



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Talissa Dezanetti

**Efeitos do tratamento crônico com óleo essencial de *Cordia verbenacea* sobre
parâmetros metabólicos e comportamentais em camundongos expostos à
dieta hiperlipídica e frutose**

Florianópolis
2024

Talissa Dezanetti

Efeitos do tratamento crônico com óleo essencial de *Cordia verbenacea* sobre parâmetros metabólicos e comportamentais em camundongos expostos à dieta hiperlipídica e frutose

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Mestra em Neurociências.

Orientador: Prof. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, Dr.

Coorientadora: Profa. Cristiane Ribeiro de Carvalho, Dra.

Florianópolis

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
Através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Dezanetti, Talissa

Efeitos do tratamento crônico com óleo essencial de Cordia verbenacea sobre parâmetros metabólicos e comportamentais em camundongos expostos à dieta hiperlipídica e frutose Talissa Dezanetti ; orientador, Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, coorientadora, Cristiane Ribeiro de Carvalho, 2024.

101 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Obesidade. 3. Comportamento alimentar. 4. Sistema endocanabinoide. 5. Cordia verbenacea. I. Moreira, Eduardo Luiz Gasnhar. II. Carvalho, Cristiane Ribeiro de. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

Talissa Dezanetti

Efeitos do tratamento crônico com óleo essencial de *Cordia verbenacea* sobre parâmetros metabólicos e comportamentais em camundongos expostos à dieta hiperlipídica e frutose

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 7 de fevereiro de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Morgana Duarte da Silva, Dra.

Departamento de Ciências Fisiológicas/ Centro de Ciências Biológicas/ Universidade Federal de Santa Catarina

Sara Pereira Braga, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Neurociências.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2024.

*Dedico ao meu avô Vitor,
que virou uma estrelinha azul no céu.
Sinto sua falta.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me guiado na escolha do meu caminho e me proporcionado força e saúde para trilhá-lo.

Agradeço ao professor Eduardo, meu orientador, pela oportunidade e confiança para que pudesse trabalhar em seu laboratório. Aprendi muito com você, obrigada por toda paciência, conselhos e ensinamentos.

Agradeço à professora Cristiane, minha coorientadora, pela oportunidade e aprendizados.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Neurociências pelos conhecimentos transmitidos.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), por ter sido minha segunda casa ao longo dos últimos 8 anos, durante a graduação e mestrado, ofertando educação de qualidade e formação de excelência.

Agradeço aos órgãos de fomento, FAPESC, CAPES e CNPq pelas bolsas de estudos e apoio financeiro.

Agradeço aos colegas de laboratório Wellington, Lucas, Sara, Yuri e Vanessa pelo apoio, pela amizade, pelas trocas de conhecimentos e auxílio durante essa etapa.

Agradeço aos demais colegas de pós-graduação que de certa forma me apoiaram durante esse processo, seja durante disciplinas, conversas de corredor, auxílio em experimentos e pela amizade, em especial agradeço à Scheila, Luma e Carolina.

Agradeço aos animais utilizados nesse trabalho.

Agradeço aos meus pais, Vanderleia e Claudemir, e a minha irmã Taissana pelo apoio nessa jornada. Mais uma conquista nossa, amo vocês.

Agradeço a minha tia Vilciane, por todas as conversas e suporte nos momentos difíceis dessa jornada.

Agradeço ao Gustavo, por todo apoio e companheirismo durante esses dois anos, especialmente por acreditar em mim e proporcionar mais leveza nesse período. Obrigada por viver meu sonho comigo.

Agradeço aos demais amigos que acreditaram e apoiaram o processo, em especial ao meu amigo Guilherme, que esteve comigo vibrando quando passei no processo seletivo do mestrado.

Agradeço às professoras do departamento de nutrição, Brunna Boaventura e Luciana Antunes, que me incentivaram a buscar novos ares e a me aventurar pela neurociência. Obrigada pelos conselhos e por acreditarem em mim.

Por fim, um agradecimento aos demais que de certa forma proporcionaram a execução e finalização dessa etapa tão importante em minha vida!

“Quando a gente acha que tem todas as respostas, vem a vida e muda todas as perguntas.”

Luis Fernando Verissimo

RESUMO

A obesidade é um problema de saúde pública mundial e seus números vem crescendo a cada ano. Dentre suas principais causas estão o consumo de dietas inadequadas, principalmente contendo alto teor calórico, lipídico e ricas em açúcares. Dentre as principais consequências dessa doença estão as desregulações metabólicas como aumento da massa corporal, tecido adiposo, colesterol, triglicerídeos, resistência a insulina, podendo levar ao Diabetes Mellitus. Além do mais, alterações no comportamento como aumento do comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo, bem como prejuízos na memória são associados ao consumo desse tipo de dieta por roedores e humanos. O comportamento alimentar é regulado por diversos sinais periféricos e centrais, sendo principalmente dividido em regulação homeostática e hedônica. Nesse sentido, o sistema endocanabinoide participa dessas regulações. Nos últimos anos está sendo estudado a ativação do receptor CB2 na diminuição do consumo alimentar e assim atenuação dos efeitos causados por dietas hipercalóricas no metabolismo e comportamento. O óleo essencial de *Cordia verbenacea* possui compostos com capacidade de atuar nesse receptor. Os objetivos desse trabalho foram: analisar os efeitos da suplementação com o óleo essencial de *Cordia verbenacea* nos animais submetidos ao consumo crônico de dieta hiperlipídica associada com frutose (HFFD) após 60 dias; avaliar a composição do óleo essencial quanto a dados de bioinformática, e analisar se o tratamento com o óleo possui propriedades reforçadoras ou aversivas *per se*. Nos resultados, o consumo de HFFD foi capaz de elevar o tecido adiposo, colesterol plasmático e insultar o metabolismo glicêmico, sem diferenças quanto ao comportamento tipo-ansioso, tipo-depressivo, locomoção ou memória de trabalho dos animais. No tratamento com o óleo essencial de *Cordia verbenacea*, de maneira geral, ele não foi capaz de reverter os efeitos do consumo de HFFD, todavia houve uma melhora na tolerância a glicose durante a performance do Teste de Tolerância a Glicose (GTT). Em sua avaliação quando a bioinformática, 4 dos 9 compostos presentes no óleo possuem alguma probabilidade de atividade no receptor CB2, todavia se encontram em baixos percentuais no óleo e alguns possuem uma biodisponibilidade via oral mais baixa, podendo afetar sua absorção, e assim seus efeitos. Por fim constatou-se que o tratamento provocou efeito aversivo aos animais no teste de Preferência Condicionada ao Lugar (PCL). De maneira geral, o tratamento com o óleo essencial de *Cordia verbenacea* não parece ser benéfico, pois não reverteu os efeitos da dieta e promoveu alguns efeitos adversos. Entretanto, seus efeitos quanto a glicemia deve ser mais bem elucidado.

Palavras-chave: obesidade; dieta hiperlipídica; comportamento alimentar; sistema endocanabinoide; *Cordia verbenacea*.

