste grupo permaneceu dentro dos valores de referência para roedores (100 mg/dl).

Tabela 1 - Efeito da RAS sobre a glicemia, triacilglicerol e colesterol total

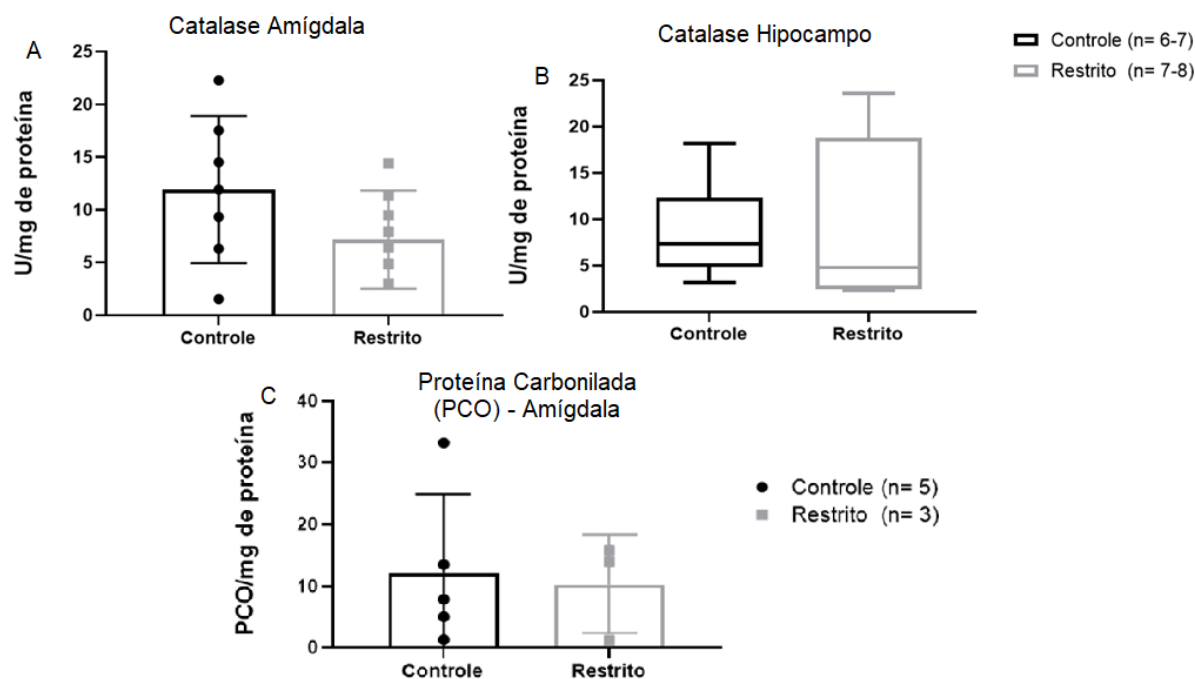
Parâmetros	Média GC	Média GR	Média ± Desvio padrão	p=
Glicemia (mg/dl)	140,7	95,84	C (140,70 ± 14,69) R (95,84 ± 18,24)	0,0002*
Triacilglicerol (mg/dl)	188,4	56,43	C (188,40 ± 51,96) R (56,43 ± 16,04)	< 0,0001*
Parâmetros	Mediana GC	Mediana GR	[Mediana (1° Quartil – 3° Quartil)]	p=
Colesterol (mg/dl)	24,50	27,20	C [24,50 (22,80 – 31,20)] R [27,20 (22,28 – 30,60)]	0,8665

Dados paramétricos: analisados por teste t não pareado e expressos em média ± DP. Dados não paramétricos: analisados por U-teste Mann-Whitney e expressos em mediana: (1° Quartil - 3° Quartil). Diferença significativa: p= <0,05. GC (n=7), GR (n=8).

5.7. EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SEVERA SOBRE O ESTADO OXIDATIVO ENCEFÁLICO

A figura 11 demonstra os efeitos da RAS sobre o estado oxidativos encefálicos. Não foram encontradas alterações na atividade da catalase nas amígdalas (Fig. 11A: GR: 7,17 ± 4,71 U/mg vs. GC: 11,92 ± 7,08 U/mg; p = 0,1460), nem na atividade da catalase no hipocampo (Fig. 11B: GR: 4,77: (2,49 – 18,76) U/mg de proteína vs. GC: 7,34: (4,84 – 12,31) colocar a unidade; p = 0,5338). Em relação ao dano oxidativo, também não foram observadas alterações nas concentrações das proteínas carboniladas nas amígdalas (Fig. 11C: GR: 10,30 ± 8,02 U/mg de proteína vs. GC: 12,16 ± 12,65 U/mg; p = 0,8294) em comparação do grupo restrito ao grupo controle.

Figura 11 - Efeito da RAS sobre perfil oxidativo nas amígdalas e hipocampo.



A: Atividade da Catalase na amígdala (U/mg); B: Atividade da Catalase no hipocampo (U/mg). Concentração das Proteínas carboniladas na amígdala colocar a unidade. O N amostral dos grupos tiveram alterações dadas as retiradas dos outliers seguindo, conforme descrito a seguir: gráficos A (GR=8; GC=7), B (GR=7. GC=6), C (GR=3; GC=5). Dados paramétricos: analisados por teste t não pareado e expressos em média \pm DP. Dados não paramétricos: analisados por U-teste Mann-Whitney e expressos em mediana: (1° Quartil - 3° Quartil). Diferença significativa: $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO:

Neste estudo, conduzimos uma investigação acerca os efeitos da RAS sobre o comportamento, perfil metabólico e estresse oxidativo encefálico em ratos Wistar. Foram observados: i) redução da massa corporal, hepática e dos tecidos adiposos brancos retroperitoneais, inguinais e epididimais; ii) redução das concentrações de triacilgliceróis plasmáticos em ratos submetidos a restrição alimentar severa por 14 dias; e iii) alterações comportamentais relacionadas ao maior comportamento exploratório – sugestivo de busca por alimento e maior latência para tomada de decisão.