ABSTRACT

Obesity is a global public health problem, and its numbers are growing every year. Among its main causes are the consumption of inadequate diets, mainly containing high calories, lipids and rich in sugars. Among the main consequences of this disease are metabolic dysregulations such as increased body mass, adipose tissue, cholesterol, triglycerides, insulin resistance, which can lead to Diabetes Mellitus. Furthermore, changes in behavior such as increased anxiety-like and depressive-like behavior, as well as memory impairments are associated with the consumption of this type of diet by rodents and humans. Eating behavior is regulated by several peripheral and central signals, being mainly divided into homeostatic and hedonic regulation. In this sense, the endocannabinoid system participates in these regulations. In recent years, the activation of the CB2 receptor in reducing food consumption and thus attenuating the effects caused by high-calorie diets on metabolism and behavior has been studied. *Cordia verbenacea* essential oil has compounds capable of acting on this receptor. The objectives of this work were: to analyze the effects of supplementation with *Cordia verbenacea* essential oil in animals subjected to chronic consumption of a high-fat diet associated with fructose (HFFD) after 60 days; evaluate the composition of the essential oil based on bioinformatics data, and analyze whether the treatment with the oil has reinforcing or aversive properties *per se*. In the results, the consumption of HFFD was capable of increasing adipose tissue, plasma cholesterol and insulting glycemic metabolism, with no differences regarding the animals' anxiety-like, depressive-like behavior, locomotion or working memory. In treatment with *Cordia verbenacea* essential oil, in general, it was not able to reverse the effects of HFFD consumption, however there was an improvement in the glucose tolerance during the performance of the Glucose Tolerance Test (GTT). In his bioinformatics assessment, 4 of the 9 compounds present in the oil have some probability of activity at the CB2 receptor, however they are found in low percentages in the oil, and some have a lower oral bioavailability, which may affect their absorption, and thus their effects. Finally, it was found that the treatment caused an aversive effect on the animals in the Conditioned Place Preference test. In general, treatment with *Cordia verbenacea* essential oil does not appear to be beneficial, as it did not reverse the effects of the diet and promoted some adverse effects. However, its effects on glycemia need to be better elucidated.

Keywords: obesity; high-fat diet; eating behavior; endocannabinoid system; *Cordia verbenacea*.

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Desenho experimental da segunda etapa da pesquisa</i>	<i>46</i>
<i>Figura 2. Representação esquemática do Teste de Preferência Condicionada ao Lugar</i>	<i>51</i>
<i>Figura 3. Média do consumo calórico durante as 9 semanas de experimento</i>	<i>59</i>
<i>Figura 4. Delta da massa corporal (peso final - inicial) após 9 semanas.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 5. Delta da massa corporal antes e após tratamento</i>	<i>61</i>
<i>Figura 6. Percentual do peso da gordura visceral em relação a massa corporal total de camundongos</i>	<i>61</i>
<i>Figura 7. Análise plasmática ao final dos experimentos</i>	<i>62</i>
<i>Figura 8. Efeito no metabolismo glicêmico</i>	<i>64</i>
<i>Figura 9. Efeito na locomoção espontânea e comportamento do tipo ansioso no campo aberto em camundongos</i>	<i>65</i>
<i>Figura 10. Efeito no comportamento anedônico no teste borrifagem de sacarose em camundongos.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 11. Efeito no comportamento no teste de suspensão pela cauda em camundongos</i>	<i>66</i>
<i>Figura 12. Avaliação do efeito na memória dos camundongos através do % de alternância dos braços do teste labirinto em T</i>	<i>67</i>
<i>Figura 13. Índice de PCL dos animais submetidos a condicionamento com óleo essencial de Cordia verbenacea</i>	<i>68</i>
<i>Figura 14. Variação da massa corporal antes e ao final do protocolo de PCL.....</i>	<i>68</i>

LISTA DE QUADROS

<i>Quadro 1. Descrição dos terpenos presentes no óleo essencial de Cordia verbenacea</i>	<i>42</i>
<i>Quadro 2. Compostos do óleo de Cordia verbenacea e seus principais alvos</i>	<i>54</i>
<i>Quadro 3. Probabilidade de atravessar a BHE dos compostos do óleo de Cordia verbenacea</i>	<i>55</i>
<i>Quadro 4. Probabilidade da biodisponibilidade de absorção oral dos compostos da Cordia verbenacea</i>	<i>56</i>
<i>Quadro 5. Risco de toxicidade dos compostos do óleo de Cordia verbenacea</i>	<i>56</i>

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AEA	Anandamida
AMA	Associação Médica Americana
ANOVA	Análise de variância
AUC	Área Sob a Curva
BHE	Barreira Hematoencefálica
CB1	Receptor canabinoide 1
CB2	Receptor canabinoide 2
CCK	Colecistocinina
CEUA	Comitê de ética para o uso de animais
CHRM2	Receptor muscaríneo de acetilcolina M2
CPF	Córtex pré-frontal
CRH	Corticotrofina
DCNTs	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DEXA	Teste de absorvância de raios-X de dupla energia
DHA	Ácido docosahexaenóico
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DSM- V-TR	Manual Estatístico Diagnóstico V
eCB	Sistema endocanabinoide
eIF2-alfa	Fator de iniciação eucariótica 2
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
FAAH	Amida hidrolase de ácido graxo
FDA	Food and Drug Administration
GLP-1	Glucagon 1
GLUTs	Transportadores de glicose
GTT	Teste de tolerância à glicose (do inglês <i>Glucose Tolerance Test</i>)
HFD	Dietas hiperlipídicas (do inglês <i>High Fat Diet</i>)
HFFD	Dieta hiperlipídica e frutose (do inglês <i>High Fat and Fructose Diet</i>)
IKK	Proteína cinase de IKB
JNK	Proteína cinase c-Jun N-termina;

IMC	Índice de Massa Corporal
IRFs	Fatores reguladores de Interferon
IRS	Substrato do receptor de insulina
MAOB	Monoamina oxidase B
MCH	Hormônio Concentrador de Melanina
mTOR	Proteína Alvo da Rapamicina em Mamíferos
NAc	Núcleo Accumbens
NF-kB	Fator nuclear kB
NPY	Neuropeptídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde
OX1R	Receptores de orexina
OX2R	Receptores de orexina
PCL	Preferência Condicionada ao Lugar
PKR	Proteína cinase dependente de RNA
PPAR	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma
PUFA	Ômega-6 ácido graxo poli-insaturado (do inglês <i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>)
PYY	Peptídeo YY
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema Nervoso Central
SOCS	Supressor da sinalização de citocina
STD	Ração padrão para roedores (do inglês Standard)
TAs	Transtornos alimentares
TCA	Transtorno de Compulsão Alimentar
TGI	Trato gastrointestinal
TGO	Transaminase oxalacética
TGP	Transaminase pirúvica
TM	Taxa metabólica
TRH	Hormônio Liberador de Tireotrofina
TRPV1	Receptor potencial transitório de vaniloide tipo-1
TSH	Hormônio Estimulador da Tireoide
VTA	Área tegmental ventral (do inglês <i>Ventral Tegmental Area</i>)
2-AG	2-araquidonilglicerol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBESIDADE E DIETAS OBESOGÊNICAS	17
1.2	TRANSTORNOS ALIMENTARES	22
1.3	COMPORTAMENTO ALIMENTAR.....	23
1.3.1	Comportamento Alimentar Homeostático	23
1.3.2	Comportamento Alimentar Hedônico	28
1.3.3	Sistema Endocanabinoide e Comportamento Alimentar	32
1.4	CORDIA VERBENACEA.....	38
2	JUSTIFICATIVA	40
3	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVO GERAL	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	ANIMAIS	42
4.2	ÓLEO ESSENCIAL DE CORDIA VERBENACEA.....	42
4.3	DIETAS E FRUTOSE.....	43
4.4	DESENHOS EXPERIMENTAIS	44
4.4.1	Avaliação da bioinformática dos compostos presentes do óleo essencial de <i>Cordia verbenacea</i>, como a afinidade dos compostos por receptores e os efeitos adversos desses compostos	44
4.4.2	Avaliação dos efeitos da administração de óleo essencial de <i>Cordia verbenacea</i> sobre as alterações metabólicas e comportamentais induzidas pelo consumo crônico de dieta hiperlipídica e frutose	45
4.4.3	Investigação se o óleo essencial de <i>Cordia Verbenacea</i> apresenta propriedades reforçadoras <i>per se</i> na tarefa de preferência/aversão condicionada ao lugar em camundongos	46
4.5	ACOMPANHAMENTO DA MASSA CORPORAL E CONSUMO CALÓRICO 47	
4.6	EXPERIMENTOS COMPORTAMENTAIS	47
4.6.1	Campo Aberto	47
4.6.2	Borrifagem de Sacarose	48
4.6.3	Labirinto em T	48

4.6.4	Suspensão pela Cauda	49
4.6.5	Preferência Condicionada ao Lugar (PCL)	49
4.7	ANÁLISE BIOQUÍMICA E PESAGEM DO TECIDO ADIPOSEO VISCERAL	51
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5	RESULTADOS	54
5.1	AVALIAÇÃO DA BIOINFORMÁTICA DOS COMPOSTOS PRESENTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>CORDIA VERBENACEA</i> , COMO A AFINIDADE DOS COMPOSTOS POR RECEPTORES E OS EFEITOS ADVERSOS DESSES COMPOSTOS.....	54
5.2	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>CORDIA VERBENACEA</i> SOBRE AS ALTERAÇÕES METABÓLICAS E COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELO CONSUMO CRÔNICO DE DIETA HIPERLIPÍDICA E FRUTOSE (HFFD).....	59
5.2.1	Consumo Calórico	59
5.2.2	Variação da massa corporal e Gordura Visceral	60
5.2.3	Níveis plasmáticos de colesterol, triglicerídeos, TGO e TGP	62
5.2.4	Teste de Tolerância à Glicose	63
5.2.5	Testes Comportamentais	64
5.3	INVESTIGAÇÃO SE O ÓLEO ESSENCIAL DE <i>CORDIA VERBENACEA</i> APRESENTA PROPRIEDADES REFORÇADORAS <i>PER SE</i> NA TAREFA DE PREFERÊNCIA/AVERSÃO CONDICIONADA AO LUGAR EM CAMUNDONGOS ..	67
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÃO	88
	REFERÊNCIAS	89
	ANEXO A – APROVAÇÃO CEUA	100

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é um problema de saúde pública mundial e os números de indivíduos com essa doença vêm crescendo a cada ano. Sua principal característica é o aumento da massa corporal, majoritariamente em forma de tecido adiposo. Dentre os fatores associados ao desenvolvimento da obesidade está a presença de um ambiente obesogênico, levando a um balanço energético positivo, principalmente pelo consumo de alimentos com alta densidade calórica, ricos em gorduras e açúcares, e pelo aumento do sedentarismo (OMS, 2021).

O comportamento alimentar, isto é, as ações vinculadas ao ato de comer, são reguladas por intermédio de uma relação bidirecional entre o Sistema Nervoso Central (SNC) com componentes periféricos (Schwartz; Zeltser, 2013). Esse comportamento é controlado por dois mecanismos: o homeostático e o hedônico (Berthoud; Münzberg; Morrison, 2017; Lee; Dixon, 2017). O primeiro se refere à regulação da ingestão alimentar por meio da ação de hormônios que induzem ou inibem o comportamento alimentar, regulados à nível central pelo hipotálamo. Já o segundo mecanismo de controle se refere ao prazer e ao incentivo motivacional ao comer, regulado por vias de recompensa, que liberam o neurotransmissor dopamina frente a uma recompensa, como alimentos ricos em gorduras e açúcar (Giel *et al.*, 2022; Morton; Meek; Schwartz, 2014). Desregulações no sistema de recompensa podem levar a um consumo excessivo de alimentos palatáveis, podendo se sobrepor à regulação homeostática, isto é, levando um indivíduo já saciado a comer.

Nesse sentido, com o aumento do consumo alimentar, e assim, do consumo calórico, o organismo estoca esse excesso de energia como tecido adiposo (Gregor; Hotamisligil, 2011). Esse aumento está ligado com diversos prejuízos metabólicos como insultos no metabolismo da glicose e lipídico, aumentando a incidência de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares. Além do mais, a obesidade e o consumo dessas dietas vêm sendo associados à depressão e à doenças neurodegenerativas como o Alzheimer (De Felice; Gonçalves; Ferreira, 2022; Luppino; *et al.*, 2010; Mazon *et al.*, 2017).

Devido as magnitudes das complicações causadas pelo excesso de ingestão alimentar, investigar modos para limitar e reduzir o excesso de tecido adiposo é um

dos maiores desafios na área da saúde atualmente (Müller *et al.*, 2022). Nesse sentido, o estudo e a busca por maneiras para controlar a ingestão alimentar pode ser uma oportunidade terapêutica para esses pacientes.

1.1 OBESIDADE E DIETAS OBESOGÊNICAS

A obesidade é uma doença crônica caracterizada por acúmulo excessivo de tecido adiposo, classificada por meio do cálculo de Índice de Massa Corporal (IMC)¹. É considerada um dos principais fatores de risco ao desenvolvimento de Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNTs), e.g., diabetes e doenças cardiovasculares (OMS, 2021), além de distúrbios psiquiátricos, como a depressão (Luppino; *et al.*, 2010). A Associação Médica Americana (AMA - *American Medical Association*) reconheceu a obesidade como doença apenas em 2013, cerca de 10 anos atrás, entretanto as taxas de sobrepeso e obesidade vêm crescendo ao longo das últimas décadas.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), entre os anos de 1975 e 2016, a prevalência de obesidade no mundo triplicou, sendo que em crianças e adolescentes de 5 a 19 anos aumentou mais de quatro vezes, de 4% para 18% em todo o mundo. Em 2016, 39% dos adultos entre a população mundial estavam com sobrepeso e 16% com obesidade (OMS, 2021). Já no Brasil, de acordo com a Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), os números dessa saíram de 11,8% em 2006 para 22,4% em 2021, tendo frequências semelhantes quando comparado os números entre homens (22%) e mulheres (22,6%). Quando comparado os valores de pessoas com excesso de peso no Brasil no mesmo ano de 2021, isto é, valores de IMC maiores ou iguais a 25 kg/m², os valores chegam em 57,2% para população geral adulta das 27 capitais brasileiras, sendo 59,9% para homens e 55,0% para mulheres. Apesar dos valores semelhantes para ambos os sexos, nas mulheres os percentuais de excesso de peso caem conforme aumenta o nível de escolaridade e nos índices de obesidade o mesmo acontece para ambos os sexos (Brasil, 2022).

¹ IMC= Massa (kg) ÷ Altura (m)². IMC ≥25 até 29,9kg/m² (sobrepeso) e IMC >30,0kg/m² (obesidade).

Em Florianópolis, capital do Estado de Santa Catarina, neste mesmo ano 56,9% dos adultos apresentavam excesso de peso, sendo 20,2% com obesidade (Brasil, 2022). Quando avaliado as diferenças entre os sexos, 59,5% dos homens adultos e 54,5% das mulheres acima de 18 anos apresentavam excesso de peso, sendo 21,4% e 19,2% os índices de obesidade para homens e mulheres, respectivamente (Brasil, 2022).

Com os crescentes números da doença em todo o mundo, a Federação Mundial da Obesidade (do inglês *World Obesity Federation*) estima que em 2035 mais de 4 bilhões de indivíduos ou mais da metade da população (51%) acima de 5 anos de idade terá um IMC maior que 25kg/m², isto é, viverá com sobrepeso ou obesidade. Desses, quase 2 bilhões ou 24% será de IMC maior de 30 kg/m², caracterizando obesidade (World Obesity Federation, 2023).

De forma geral, os fatores associados ao desenvolvimento da obesidade estão na presença de um ambiente obesogênico, levando a um balanço energético positivo, onde a ingestão calórica é maior que o gasto energético. Isto se dá principalmente pelo aumento no consumo de alimentos de alta densidade calórica, ricos em gorduras e açúcares, e pela diminuição da atividade física (OMS, 2021). Essas mudanças nos padrões alimentares e de atividade física são consequências decorrentes principalmente das mudanças de estilo de vida nas últimas décadas. O ser humano passou a se movimentar menos com as mudanças nas formas de trabalho, no transporte e com a urbanização. Além disso, ocorreu a introdução e o aumento do consumo de alimentos processados e ultraprocessados, onde seu consumo está amplamente associado com o surgimento da doença (Blüher, 2019; OMS, 2021). Devido a sua alta durabilidade nas prateleiras, esses produtos alimentícios são encontrados muitas vezes com mais fácil acesso geográfico e financeiro, além de serem amplamente divulgados através do *marketing* e de embalagens atrativas para o consumidor, seja ele adulto ou infantil (Blüher, 2019).