Em se tratando da massa corporal, os animais submetidos a RAS apresentaram uma redução de 24,89% em comparação com o grupo controle. Observou-se também uma redução significativa nas massas dos tecidos do fígado e tecidos adiposos retroperitoneal, inguinal e epididimal. Conforme esperado, esses resultados apresentaram consonância com estudos anteriores que utilizaram protocolos dietéticos de RAS, onde apresentaram reduções na massa corporal entre 13% e 16% (Cerqueira e Kowaltowski, 2010). Segundo Cerqueira e Kowaltowski (2010), a RAS pode desencadear alterações fisiológicas no organismo de indivíduos a ela submetidos. Para que aconteça tais alterações no organismo, segundo Cerqueira e Kowaltowski (2010) essa restrição precisa ser igual ou superior a 40% do consumo necessário para o funcionamento e homeostase corporal. Essas alterações podem refletir não somente a perda de massa corporal, mas também no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como hipotensão e bradicardia, implicando no funcionamento e saúde do coração.

Deus et.al. (2019) aponta que a RAS reduz significativamente a massa cardíaca dos indivíduos, apresentando uma redução de até 50%. Essa redução pode ser associada a disfunção nas vias de cálcio, onde sua absorção pode ser afetada, induzindo o órgão a compensar em esforço. Porém, em nosso estudo, os animais do GR não apresentaram diferença na massa cardíaca quando comparados ao GC. Isso pode ser explicado pelo tempo de restrição (15 dias) e pelo período de vida (o protocolo de RA foi iniciado com 90 dias de vida) que os animais foram submetidos a RAS, não alterando a estrutura macroscópica deste órgão. Em consequência desse período de RAS, a utilização das reservas de glicogênio, a degradação de proteínas musculares utilizadas como fonte energética, a redução de líquidos corporais e a

sobrecarga no coração para compensar o transporte de nutrientes podem ser fatores que desencadeiam problemas a saúde (de Souza et al., 2015).

Também avaliamos os efeitos da RAS na massa do fígado, rins, adrenais e dos tecidos adiposos retroperitoneal, inguinal e epididimal. O fígado desempenha um papel essencial nas funções metabólicas, tais como o metabolismo de nutrientes, armazenamento de vitaminas e reservas energéticas, desintoxicação e excreção (Rosen et al., 2017). Observamos em nosso estudo uma redução significativa na massa do fígado em animais GR, em comparação com o GC. Essa redução pode ser atribuída à perda extrema de tecido adiposo, o que pode afetar a absorção de vitaminas lipossolúveis e levar à sua deficiência no fígado (Rosen et al., 2017). Além disso, a restrição alimentar severa também pode levar à diminuição do glicogênio hepático, o que afeta negativamente a gliconeogênese (Levay *et.al.* 2007). Adicionalmente, estudos prévios de nosso laboratório mostraram que a RAS reduziu os níveis plasmáticos de albumina - uma proteína sintetizada pelo fígado, amplamente utilizada como marcador desnutrição (De Souza et.al. 2015).

Nas glândulas adrenais, a RAS pode afetar diretamente na síntese de hormônios essenciais para o funcionamento do organismo. Estudos apontam que a RA está associada a redução na produção hormonal pelas adrenais, como o cortisol/corticosterona e aldosterona (Sinha et.al. 1996, Tatar 2003, Weindruch 1986). Kotelevtsev et.al. (1997) apontam que ratos submetidos a RA, imposta por 3 semanas, apresentaram diminuição nos níveis plasmáticos de corticosterona e aldosterona, bem como a redução na massa das glândulas adrenais. Entretanto, em nosso estudo os animais do GR não apresentaram alterações na massa das adrenais em comparação aos animais do GC. Esses resultados sugerem que, neste contexto específico, a duração da RAS por 15 dias não foi suficiente para atingir estrutura macroscópica das glândulas adrenais.

A restrição alimentar severa resultou na redução da massa corporal, incluindo uma redução significativa na massa dos tecidos adiposos retroperitoneal, inguinal e epididimal. O tecido adiposo sendo um órgão ativo metabolicamente na regulação endócrina, funcionando também como reserva energética, isolante térmico e protetor de órgãos internos, é diretamente afetado durante o processo de escassez energética, resultado na sua redução e concentração (Rocha *et.al.* 2008). Esse tecido desempenha um papel fundamental no armazenamento energético por meio dos triglicerídeos, os quais são utilizados quando há ausência de ingestão alimentar (Kahn

et.al. 2000, Spiegelman 2001). Além disso, o tecido adiposo é um importante órgão endócrino, que produz diversos hormônios que regulam e influenciam o funcionamento do sistema energético (Rexford 2006, Fasshauer *et.al.* 2015, Zhang *et.al.* 2004). A RAS promove déficits energéticos que estimulam a lipólise, bem como o aumento do estresse e conseqüentemente da adrenalina. Uma vez que os índices de glicose corporal são reduzidos, a secreção de glucagon é estimulada para manter os índices de glicose homeostáticos, resultando em degradação do TAG e maior concentração de ácidos graxos livres, que serão oxidados, gerando ATP, e serão utilizados pelos tecidos como fonte energética, conseqüentemente, reduzindo a massa do tecido adiposo (Heilbronn *et.al.* 2006). Em nosso estudo, observamos essa redução na massa do tecido adiposo branco (retroperitoneal, inguinal e epididimal), indicando que a restrição alimentar severa causou diminuição significativa nesse componente corporal, conforme esperado.

Com objetivo de avaliar os efeitos da RAS sobre diferentes aspectos comportamentais, incluindo ansiedade, exploração e atividade locomotora, neste estudo utilizamos três aparatos comportamentais (labirinto em cruz elevado, caixa claro/escuro e campo aberto). No teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE), estudos anteriores apresentam divergências quanto ao comportamento do tipo ansiedade. Estudos indicam que a RAS induziu o comportamento de ansiedade em ratos long-evans adultos, apresentando aumento nos índices de corticosterona (Badnoff *et.al.* 1988).

O tempo de permanência nos braços fechados do LCE, que representa uma área segura para o animal (Handley *et.al.* 1984), é amplamente validado para investigação dos aspectos comportamentais relacionados à ansiedade. Nossos resultados mostraram que os animais submetidos à restrição alimentar severa apresentaram redução significativa no tempo de permanência nos braços fechados, não indicando aumento dos níveis de ansiedade por esse parâmetro. Em contrapartida, apresentaram maior tempo nos braços abertos e maior índice de exploração do aparato, contabilizado pelo número de entradas em braços abertos (Govic *et.al.* 2009).

Estudos como o de Badnoff *et.al.* (1995) e Vianna e Brandão (2003), apontam que o aumento da corticosterona em ratos com 12 meses de idade, além de prejudicar o aprendizado espacial, a plasticidade sináptica e interferir diretamente no hipocampo, pode acarretar o aumento do comportamento exploratório dos animais. Outro estudo,

reporta que apesar da maior exploração do braço aberto no LCE sustentar resultados prévios que sugerem que a RAS causa um efeito comportamental ansiolítico (Levay *et.al.* 2007), tal resposta pode não configurar uma redução genuína da resposta ansiogênica, mas sim refletir o comportamento de busca por alimento, cuja motivação de suprir uma necessidade vital potencialmente supera a ansiedade gerada no aparato (Levay *et.al.* 2007). De fato, já foi evidenciado que a grelina – um hormônio orexígeno, cujos níveis circulantes aumentam em face a restrição alimentar - alivia comportamentos semelhantes ao da ansiedade e depressão induzidos por estresse em roedores (Huang *et.al.* 2017).

Para fundamentar a ideia supracitada, também examinamos o comportamento do tipo ansiedade na caixa claro/escuro. No teste da caixa claro/escuro o parâmetro de avaliação é indicado pelo tempo em que os animais permanecem no ambiente claro, que é considerado um ambiente aversivo ao risco dos animais (Sakae *et.al.* 2015, Lister 1987). Em nosso estudo não foram apontadas alterações significativas no tempo de permanência e no número de entradas no ambiente claro pelos ratos do GR. Contudo, foi observado um maior tempo de tomada de decisão representado por um maior tempo na interseção entre o ambiente claro e escuro, apontando a insegurança na decisão dos animais em trocar de ambiente.

Adicionalmente, os testes de campo aberto têm finalidade de avaliar o comportamento do tipo ansiedade e atividade locomotora dos animais (Carola *et.al.* 2002, Prut *et.al.* 2003, Lovick 2021). Esse teste é amplamente utilizado para investigar a resposta de animais a novos ambientes e é composto por parâmetros de avaliação, como a atividade locomotora pelo número de quadrantes percorridos no centro e na periferia do aparato e tempo de permanência nesses ambientes (Carola *et al.*, 2002; Prut & Belzung, 2003; Garcia *et al.*, 2005). Estudos apontam que a RAS aumenta a atividade locomotora e exploratória de ratos adultos, sugerindo que a restrição pode induzir os animais ao comportamento exploratório (Odendaal e Meintjes 2003), provavelmente em busca de alimento. Em nosso estudo, a avaliação comportamental no campo aberto não apontou nenhuma diferença entre os grupos em decorrência RAS. Nas avaliações realizadas, os animais tanto do grupo GR quanto o GC permaneceram maior parte do tempo na periferia do aparato, um local de preferência de roedores, considerado um ambiente menos aversivo para os animais.

Foi observado que os animais do GR apresentaram glicemia menor que os animais controles, mas tal variação ainda se encontra dentro da normalidade. Essa redução provavelmente é decorrente do maior recrutamento e utilização da glicose no GR (Mattson et.al. 2016; Anson et.al. 2003; Wan et.al. 2003). A redução no consumo de nutrientes ou até mesmo o jejum pode promover a gliconeogênese para manter a glicemia basal dos animais. Durante esse processo o organismo utiliza outras fontes de energia, como ácidos graxos e aminoácidos (Yancy 2004; Volek et.al 2002; Volek et.al 2009; Pesta e Samuel 2014; Layman et.al 2008).