Nesse sentido, os fatores que podem contribuir para a prevenção e diminuição das taxas de obesidade e sobrepeso estão na construção de um ambiente mais favorável, levando a um menor consumo de dietas hipercalóricas e aumento do gasto energético (OMS, 2021).

Entretanto, a etiologia da doença é muito mais complexa. Há diversos fatores que regulam a balança do consumo e gasto energético para que ela possa estar em equilíbrio. Dentre eles existem fatores sociais e ambientais, que incluem cultura alimentar, políticas públicas, sistema econômico, transporte, local e turno de trabalho, televisão e mídias sociais, jogos eletrônicos, uso de drogas, poluição sonora, estresse, marketing de alimentos, disponibilidade e acesso aos alimentos, entre outros. Por outro lado, existem diversos outros fatores que influenciam na biologia do indivíduo. São eles: genética, epigenética, uso de medicamentos, inflamação, relógios internos, sono, microbiota intestinal, tecido adiposo marrom, quantidade e distribuição de tecido adiposo branco, dor, sarcopenia, resistência à insulina, sinais periféricos para o Sistema Nervoso Central (SNC), circuitos neurais de regulação de fome e saciedade, doenças psiquiátricas, circuitos neurais de recompensa, etc. (Blüher, 2019).

Com um consumo maior de alimentos do que de gasto energético, o excesso de nutrientes passa a ser estocado como triglicerídeos e ácidos graxos através da sua síntese pela lipogênese no tecido adiposo (Barakat; Almeida, 2021; Jin *et al.*, 2023). Para esse armazenamento, ocorre uma hipertrofia das células, ou seja, um aumento em seus tamanhos para estocar triacilgliceróis, e hiperplasia, aumentando o número de células adiposas nesse tecido, levando ao aumento da massa corporal do indivíduo por aumento do seu tecido adiposo (Barakat; Almeida, 2021; Jin *et al.*, 2023; Langin, 2021).

Esse aumento do tecido adiposo e outros fatores como excesso de nutrientes na corrente sanguínea estão ligados com processos inflamatórios em diferentes órgãos, decorrentes da obesidade, como no tecido adiposo, fígados, pâncreas, cérebro e possivelmente no músculo (Gregor; Hotamisligil, 2011). Por exemplo, o excesso de nutrientes circulantes, seja por uma dieta rica em gordura ou carboidratos, contribui para estimular uma resposta inflamatória, aumentando a expressão de mediadores inflamatórios, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação do fator nuclear kB (NF-kB), fator de transcrição que regula genes envolvidos em respostas imunes e inflamatórias (Gregor; Hotamisligil, 2011; Jin *et al.*, 2023; Liu, Ting *et al.*, 2017). Sendo que esse aumento pode se dar dentro de algumas horas após a ingestão de uma refeição com excesso de gordura e carboidratos (Aljada *et al.*, 2004).

No tecido adiposo, a ativação intracelular das cinases c-Jun N-terminal (JNK) e da proteína cinase de IKB (IKK) por mediadores inflamatórios devido ao excesso de nutrientes, pode contribuir para a fosforilação no substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) no nível da serina, levando a uma inibição da cascata de insulina (Gregor; Hotamisligil, 2011). Além do mais, outras cinases como a dependente de RNA (PKR), quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC) podem levar a essa fosforilação inibitória do IRS-1 (Gregor; Hotamisligil, 2011). Como consequência, haverá mais glicose circulante, pois com esse prejuízo na sinalização da insulina, os transportadores de glicose (GLUTs) não serão translocados à membrana celular (Barakat; Almeida, 2021; Jin *et al.*, 2023). Sem a translocação dos GLUTs haverá um prejuízo na entrada de glicose nessas células. Ao final, esse excesso de glicose pode retroalimentar o ciclo, levando a uma maior resposta inflamatória, maior resistência à insulina, e assim exacerbar ainda mais a inflamação (Gregor; Hotamisligil, 2011). Essas cinases inflamatórias também ativam vias que aumentam a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como NF- κ B e fatores reguladores de Interferon (IRFs). A cinase PKR, por exemplo, também pode levar a prejuízos na síntese anabólica. Isso acontece, pois, sua ativação fosforila e assim inibe o fator de iniciação eucariótica 2 (eIF2- α), que é responsável por mediar a ligação entre o RNA transportador com o ribossomo, acontecimento crucial para a transcrição de proteínas (Gregor; Hotamisligil, 2011).

Outro mecanismo que contribui para a resistência à insulina é a transcrição promovida através de uma via a partir da sinalização de interleucinas como a IL-6, do supressor da sinalização de citocina (SOCS), que está envolvido na degradação do IRS-1 (Gregor; Hotamisligil, 2011). Além disso, na obesidade ocorre infiltração de macrófagos no tecido adiposo branco, fator que contribui para a resistência à insulina sistêmica (Gregor; Hotamisligil, 2011).

Além da inflamação periférica, dietas ricas em gordura e a obesidade levam à inflamação no SNC. A sinalização de hormônios como insulina e leptina no hipotálamo são essenciais para o controle de sinais de fome e saciedade. Com o consumo crônico de dietas hiperlipídicas (HFD, do inglês *high fat diet*) e assim positivamente do balanço energético corporal, ocorre o aumento do tecido adiposo, e assim, ativação de vias de cinases inflamatórias, aumentando a liberação de citocinas pró-inflamatórias levando à resistência à leptina e à insulina de forma central (De Souza *et al.*, 2005). Como

consequência, ocorre uma diminuição nos sinais de saciedade, podendo levar ao aumento do consumo alimentar, exacerbando ainda mais o ganho de peso (Gregor; Hotamisligil, 2011). Também, sinais de inflamação podem levar à ativação de vias de apoptose. Nesse sentido foi demonstrado por Moraes e colaboradores que o consumo crônico de HFD pode levar à apoptose em neurônios hipotalâmicos (Moraes *et al.*, 2009).

Outra mudança importante com o consumo de dietas hipercalóricas e ganho de peso, é a diminuição do tecido adiposo marrom. Apesar do nome, esse tecido tem funções antagônicas ao tecido adiposo branco que armazena o excesso de nutrientes em formato de gordura. Nas células do tecido adiposo marrom, há uma grande presença de mitocôndrias para dissipar energia através da produção de calor, isto é, gastam energia. Entretanto, a presença e a funcionalidade desse tecido são indiretamente proporcional à idade e ao IMC (Morrison, 2016; Saely; Geiger; Drexel, 2011; Schulz; Tseng, 2013).

Por outro lado, quando analisamos a obesidade e o consumo crônico de HFD em questões comportamentais e cognitivas, encontramos que estão intimamente associadas com a comportamentos do tipo depressivo (Tsai *et al.*, 2022). Em 2010, uma revisão sistemática com meta-análise conduzida por Luppino e colaboradores, associou pessoas com sobrepeso e obesidade a um risco maior para o desenvolvimento de depressão (Luppino *et al.*, 2010). Além da depressão, com as alterações metabólicas, inflamação e mudanças em sinalizações que a obesidade e esse padrão alimentar têm, essa doença também tem sido associada como fator de risco para doenças neurodegenerativas como o Alzheimer e doença de Parkinson (De Felice; Gonçalves; Ferreira, 2022; Mazon *et al.*, 2017).

Ainda, a obesidade também é associada com disfunções cognitivas como prejuízos na tomada de decisão, controle inibitório, processo de aprendizado e memória de trabalho e atenção. Por outro lado, está associada a respostas aumentadas a sinais e pistas de comida em regiões cerebrais envolvidas com recompensa e motivação e emoções e memória (Li *et al.*, 2023).

1.2 TRANSTORNOS ALIMENTARES

Além da obesidade, outras doenças estão ligadas a desregulações no comportamento alimentar, exemplo são os transtornos alimentares (TAs), doenças psiquiátricas caracterizadas por perturbações na alimentação. Os TAs são diagnosticados e descritos conforme o Manual Estatístico Diagnóstico V (DSM- V - TR). Dentre os transtornos existentes, o Transtorno de Compulsão Alimentar (TCA) é mais frequentemente associado à obesidade (American Psychiatric Association, 2023; Udo; Grilo, 2018).

O TCA é caracterizado por episódios de compulsão alimentar tendo dois aspectos essenciais: 1) ingestão, em um período determinado, de uma quantidade de alimentos maior do que a maioria dos indivíduos consumiria sob as mesmas circunstâncias, e 2) uma sensação de perda de controle sobre a ingestão durante o episódio (American Psychiatric Association, 2023; Giel *et al.*, 2022). Além do mais, é associado com três ou mais dos seguintes critérios: 1) comer muito mais rápido que o normal; 2) comer até se sentir desconfortavelmente cheio; 3) comer grandes quantidades de alimento na ausência da fome física; 4) comer sozinho por vergonha; e 5) sentir desgostoso de si mesmo; deprimido ou muito culpado em seguida (American Psychiatric Association, 2023).

Na fisiopatologia desse transtorno alimentar, parece haver uma desregulação nos níveis de peptídeos hormonais que controlam o comportamento alimentar, tendo uma maior resistência na sinalização da saciedade podendo levar a um consumo descontrolado de alimentos (Giel *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2021). Além do mais, há um aumento da atividade de regiões cerebrais envolvidas no desejo e impulso por alimentos mais palatáveis, como os ricos em gordura e açúcares. As alterações nesses circuitos conhecidos como vias mesolímbicas, parecem ser as alterações mais consistentes com os sintomas e diagnóstico de TCA (Bulik *et al.*, 2022; Donnelly *et al.*, 2018; Giel *et al.*, 2022).

Dados indicam que a prevalência geral ao longo da vida de TCA seja de 1,1-1,9% (Ágh *et al.*, 2015) e que ela acomete ambos os sexos, sendo mais prevalente em mulheres jovens (Brownley *et al.*, 2017). Apesar de ser frequentemente associado à obesidade, um grande número de pessoas com TCA não possuem obesidade, e a

maioria das pessoas com obesidade não possuem TCA (Ziauddeen; Farooqi; Fletcher, 2012). Quando analisado os índices de TCA entre pacientes com obesidade que procuraram por intervenções cirúrgicas (cirurgia bariátrica) a prevalência da doença chegou a 17%, sendo o segundo transtorno psiquiátrico mais comum na obesidade, ficando atrás apenas da depressão com 19% (Dawes *et al.*, 2016).

Embora a obesidade e o TCA existam de forma independente, ambas as doenças possuem em sua fisiopatologia alterações nos sistemas e vias que controlam o comportamento alimentar no SNC (Giel *et al.*, 2022; Morton; Meek; Schwartz, 2014).

1.3 COMPORTAMENTO ALIMENTAR

A ingestão alimentar é essencial para a sobrevivência humana e faz parte do comportamento alimentar, sendo esse um comportamento motivado. Seu controle se dá por processos motores, sensoriais, neuroendócrinos e cognitivos, que dependem da relação entre estímulos ambientais externos e internos, como sinais neuroendócrinos relacionados à disponibilidade de nutrientes. Esses controles visam garantir que a quantidade ingerida de nutrientes corresponda com a energia requerida para manter a homeostase energética do corpo. Essas sinalizações ocorrem de forma bidirecional entre a periferia do corpo e o SNC (Schwartz; Zeltser, 2013)

Entretanto, o comportamento alimentar é realizado por meio da integração de dois mecanismos: o homeostático e o hedônico. O primeiro se refere ao consumo alimentar necessário para manter as funções metabólicas e o peso corporal do indivíduo. Já no comportamento hedônico, se refere ao comportamento alimentar guiado pela percepção sensorial de prazer (Berthoud; Münzberg; Morrison, 2017; Lee; Dixon, 2017).

1.3.1 Comportamento Alimentar Homeostático

A regulação homeostática do comportamento alimentar se dá por meio da ação de hormônios que induzem ou inibem o comportamento alimentar, regulados a nível central pelo hipotálamo (Morton; Meek; Schwartz, 2014). O hipotálamo é uma região do cérebro que possui cerca de 4 gramas, sendo simétrico em cada um dos hemisférios do cérebro, separados pelo terceiro ventrículo (Pop; Crivii; Opincariu, 2016). É considerado uma estrutura de ligação entre o sistema nervoso e o sistema

endócrino, pois sua principal função é manter a homeostase do corpo, como temperatura corporal, hidratação, ritmo circadiano, reprodução, e neste caso, a alimentação do indivíduo (Pop; Crivii; Opincariu, 2016). Essa regulação da alimentação é feita com base em níveis de hormônios, peptídeos gastrointestinais e nutrientes na corrente sanguínea, que serão identificados por regiões do hipotálamo, principalmente no núcleo arqueado, após atravessarem a barreira hematoencefálica (BHE) de forma passiva.

Essa regulação pode ser de curto ou de longo prazo. A regulação de longo prazo se refere à regulação do balanço e dos estoques energéticos corporais, principalmente pelos níveis de leptina circulantes na corrente sanguínea. Já a regulação de curto prazo se refere à regulação com base nos níveis de nutrientes e de sinais gastrointestinais de saciedade para regular a ingestão alimentar e o gasto energético (Morton; Meek; Schwartz, 2014).

A leptina é um hormônio liberado pelos adipócitos, que são as células do tecido adiposo e circula pelo corpo de forma proporcional aos níveis de gordura estocados pelo corpo, provocando um feedback negativo. Isto é, quanto maiores e em maior quantidade o número de adipócitos, mais leptina será liberada e vice-versa. Níveis plasmáticos maiores de leptina levam a uma diminuição do comportamento alimentar, enquanto níveis menores podem estimular o comportamento alimentar (Morton; Meek; Schwartz, 2014).

A leptina terá sua ação em receptores LepR, que consistem em receptores do tipo tirosina quinase, no núcleo arqueado do hipotálamo. Quanto maior sua quantidade, mais irá estimular os neurônios pró-opiomelanocortina/transcrição regulada pela cocaína e anfetamina POMC/Cart no núcleo arqueado do hipotálamo. Esses neurônios liberam α -MSH que age ativando os receptores de melanocortina (MC4) no hipotálamo lateral, inibindo o comportamento alimentar. Os neurônios POMC/Cart também irão atuar no núcleo paraventricular (NPV) estimulando a liberação do Hormônio Liberador de Tireotrofina (TRH) e corticotrofina (CRH) que atuam na hipófise para liberar o Hormônio Estimulador da Tireoide (TSH) e o Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH). Esses, por sua vez, agem na tireoide e nas glândulas suprarrenais aumentando a taxa metabólica (TM) do organismo. Além do mais, a liberação desses neurotransmissores ativa neurônios do tronco encefálico e

os neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso simpático, provocando uma resposta visceromotora aumentando o tônus simpático, que também aumenta a TM, e uma resposta somatomotora diminuindo o comportamento alimentar (Morton; Meek; Schwartz, 2014).