Mensink e Katan (1992), Siri-Tarino et.al (2010) e Hu et.al. (2012) enfatizaram que a RA pode ocasionar déficits no metabolismo lipídico. Em concordância com essas informações, em nosso estudo observamos que no grupo GR ocorreu redução significativa nos níveis séricos de triacilglicerol. Isto pode ser explicado pela redução na síntese de hepática de triacilglicerol e a menor oferta pela dieta

Visto que tem sido relatado na literatura que a RAS se associa à instalação de um quadro de estresse oxidativo, o próximo passo do nosso trabalho foi avaliar a atividade da catalase e a concentração do biomarcador de estresse oxidativo, a proteína carbonilada. A catalase, é uma enzima antioxidante responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, desempenhando um papel importante na proteção das células contra danos oxidativos (Finkel e Holbrook 2000; Davies 2016; Mittal et.al 2014; Scialò et.al 2017). No cérebro, a RAS tem sido associada a alterações na atividade da catalase (Yanai et.al 2001).

Em nosso estudo foi avaliada a atividade da catalase na amígdala e no hipocampo, tendo em vista que a amígdala é uma região envolvida na gênese da ansiedade e o hipocampo é um componente do sistema límbico que governa a aprendizagem e a memória, influencia o comportamento ingestivo e participa ativamente na tomada de decisão do consumo alimentar (Tan e Norhaizan 2019; Davies 2016). Entretanto, não foi observada nenhuma alteração na atividade da catalase entre os grupos GR e GC. Em relação ao dano oxidativo em proteínas, não foi observada alteração na concentração de proteínas carboniladas na amígdala e hipocampo. É possível que o tempo de restrição possa ter sido insuficiente para promover um dano oxidativo significativo nas proteínas, sendo fundamental aprofundarmos as investigações acerca dos efeitos das RAS sobre o estresse oxidativo encefálico para melhor compreendermos os mecanismos relacionados ao fenótipo comportamental observado.

Entretanto, nosso estudo suscita uma questão relevante: um possível dimorfismo na resposta neurobiológica comportamental à RAS, visto que estudos prévios do nosso grupo mostraram resposta semelhante à ansiedade em ratas submetidas ao mesmo protocolo de restrição alimentar (Campos et.al. 2018). Essa divergência também desperta atenção para a necessidade de pesquisas sexo-comparativas acerca da neurobiologia dos comportamentos de busca e relacionados à ansiedade nos contextos de RA.

7. CONCLUSÃO

Em nosso estudo, a RAS, induzida por 14 dias, promoveu mudanças biométricas e metabólicas (i.e.: redução da massa corporal, das massas do fígado e dos tecidos adiposos brancos, e da concentração plasmática de triacilglicerol), mas não alterou a homeostase redox na amígdala e hipocampo de ratos Wistar. Contudo, a RAS aumentou o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos e reduziu o tempo de permanência nos braços fechados do LCE. Adicionalmente, elevou o tempo de tomada de decisão e reduziu o tempo no escuro na caixa claro/escuro, sugerindo um maior comportamento exploratório. Tais respostas comportamentais são sugestivas da busca por alimento, cuja motivação de suprir uma necessidade vital potencialmente superou a ansiedade gerada no aparato. Estes achados, contrários aos dados da literatura obtidos em ratas que apresentaram comportamento do tipo ansiedade quando submetidas à RAS, sugerem um possível dimorfismo sexual na homeostase comportamental à RAS, e fomenta um novo direcionamento para futuras pesquisas acerca da neurobiologia das respostas comportamentais relacionadas à ansiedade nos contextos de restrição alimentar.

8. REFERÊNCIAS

1. Mattson, Mark P.; Allison, David B.; Fontana, Luigi; Harvie, Michelle; Longo, Valter D.; Malaisse, Willy J.; Mosley, Michael; Notterpek, Lucia; Ravussin, Eric; Scheer, Frank A. J. L.; Seyfried, Thomas N.; Varady, Krista A.; Panda, Satchidananda (2014). *Meal frequency and timing in health and disease. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(47), 16647–16653.
2. Barrett , C.B. *Food Insecurity*. ReserarchGate 2009.
3. Venn, Bernard J. *Macronutrients and Human Health for the 21st Century. Nutrients*. 2020.
4. Berger, M. M. Herter-Aeberli I., Zimmermann M. B., Spieldenner J., Eggersdorfer M. *Strengthening the immunity of the Swiss population with micronutrients: A narrative review and call for action. Clinical Nutrition ESPEN*. 2021.
5. Black, R. E., Allen, L. H., Bhutta, Z. A., Caulfield, L. E., de Onis, M., Ezzati, M., Rivera J. *Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. The Lancet* 2008.
6. Müller O., Krawinkel M., *Malnutrition and health in developing countries. Canadian Medical Association Journal*. 2005. 279-286
7. McCAY C. M., CROWEL M.P.L., MAYNAKD L. A. *The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. The Journal of Nutrition*. 1935.
8. Szafransk K., Mekhail K. *The fine line between lifespan extension and shortening in response to caloric restriction. Nucleus*. 2014.
9. Weindruch R. *The retardation of aging by caloric restriction: studies in rodents and primates. Toxicologic Pathology*. 1996.
10. Garcia-Matas S., Paul R. K., Martinez P.M., Palacios H., Gutierrez V.M., Corpa R., Pallas M., Cristofol R., de Cabo R., Sanfeliu C. *In vitro caloric restriction induces protective genes and functional rejuvenation in senescent SAMP8 astrocytes. Aging Cell* .2015.
11. Anton S., Leeuwenburgh C. *Fasting or caloric restriction for Healthy Aging. Experimental Gerontology*. 2013
12. Partridge L., Pletche S.D., Mair W. *Dietary restriction, mortality trajectories, risk and damage. Mechanisms of Ageing and Development*. 2005.
13. Masoro E. J. *Caloric restriction-induced life extension of rats and mice: A critique of proposed mechanisms. Biochimica et Biophysica Acta*.2009.
14. Fontana L., Meyer T.E., Klein S., Holloszy J.O. *Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. Medical Sciences*. 2004.
15. Cerqueira F.M., Kowaltowski A.J. *Commonly adopted caloric restriction protocols often involve malnutrition. Ageing Research Reviews*. 2010.
16. Caballero B. *Humans against Obesity: Who Will Win?. Supplement*. 2019