Por outro lado, em caso de diminuição dos níveis de leptina, e consequentemente menor ação nos receptores do núcleo arqueado, a população de neurônios referida como AgRP/NPY serão ativados, eles co-expressam neuropeptídeo Y (NPY), AgRP e GABA (Morton; Meek; Schwartz, 2014). Esses neurotransmissores vão inibir os neurônios do núcleo paraventricular, que controlam a liberação de TSH e ACTH pela hipófise. Além do mais, a liberação de GABA pelos neurônios AgRP tem o intuito de inibir os neurônios POMC, aqueles que tinham a função de cessar o comportamento alimentar (Cowley *et al.*, 2001). Nesse sentido, também há a liberação do neuropeptídeo AgRP que atua com um efeito antagônico ao a-MSH no receptor MC4 do hipotálamo lateral. Ele inibe o receptor, contribuindo para estimular o comportamento alimentar. Nessa região do hipotálamo lateral, também há outros dois peptídeos: Hormônio Concentrador de Melanina (MCH) e orexina/hipocretina. A orexina é um neuropeptídeo crucial para manter o estado de vigília no corpo, mas que também está envolvido do controle do comportamento alimentar. Esses neurônios são diretamente inibidos pelos níveis de leptina e glicose e estimulados pela grelina (Sakurai, 2014). A orexina inibe neurônios glicoreceptores no hipotálamo ventromedial e excitam neurônios NPY no núcleo arqueado e MCH no hipotálamo lateral, levando ao estímulo do comportamento alimentar. Além do mais, está ligada a um aumento na atividade locomotora e assim, aumento do gasto energético, o que poderiam em partes prevenir ganho de peso (Sakurai, 2014).

Em compensação, na regulação de curto prazo do comportamento alimentar, ou seja, a regulação que ocorre entre as refeições, sinalizações periféricas sinalizam para o hipotálamo fome ou saciedade, e esse por sua vez estimula ou inibe o comportamento alimentar. A fome é sinalizada pela diminuição dos sinais de saciedade e pela liberação de grelina. A grelina é um hormônio liberado pelas células estomacais na ausência de alimentos no estômago, que terá sua ação em seus receptores GHS-R também no núcleo arqueado do hipotálamo, estimulando os neurônios AgRP e NPY, que estimula o comportamento alimentar, aumentando a frequência das refeições (Cowley *et al.*, 2003).

Por outro lado, em uma situação de consumo alimentar, a saciedade é sinalizada por meio de sinais provindos principalmente do trato gastrointestinal (TGI), como o estômago (principalmente por sinais sensoriais), intestino (principalmente por sinais químicos), pâncreas (principalmente pelos níveis de insulina) (Tso; Liu, 2006). O estômago, apesar de conseguir identificar nutrientes presentes na refeição, gera sinais para promover a cessação da ingestão alimentar através da distensão gástrica. Isso ocorre, pois, a parede do estômago é repleta de mecanorreceptores que captam variações na tensão, comprimento e volume desse órgão e sinalizam, através de vias aferentes do nervo vago (décimo par dos nervos cranianos) até o núcleo do tracto solitário no SNC, onde irá processar esse sinal de saciedade para promover o término da refeição (Morton; Meek; Schwartz, 2014; Tso; Liu, 2006).

Além disso, em resposta a digestão de alimentos, ocorre a liberação de peptídeos gastrointestinais como a colecistocinina (CCK), Peptídeo YY (PYY) e do peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) que podem desencadear a inibição do comportamento alimentar (Morton; Meek; Schwartz, 2014).

A CCK, por exemplo, é liberada pelas células I do intestino delgado, com a presença de refeições ricas em proteínas e gorduras. Com sua liberação ativa o receptor CCK-A, que é expresso em sua maioria no TGI, para acionar o eixo intestino-cérebro-fígado e assim, diminuir o consumo alimentar após o processamento deste sinal também no núcleo do tracto solitário (Tso; Liu, 2006) e diminuir a produção de glicose hepática (Lam, 2010). Em 1984, West e colaboradores demonstraram que o CCK está ligado ao tamanho das refeições consumidas, após a realização de um estudo contendo a administração desse peptídeo em ratos durante alguns dias. Todavia, apesar de diminuir o tamanho da refeição quando em maior presença, ele não influencia no controle de peso já que as refeições se tornam mais frequentes e o valor calórico total não é alterado (West; Fey; Woods, 1984).

O GLP-1 é produzido pelas células L no intestino delgado em sua parte mais distal e sua liberação se dá pelo estímulo de nutrientes ingeridos, especialmente gorduras e carboidratos. Esse peptídeo participa no efeito do “freio ileal” para diminuir o esvaziamento gástrico e a motilidade do intestino. Além disso, o GLP-1 tem função de aumentar a liberação de insulina dependente de glicose, inibir a secreção de glucagon e aumenta o crescimento de células β pancreáticas, responsáveis pela

produção de insulina no pâncreas. Com essas funções, promove um aumento na saciedade e diminuição na ingestão alimentar (Drucker, 2006; Tso; Liu, 2006).

Outro peptídeo do TGI que desempenha um papel na sinalização da saciedade, e conseqüentemente na diminuição da ingestão alimentar, é o PPY. Ele é produzido pelas células L do intestino delgado, que em sua maioria expressam também o GLP-1. É secretado de forma proporcional as calorias ingeridas, sendo mais estimulado pela ingestão de lipídios, seguido por carboidratos e proteínas (Degen *et al.*, 2005). Assim como o GLP-1, tem a função de retardar o esvaziamento gástrico, de modo a contribuir com o “freio ileal” (Pironi *et al.*, 1993). Também, através da sua circulação, consegue inibir os neurônios AgRP/NPY no núcleo arqueado do hipotálamo, através do receptor Y2, um receptor auto inibitório pré-sináptico desses neurônios (Small *et al.*, 2002; Tso; Liu, 2006).

Nesse sentido, durante e após uma refeição também ocorre aumento dos níveis de insulina circulantes na corrente sanguínea. A insulina é um hormônio produzido e liberado pelas células β do pâncreas, principalmente devido ao aumento de glicose circulante. Assim como a leptina, circula em quantidades proporcionais a gordura corporal, tendo um papel no sistema de controle de feedback negativo da adiposidade, porém possui um efeito alimentar quantitativamente menor que a leptina (Bagdade; Bierman; Porte, 1967; Morton; Meek; Schwartz, 2014). Da mesma forma que a leptina, tem sua ação no núcleo arqueado do hipotálamo, inibindo os neurônios AgRP/NPY e estimulando os neurônios POMC/Cart para inibição do comportamento alimentar (Morton; Meek; Schwartz, 2014).

Em corroboração a isso, estudos demonstram que uma administração central de insulina diretamente no cérebro reduz a ingestão alimentar e a massa corporal (Halaas *et al.*, 1997; L. Arthur Campfield, Françoise J. Smith, Yves Guisez, Rene Devos, 1995), enquanto que um prejuízo na sinalização neuronal da leptina promove hiperfagia e ganho de peso (Lee *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1994).

Embora exista essa diferenciação entre controle de longo e curto prazo, essa sinalização do controle do comportamento alimentar ocorre de forma integrada, onde a regulação da alimentação entre cada refeição é ajustada conforme as mudanças dos níveis de adiposidade corporal (Morton; Meek; Schwartz, 2014). Dessa forma, a

leptina consegue aumentar a capacidade de sinais de saciedade, como o CCK, oriundos do intestino após a ingestão de alimentos. No mesmo sentido, quando se tem uma redução da ação da leptina, por exemplo após perda de massa corporal em forma de tecido adiposo, tem-se uma redução das respostas de saciedade. Isso acontece tanto pela sinalização da leptina no hipotálamo, quanto pela entrada direta de leptina no NTS, onde os sinais de saciedade chegam para serem processados e terminarem a refeição (Morton; Meek; Schwartz, 2014).

Entretanto, apesar dos controles homeostáticos para manter o equilíbrio entre a ingestão e o gasto energético do corpo, a ingestão alimentar também é influenciada e controlada de acordo com o valor hedônico de cada alimento (Morton; Meek; Schwartz, 2014).

1.3.2 Comportamento Alimentar Hedônico

O comportamento alimentar hedônico se refere ao prazer e ao incentivo motivacional ao comer. Esse sistema pode levar ao consumo alimentar mesmo em indivíduos já saciados, sobrepondo-se ao controle homeostático da ingestão alimentar (Berthoud; Münzberg; Morrison, 2017). É regulado no SNC em vias que incluem majoritariamente neurônios dopaminérgicos mesolímbicos na área tegmental ventral (VTA, do inglês *ventral tegmental area*) que se projetam para o núcleo accumbens (NAc) e outras áreas do prosencéfalo (Giel *et al.*, 2022; Morton; Meek; Schwartz, 2014). A ação da dopamina nessas regiões, conhecida como via de recompensa cerebral, leva à sensação de prazer e, através de conexões entre este circuito e estruturas relacionadas à formação de memórias, desenvolvem-se respostas reforçadoras e formação de hábitos (Tomazi *et al.*, 2017).

Esse mecanismo de controle hedônico envolve aprendizado a partir de experiências com alimentos, normalmente hiper palatáveis, ricos em gorduras e açúcares, que podem agir como recompensas nesse sistema. A recompensa pode ser discriminada em três componentes dissociáveis: gostar (impacto hedônico), querer (saliência motivacional) e aprendizado (associações preditivas) (Berridge; Robinson; Aldridge, 2009).

O gostar de um alimento é diferente de querer ou desejar. Alimentos como os doces podem provocar expressões faciais positivas de “gostar”, como movimentos

com a língua e “lamber os lábios” ao contrário de alimentos como os de gosto amargo que podem provocar expressões faciais negativas (Berridge; Robinson; Aldridge, 2009). As reações de gostar ou não gostar são controladas por circuitos neurais de acordo com o valor e impacto hedônico de um alimento, que pode ser influenciada por fatores como a fome e saciedade e experiências prévias de aprendizado que levam a uma preferência ou aversão a certos alimentos (Berridge; Robinson; Aldridge, 2009). Alguns sistemas neuroquímicos estão envolvidos nas reações do “gostar”, como o sistema de neurotransmissores opioide, endocanabinoide e GABA-benzodiazepínicos, principalmente em regiões límbicas como no NAc (Peciña; Berridge, 2005; Smith; Berridge, 2005).

O querer se refere a saliência de incentivo, uma motivação que promove a aproximação com a recompensa, como o consumo de determinado alimento. Apesar de normalmente desejarmos algo que gostamos, são termos dissociáveis no ponto de vista psicológico e biológico (Berridge; Robinson; Aldridge, 2009). É mediada por sistemas neuronais subcorticais que incluem projeções dopaminérgicas mesolímbicas, não necessitando expectativas cognitivas elaboradas e tem seu foco em estímulos relacionados à recompensa (Berridge; Robinson; Aldridge, 2009).

Também, o desejo pode se referir a estímulos não condicionados ou a estímulos condicionados pavlovianos, isto é, um estímulo não condicionado que foi emparelhado com o recebimento de uma recompensa, levando a um processo de aprendizado. Nesse caso, o estímulo não condicionado quando emparelhado com uma recompensa, é atribuído com uma saliência de incentivo através de mecanismos límbicos. Dessa forma, pode agir como uma pista para motivar o indivíduo a buscar pela recompensa (Robinson; Berridge, 2003).

Um experimento foi realizado com o objetivo de analisar a ativação de neurônios dopaminérgicos em macacos quando ofertados uma quantidade de suco (recompensa) logo após acender uma luz (pista). Nos resultados, constatou-se que após os animais aprenderem que a luz precedia o recebimento da recompensa (pareamento), os neurônios dopaminérgicos se ativavam com a luz, antes mesmo de receber a recompensa. Ao contrário do que aconteceu antes de haver o aprendizado de que a luz precedia o recebimento do suco, onde os neurônios dopaminérgicos se ativaram apenas no recebimento da recompensa (Schultz, 2002).

Nesse mesmo estudo, os autores também demonstraram a capacidade dos neurônios dopaminérgicos sinalizarem erros na “predição da recompensa” conforme a recompensa saia ou não como esperado. Eles verificaram que quando o animal não recebia a recompensa após acender a luz, os neurônios dopaminérgicos se desativaram. Nesse mesmo sentido, quando a recompensa foi melhor do que o esperado pelo animal, houve um aumento na ativação desses neurônios. Por outro lado, quando a recompensa saia como esperado, não havia alteração na atividade dopaminérgica (Schultz, 2002).

Assim, a liberação de dopamina no NAc medeia os aspectos motivacionais da ingestão alimentar, especialmente o desejo de comer alimentos que são hedonicamente desejáveis, sendo fundamental para o desenvolvimento de comportamentos de busca por dicas ou pistas relacionadas à recompensa que as antecedem. Essas associações são adquiridas através do pareamento dessas sugestões (como o cheiro da comida) ao estímulo recompensador (comida). Com o tempo, essas pistas específicas desencadeiam respostas antecipatórias à recompensa. Isto é, há uma liberação de dopamina com as dicas associadas à recompensa, levando o indivíduo a desejar e buscar a recompensa (Schultz, 2010).

Dessa forma, desregulações no sistema de recompensa podem levar a um consumo excessivo de alimentos palatáveis, podendo se sobrepor a regulação homeostática, isto é, levando um indivíduo já saciado a comer (Berthoud; Münzberg; Morrison, 2017; Giel *et al.*, 2022; Nora D. Volkow, Gene-Jack Wang, Dardo Tomasi, 2013).

Todavia esse sistema de controle hedônico atua em conjunto com a regulação homeostática, que tem o poder de modular a percepção de recompensa de um alimento, como seu valor hedônico e a motivação de ir atrás da comida (Morton; Meek; Schwartz, 2014). Os neurônios da área lateral do hipotálamo também se projetam para a região mesolímbica. Assim, quando há uma perda de peso por exemplo, e conseqüentemente uma diminuição nos níveis plasmáticos de insulina e leptina e um aumento da grelina, ocorre um aumento nas propriedades recompensadoras dos alimentos e desta forma, na motivação para comer. Por outro lado, caso ocorra um aumento da massa corporal, e assim dos níveis circulantes de leptina e insulina, acontecerá uma diminuição nas propriedades recompensadoras dos alimentos e um

aumento da resposta dos sinais de saciedade para que o peso retorne ao “normal” e o corpo mantenha sua homeostase energética (Morton; Meek; Schwartz, 2014).

Isso acontece devido à expressão de receptores para leptina e grelina em neurônios dopaminérgicos do VTA. A grelina, por exemplo, aumenta a taxa de disparos desses neurônios dopaminérgicos aumentando os níveis de dopamina no NAc e induz Preferência Condicionada ao Lugar (PCL) em ratos condicionados com injeção de grelina na performance desse teste (Jerlhag, 2008; Jerlhag *et al.*, 2006; Quarta *et al.*, 2009). King e colaboradores demonstraram que a administração de grelina no VTA de roedores aumentou o consumo alimentar de ração de forma dependente da dose levando ao aumento da massa corporal dos animais, e que esse efeito era abolido quando administrado antagonistas de grelina. Além do mais, quando administrado grelina em animais com restrição alimentar, eles trabalharam mais por comida quando comparado com grupos que receberam salina ou antagonista de grelina (King *et al.*, 2011). Esses dados demonstram que a grelina aumenta a motivação e ingestão alimentar através da sua ação em receptores presentes na via de recompensa.