17. Obesity: preventing and managing the global epidemic. *World Health Organization 2000 Reprinted 1997.*
18. de Noronha S.R., Campos G.V., Abreu A.R., de Souza A.A., Chiancar Jr. D.A., de Menezes R.C. *High fat diet induced-obesity facilitates anxiety-like behaviors due to GABAergic impairment within the dorsomedial hypothalamus in rats. Behavioural Brain Research.* 2017.
19. Polivy J. *Psychological consequences of food restriction. Journal of the American Dietetic Association.* 1996.
20. Nyman-Carlsson E., Engström I., Norring C., Nevoen L. *Eating Disorder Inventory-3: Validation in Swedish patients with eating disorders, psychiatric outpatients and a normal control sample. Journal of Psychiatry.* 2014.
21. Campos G.V., de Noronha S.R., de Souza A. A., Lima P.M., Abreu A.R., Chainca-Jr D., de Menezes R.C. *Estrogen receptor β activation within dorsal raphe nucleus reverses anxietylike behavior induced by food restriction in female rats. Behavioural Brain Research.* 2018.
22. de Souza A.M.A., Ji H., Wu X., Sandberg K., Wes C.A. *Persistent Renin-Angiotensin System Sensitization Months After Body Weight Recovery From Severe Food Restriction in Female Fischer Rats. Journal of the American Heart Association.* 2020.
23. Xiling Wu; Michael F. Wiater; Sue Ritter (2010). *NPAS2 deletion impairs responses to restricted feeding but not to metabolic challenges*, 99(4), 0–471.
24. Lee, J. H.; Budanov, A. V.; Park, E. J.; Birse, R.; Kim, T. E.; Perkins, G. A.; Ocorr, K.; Ellisman, M. H.; Bodmer, R.; Bier, E. (2010). *Sestrin as a Feedback Inhibitor of TOR That Prevents Age-Related Pathologies*. , 327(5970), 1223–1228
25. Longo, Valter D.; Mattson, Mark P. (2014). *Fasting: Molecular Mechanisms and Clinical Applications. Cell Metabolism*, 19(2), 181–192
26. Oksana Gavrilova, Lisa R. Leon, Bernice Marcus-Samuels, Mark M. Mason, Arthur L. Castle, Samuel Refetoff Charles Vinson and Marc L. Reitman. *Torpor in mice is induced by both leptin dependent and -independent mechanisms.* 1999
27. Dawn E.W. Livingstone; Kerry J. McInnes; Brian R. Walker; Ruth Andrew (2005). *Increased A-ring Reduction of Glucocorticoids in Obese Zucker Rats: Effects of Insulin Sensitization*. , 13(9), 1523–1526.
28. Daniela Omodei; Luigi Fontana (2011). *Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease*. , 585(11), 1537–1542.
29. Chuang, Chia Chi; Yang, Rong Sen; Tsai, Keh Sung; Ho, Feng Ming; Liu, Shing Hwa (2007). *Hyperglycemia Enhances Adipogenic Induction of Lipid Accumulation: Involvement of Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase 1/2, Phosphoinositide 3-Kinase/Akt, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Signaling. Endocrinology*, 148(9), 4267–4275
30. DiVasta A.D., Feldman H. A., Quach A. E., Balestrino M., Gordon C.M. *The Effect of Bed Rest on Bone Turnover in Young Women Hospitalized for Anorexia Nervosa: A Pilot Study. Endocrine Care.*2009.

31. DiVasta A.D., Walls C.E., Feldman H.A., Quach A.E., Woods E.R., Gordon C.M., Alexander M.E. 2010
32. Gauthier C., Hassler C., Mattar L., Launay J.M., Callebert J., Steiger H., Melchior J.C., Falissard B., Berthoz S., Soleillant V.M., Lang F., Delorme M., Pommereau X., Gerardin P., Bioulac S., Bouvard M., Group E., Godart N. *Symptoms of depression and anxiety in anorexia nervosa: Links with plasma tryptophan and serotonin metabolism. Science Direct.* 2014.
33. Silva, P. A., Monnerat-Cahli, G., Pereira-Acácio, A., Luzardo, R., Sampaio, L. S., Luna-Leite, Lara L.S., Einicker-Lamas M., Panizzutti R., Madeira., Vieira-Filho L.D., Castro-Chaves C., More V.S.R.S., DO Paixão A., Medei E., Vieira A. A. *Mechanisms Involving Ang II and MAPK/ERK1/2 Signaling Pathways Underlie Cardiac and Renal Alterations during Chronic Undernutrition. PLoS ONE .* 2014
34. Robin Jean-Patrice., Decrock F., Herzberg G., Mioskowski E., Maho Y.L., Bach A., Groscolas R. *Restoration of Body Energy Reserves during Refeeding in Rats Is Dependent on Both the Intensity of Energy Restriction and the Metabolic Status at the Onset of Starvation. The Journal of Nutrition.* 2008.
35. Inoue K., Zorrilla E.P., Tabarin A., Valdez G.R., Iwasaki S., Kiriike., Koob G.F. *Reduction of Anxiety After Restricted Feeding in the Rat: Implication for Eating Disorders. Biol Psychiatry.* 2004.
36. Halford, Jason C G; Blundell, John E. *Separate systems for serotonin and leptin in appetite control. Annals of Medicine.* 2000.
37. Morley J.E., Blundell J.E., *The neurobiological basis of eating disorders: some formulations. Biol Psychiatry .*1988
38. Bourne L., Bryant-Waughb R., Cooka J., Mandya W. *Avoidant/Restrictive Food Intake Disorder: A Systematic Scoping Review of the Current Literature. Educational and Health Psychology .*2020.
39. Veerendra Kumar Madala Halagappa; Zhihong Guo; Michelle Pearson; Yasuji Matsuoka; Roy G. Cutler; Frank M. LaFerla; Mark P. Mattson (2007). *Intermittent fasting and caloric restriction ameliorate age-related behavioral deficits in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. , 26(1), 212–220.*
40. Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, Seeley RJ, Baskin DG. *Central nervous system control of food intake. Nature* 2000.
41. Soubrie P. *Reconciling the role of central serotonin neurons in human and animal behavior. Behav Brain Sci* 1986.
42. Kaye ,Walter . *Neurobiology of anorexia and bulimia nervosa. Physiology & Behavior* 2007.
43. Mattson, Mark P. (2015). *Lifelong brain health is a lifelong challenge: From evolutionary principles to empirical evidence. Ageing Research Reviews, 20(), 37–45*
44. de Souza A. A., de Menezes R.C., Abreu A.R., Araujo G.R., Costa D.C., Chianca Jr D. A. *Increased α 1-adrenoreceptor activity is required to sustain blood pressure in female rats under food restriction.* 2015

45. Fontana, Luigi; Partridge, Linda (2015). *Promoting Health and Longevity through Diet: From Model Organisms to Humans*. *Cell*, 161(1), 106–118.
46. Mark P. Mattson; Ruiqian Wan (2005). *Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems*. *16(3)*, 129–137.
47. Bahi, Amine (2016). *Sustained lentiviral-mediated overexpression of microRNA124a in the dentate gyrus exacerbates anxiety- and autism-like behaviors associated with neonatal isolation in rats*. *Behavioural Brain Research*
48. Sies, Helmut (2015). *Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine*. *Redox Biology*, 4(), 180–183.
49. Sies, Helmut (2017). *Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress*. *Redox Biology*, 11(), 613–619
50. Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M. (2005). *Metals, Toxicity and Oxidative Stress*. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161–1208.
51. Marian Valko; Dieter Leibfritz; Jan Moncol; Mark T.D. Cronin; Milan Mazur; Joshua Telser (2007). *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. , 39(1), 0–84
52. Zorov, D. B.; Juhaszova, M.; Sollott, S. J. (2014). *Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release*. *Physiological Reviews*, 94(3), 909–950.
53. Michael Maes; Piotr Galecki; Yong Seun Chang; Michael Berk (2011). *A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness*. , 35(3), 0–692
54. Li, Yan; Abdourahman, Aicha; Tamm, Joseph A.; Pehrson, Alan L.; Sánchez, Connie; Gulinello, Maria (2015). *Reversal of age-associated cognitive deficits is accompanied by increased plasticity-related gene expression after chronic antidepressant administration in middle-aged mice*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*
55. Paul D. Ray; Bo-Wen Huang; Yoshiaki Tsuji (2012). *Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling*. , 24(5), 981–990
56. Cerqueira, J. J.; Mailliet, F.; Almeida, O. F. X.; Jay, T. M.; Sousa, N. (2007). *The Prefrontal Cortex as a Key Target of the Maladaptive Response to Stress*. *Journal of Neuroscience*, 27(11), 2781–2787.
57. Hao, Shuai; Dey, Aditi; Yu, Xiaolin; Stranahan, Alexis M. (2015). *Dietary obesity reversibly induces synaptic stripping by microglia and impairs hippocampal plasticity*. *Brain, Behavior, and Immunity*
58. Pereira, A. C.; Huddleston, D. E.; Brickman, A. M.; Sosunov, A. A.; Hen, R.; McKhann, G. M.; Sloan, R.; Gage, F. H.; Brown, T. R.; Small, S. A. (2007). *An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(13), 5638–5643

59. Handley S.L., Mithani S. *Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour*. *Archives of Pharmacology*. 1984.
60. Treit D., Menard J., Royan C. *Anxiogenic Stimuli in the Elevated Plus-Maze*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1993.
61. Walf A.A., Frye C.A. *The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents*. *Nature* 2007.
62. Crawley J., Goodwin F.K. *Preliminary Report of a Simple Animal Behavior Model for the Anxiolytic Effects of Benzodiazepines*. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 1980.
63. Bourin M., Hascoët M. *The mouse light/dark box test*. *European Journal of Pharmacology* 2003.
64. Carola V., D'Olimpio F., Brunamonti E., Mangia F., Renzi P. *Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice*. *Research report*. 2002.
65. Prut L., Belzung C. *The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review* *European Journal of Pharmacology* 2003.
66. Lovick T.A., Zangrossi Jr H. *Effect of Estrous Cycle on Behavior of Females in Rodent Tests of Anxiety*. *Frontiers in Psychiatry*. 2021.
67. Garcia A.M.B., Martinez R., Brandão M.L., Morato S. *Effects of apomorphine on rat behavior in the elevated plus-maze*. *Physiology & Behavior*. 2005.
68. Aline M. A. De Souza, Jonathas F. Q. Almeida, Nataliia Shults, Hong Ji, James Li, Kathryn Sandberg. (2022) *Susceptibility of female rats to cardiac arrhythmias following refeeding after severe food restriction*. *Biology of Sex Differences*
69. Carter, W. J.; Lynch, M. E. (1994). *Effect of Clenbuterol on Recovery of Muscle Mass and Carcass Protein Content Following Dietary Protein Depletion in Young and Old Rats*. *Journal of Gerontology*, 49(4), B162–B168
70. Deus, Adriana Fernandes de; Silva, Vítor Loureiro da; de Souza, Sérgio Luiz Borges; Mota, Gustavo Augusto Ferreira; Sant'Ana, Paula Grippa; Vileigas, Danielle Fernandes; Lima-Leopoldo, Ana Paula; Leopoldo, André Soares; Campos, Dijon Henrique Salomé de; de Tomasi, Loreta Casquel; Padovani, Carlos Roberto; Kolwicz, Stephen C.; Cicogna, Antonio Carlos (2019). *Myocardial Dysfunction after Severe Food Restriction Is Linked to Changes in the Calcium-Handling Properties in Rats*. *Nutrients*
71. Kozeniecki, Michelle; Ludke, Rachel; Kerner, Jennifer; Patterson, Brittney (2019). *Micronutrients in Liver Disease: Roles, Risk Factors for Deficiency, and Recommendations for Supplementation*. *Nutrition in Clinical Practice*
72. Rosen, Elissa; Bakshi, Neeru; Watters, Ashlie; Rosen, Hugo R.; Mehler, Philip S. (2017). *Hepatic Complications of Anorexia Nervosa*. *Digestive Diseases and Sciences*
73. Heilbronn, L. K., Civitarese, A. E., Bogacka, I., Smith, S. R., Hulver, M., & Ravussin, E. (2005). *Glucose tolerance and skeletal muscle gene expression in response to alternate day fasting*. *Obesity Research*

74. Hall, M. E., do Carmo, J. M., da Silva, A. A., Juncos, L. A., Wang, Z., & Hall, J. E. (2015). Obesity, hypertension, and chronic kidney disease. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*.
75. Sinha, M K; Ohannesian, J P; Heiman, M L; Kriauciunas, A; Stephens, T W; Magosin, S; Marco, C; Caro, J F (1996). *Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects.. Journal of Clinical Investigation, 97(5), 1344–1347*
76. Tatar, M. (2003). *The Endocrine Regulation of Aging by Insulin-like Signals. Science*.
77. Weindruch, Richard; Walford, Roy L.; Fligiel, Suzanne; Guthrie, Donald (1986). *The Retardation of Aging in Mice by Dietary Restriction: Longevity, Cancer, Immunity and Lifetime Energy Intake. The Journal of Nutrition*.
78. Kotelevtsev, Y.; Holmes, M. C.; Burchell, A.; Houston, P. M.; Schmolli, D.; Jamieson, P.; Best, R.; Brown, R.; Edwards, C. R. W.; Seckl, J. R.; Mullins, J. J. (1997). *11 -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. Proceedings of the National Academy of Sciences*.
79. Rocha, V. Z.; Folco, E. J.; Sukhova, G.; Shimizu, K.; Gotsman, I.; Vernon, A. H.; Libby, P. (2008). *Interferon- , a Th1 Cytokine, Regulates Fat Inflammation: A Role for Adaptive Immunity in Obesity. Circulation Research*
80. Kahn, Barbara B.; Flier, Jeffrey S. (2000). *Obesity and insulin resistance. Journal of Clinical Investigation, 106(4), 473–481*
81. Bruce M. Spiegelman; Jeffrey S. Flier (2001). *Obesity and the Regulation of Energy Balance*
82. Rexford S. Ahima (2006). *Adipose Tissue as an Endocrine Organ. , 14(S8), 242–249*.
83. Fasshauer, Mathias; Blüher, Matthias (2015). *Adipokines in health and disease. Trends in Pharmacological Sciences, 36(7), 461–470*.
84. Zhang. Y, Proença. R, Maffei. M, Barone. M, Leopold. L Friedman. J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994.
85. Heilbronn, Leonie K.; de Jonge, Lilian; Frisard, Madlyn I.; DeLany, James P.; Larson-Meyer, D. Enette; Rood, Jennifer; Nguyen, Tuong; Martin, Corby K.; Volaufova, Julia; Most, Marlene M.; Greenway, Frank L.; Smith, Steven R.; Deutsch, Walter A.; Williamson, Donald A.; Ravussin, Eric; Pennington CALERIE Team, for the (2006). *Effect of 6-Month Calorie Restriction on Biomarkers of Longevity, Metabolic Adaptation, and Oxidative Stress in Overweight Individuals. JAMA*
86. Shari R. Bodnoff; Barbara Suranyi-Cadotte; David H. Aitken; Remi Quirion; Michael J. Meaney (1988). *The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety. , 95(3), 298–302*
87. Bodnoff, SR; Humphreys, AG; Lehman, JC; Diamond, DM; Rose, GM; Meaney, MJ (1995). *Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial*

- learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. The Journal of Neuroscience, 15(1), 61–69.*
88. Vianna, D.M.L.; Brandão, M.L. (2003). *Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 36(5), 557–566.*
 89. Sakae, Diana Yae; Sakae, Thiago Mamoru; Paschoalini, Marta Aparecida; Faria, Moacir Serralvo (2015). *Relative luminosity in the plus maze upon the exploratory behaviour of female Wistar rats. Arquivos de Neuro-Psiquiatria, 73(7), 601–606*
 90. Richard G. Lister (1987). *The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. , 92(2), 180–185*
 91. Okuda, S.; Roozendaal, B.; McGaugh, J. L. (2004). *Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101(3), 853–858*
 92. Odendaal, J. S. J., & Meintjes, R. A. (2003). Neurophysiological correlates of affiliative behavior between humans and dogs. *Veterinary journal, 165(3), 296–301*
 93. Mattson, Mark P.; Longo, Valter D.; Harvie, Michelle (2016). *Impact of Intermittent Fasting on Health and Disease Processes. Ageing Research Reviews*
 94. Anson, R. M.; Guo, Z.; de Cabo, R.; Iyun, T.; Rios, M.; Hagepanos, A.; Ingram, D. K.; Lane, M. A.; Mattson, M. P. (2003). *Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. Proceedings of the National Academy of Sciences*
 95. Wan, Ruiqian; Camandola, Simonetta; Mattson, Mark P. (2003). *Intermittent Food Deprivation Improves Cardiovascular and Neuroendocrine Responses to Stress in Rats. The Journal of Nutrition, 133(6), 1921–1929*
 96. Yancy, William S. (2004). *A Low-Carbohydrate, Ketogenic Diet versus a Low-Fat Diet To Treat Obesity and Hyperlipidemia. Annals of Internal Medicine, 140(10), 769*
 97. Jeff S. Volek; Matthew J. Sharman; Dawn M. Love; Neva G. Avery; Ana L. G[acute]mez; Timothy P. Scheett; William J. Kraemer (2002). *Body composition and hormonal responses to a carbohydrate-restricted diet. , 51(7), 0–870*
 98. Jeff S. Volek; Stephen D. Phinney; Cassandra E. Forsythe; Erin E. Quann; Richard J. Wood; Michael J. Puglisi; William J. Kraemer; Doug M. Bibus; Maria Luz Fernandez; Richard D. Feinman (2009). *Carbohydrate Restriction has a More Favorable Impact on the Metabolic Syndrome than a Low Fat Diet. , 44(4), 297–309*
 99. Pesta, Dominik H; Samuel, Varman T (2014). *A high-protein diet for reducing body fat: mechanisms and possible caveats. Nutrition & Metabolism, 11(1), 53*

100. Layman, Donald K; Clifton, Peter; Gannon, Mary C; Krauss, Ronald M; Nuttall, Frank Q (2008). *Protein in optimal health: heart disease and type 2 diabetes. The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(5), 1571S–1575S
101. Owen, O. E.; Reichard, George A. (1971). *Human forearm metabolism during progressive starvation. Journal of Clinical Investigation*, 50(7), 1536–1545.
102. George F. Cahill. *Seminars in medicine of the beth Israel Hospital Boston, Starvation in man 1948*
103. Ancel Keys; Joseph T. Anderson; Francisco Grande (1965). *Serum cholesterol response to changes in the diet: II. The effect of cholesterol in the diet. , 14(7), 759–765*
104. Mensink, R. P.; Katan, M. B. (1992). *Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta- analysis of 27 trials. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 12(8), 911–919
105. Siri-Tarino, P. W; Sun, Q.; Hu, F. B; Krauss, R. M (2010). *Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular disease. American Journal of Clinical Nutrition*, 91(3), 502–509.
106. Hu, T.; Mills, K. T.; Yao, L.; Demanelis, K.; Eloustaz, M.; Yancy, W. S.; Kelly, T. N.; He, J.; Bazzano, L. A. (2012). *Effects of Low-Carbohydrate Diets Versus Low-Fat Diets on Metabolic Risk Factors: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Clinical Trials. American Journal of Epidemiology*, 176(suppl 7), S44–S54
107. Finkel, Toren; Holbrook, Nikki J. (2000). *Nature*, 408(6809), 239–247
108. Davies, M. J. (2016). *Protein oxidation and peroxidation. Biochemical Journal*, 473(7), 805–825.
109. Mittal, Manish; Siddiqui, Mohammad Rizwan; Tran, Khiem; Reddy, Sekhar P.; Malik, Asrar B. (2014). *Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. Antioxidants & Redox Signaling*, 20(7), 1126–1167
110. Scialò, Filippo; Fernández-Ayala, Daniel J.; Sanz, Alberto (2017). *Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease. Frontiers in Physiology*, 8, 428
111. Wenzhen Duan; JaeWon Lee; ZhiHong Guo; Mark P. Mattson (2001). *Dietary restriction stimulates BDNF production in the brain and thereby protects neurons against excitotoxic injury. , 16(1), 1–12.*
112. Shuichi Yanai; Yoko Okaichi; Hiroshige Okaichi (2004). *Long-term dietary restriction causes negative effects on cognitive functions in rats. , 25(3), 0–332*
113. Tan, Bee Ling; Norhaizan, Mohd Esa (2019). *Effect of High-Fat Diets on Oxidative Stress, Cellular Inflammatory Response and Cognitive Function. Nutrients*, 11(11), 2579.
114. Govic, A., Levay, EA, Kent, S. e Paolini, AG (2009) *The social behavior of male rats administered an adult-onset calorie restriction regimen. Fisiologia e Comportamento*, 96(4-5), 581–585.

115. Levay, EA, Govic, A., Penman, J., Paolini, AG e Kent, S. (2007). *Effects of adult-onset calorie restriction on anxiety-like behavior in rats* *Fisiologia e Comportamento*, 92(5), 889–896.