Por outro lado, neurônios dopaminérgicos do VTA também co-expressam em sua maioria receptores para leptina (LepR) (Figlewicz *et al.*, 2003; Hommel *et al.*, 2006). Ao contrário da grelina, sua ação nessa região despolariza neurônios dopaminérgicos diminuindo seus disparos. Por exemplo, a administração central de leptina diminui o consumo alimentar enquanto animais *knockdown* de receptor LepR no VTA leva a aumento do consumo alimentar, atividade locomotora e aumenta a sensibilidade para alimentos palatáveis (Hommel *et al.*, 2006). Em outro estudo, a administração central de leptina também diminuiu a autoadministração de sacarose em ratos, todavia animais alimentados com HFD foram resistentes a esses efeitos, sugerindo uma resistência central à sinalização da leptina (Figlewicz *et al.*, 2006).

Além do mais, a orexina, neuropeptídeo importante para a regulação do comportamento alimentar homeostático, também tem um papel na recompensa e no comportamento alimentar hedônico. Com a sinalização da grelina nos neurônios que expressam orexina no núcleo arqueado do hipotálamo, ocorre uma excitação desses neurônios. Com isso, pode levar a um aumento da motivação pela busca por comida especialmente por alimentos palatáveis. Isso acontece, pois, os neurônios

orexinérgicos também tem projeções excitatórias para os neurônios dopaminérgicos do VTA, que expressam receptores de orexina (OX1R e OX2R). Com a sinalização da orexina nesses receptores, ela consegue aumentar a atividade desses neurônios dopaminérgicos apoiando comportamentos motivados como a ingestão alimentar (Sakurai, 2014).

Juntos, esses fatos demonstram uma relação entre a regulação do comportamento alimentar homeostático com o hedônico. Entretanto, outro sistema atua em ambas as formas de controle do comportamento alimentar para diminuir ou aumentar a ingestão alimentar.

1.3.3 Sistema Endocanabinoide e Comportamento Alimentar

Além dos hormônios como leptina, grelina, insulina e dos peptídeos YY, CCK, NPY, AgRP e do sistema dopaminérgico, os endocanabinoides também estão envolvidos na regulação da ingestão de alimentos e em seus efeitos reforçadores (Konstantakopoulos, 2018).

O sistema endocanabinoide (eCB) participa na regulação central do comportamento alimentar, pois os endocanabinoides interagem com neurotransmissores clássicos em neurônios que controlam o metabolismo energético e o comportamento alimentar (Horn *et al.*, 2018). Além do mais, esse sistema é conhecido por ser ativado em situações que envolvem jejum alimentar para promover o consumo alimentar (Pagotto *et al.*, 2006). Esse sistema é formado por dois receptores acoplados à proteína G: o CB1 e o CB2, sendo o primeiro mais expresso no SNC, principalmente em regiões conhecidas por participarem da via de recompensa, adição e funções cognitivas como hipocampo, córtex pré-frontal (CPF), NAc, VTA, amígdala, córtex cingulado, hipotálamo lateral, entre outros (Glass; Dragunow; Faull, 1997; Wang *et al.*, 2003). Já o segundo, por outro lado, é encontrado principalmente em células imunes periféricas, porém também é expresso em neurônios, células de glia e células endoteliais em regiões do SNC, como na via de recompensa. Entretanto, a nível central o CB2 não é tão amplamente expresso como os receptores CB1 (Atwood; MacKie, 2010; Cota *et al.*, 2003; Di Marzo *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2006; NÚÑEZ *et al.*, 2004; Rossi *et al.*, 2018; Xi *et al.*, 2012).

Os canabinoides endógenos, isto é, canabinoides produzidos pelo organismo, são os ligantes desses receptores constituídos por ácidos graxos poli-insaturados. Os principais são a anandamida (AEA) e 2-araquidonilglicerol (2-AG). Por essa característica lipídica, não são armazenados em vesículas e precisam ser produzidos conforme a demanda, através da clivagem de precursores e são liberados por meio de mecanismos dependentes de cálcio (Parsons; Hurd, 2015). Ambos canabinoides exercem papel como agonistas dos receptores CB1 e CB2. Entretanto, podem ter diferentes níveis de afinidade pelo receptor e eficácia como agonista. A AEA, por exemplo, possui mais afinidade com o receptor CB1 em comparação com o receptor CB2, todavia exibe uma baixa eficácia como agonista em ambos. Já o 2-AG possui afinidade igual nos dois tipos de receptores, e tem uma atividade agonista maior que AEA (Parsons; Hurd, 2015).

Além dos receptores canabinoides, os endocanabinoides também interagem com outros alvos, como um canal iônico localizado em terminais nervosos pós-sinápticos, conhecido como receptor Potencial Transitório de Vaniloide tipo-1 (TRPV1), cuja ativação pelos endocanabinoides leva à despolarização dos neurônios (Louis-gray; Tupal; Premkumar, 2022). Outro alvo são os receptores Ativados por Proliferador de Peroxissoma (PPAR), especialmente subtipo PPAR- α , expresso principalmente no fígado, rins, músculos e coração. Estão ligados à manutenção da homeostase energética e regulam alguns aspectos do metabolismo lipídico pela estimulação da expressão de alguns genes (Escher; Wahli, 2000; Wu *et al.*, 2014).

De maneira geral, os endocanabinoides atuam como neuromoduladores retrógrados. São liberados por neurônios pós-sinápticos despolarizados para agir nos receptores canabinoides que em sua maioria estão em neurônios pré-sinápticos (atuação parácrina) ou no próprio neurônio (atuação autocria) (Godoy-Matos *et al.*, 2006). Com isso, essa ativação diminui a excitabilidade de neurônios reduzindo a liberação de neurotransmissores excitatórios e inibitórios e neuropeptídeos (Di Marzo; Ligresti; Cristino, 2009; Godoy-Matos *et al.*, 2006; Wilson; Nicoll, 2001).

Devido a ampla localização dos receptores canabinoides no SNC e sua presença em diferentes tipos de neurônios, como neurônios GABAérgicos, glutamatérgicos e dopaminérgicos, o efeito da ativação desses receptores vai depender da localização dos receptores ativados. Devido a isso, as respostas

desencadeadas podem ter efeitos diferentes e até antagonicos (Bellocchio *et al.*, 2010). Por exemplo, um estudo foi realizado utilizando mutação genética com depleção total para o gene de receptores CB1 (CB1 -/-) ou apenas em diferentes neurônios (GABAérgicos, Glutamatérgicos ou ambos). Eles verificaram que quando havia a depleção total dos receptores CB1 (CB1 -/-) no animal, o consumo alimentar foi menor comparado com animais que não tinham mutação genética. Quando a depleção aconteceu apenas em neurônios glutamatérgicos, os animais tiveram um fenótipo similar, porém quando a depleção era em neurônios GABAérgicos os animais demonstraram hiperfagia. Entretanto, quando a depleção ocorreu em ambos os tipos de neurônios, GABA e glutamatérgicos, as duas mutações parecem compensar uma à outra, não alterando o comportamento alimentar dos animais. Esses resultados mostram que apesar da ativação de receptores CB1, a transmissão de vias GABAérgicas e glutamatérgicas dependentes de CB1 possuem efeitos antagonicos no comportamento alimentar (Bellocchio *et al.*, 2010).

Assim, pelo papel que os endocanabinoides desempenham no controle e balanço energético do corpo, pela capacidade desse sistema ser ativado no jejum e por ser produzido sob demanda, os níveis de endocanabinoides mudam em relação ao *status* energético do corpo. Isto é, aumentam em situação de jejum e diminuem conforme se alimenta (Gatta-Cherifi; Cota, 2016; Pagotto *et al.*, 2006; Parsons; Hurd, 2015).

No hipotálamo, região de grande importância no controle homeostático do comportamento alimentar, o receptor CB1 é amplamente expresso nos axônios em todos os seus núcleos, como o NPV, hipotálamo lateral, núcleo arqueado, entre outros (Di Marzo; Ligresti; Cristino, 2009). Hormônios como a leptina interagem com os endocanabinoides, regulando-os de forma negativa através dos receptores pós-sinápticos de leptina, inibindo a síntese dos endocanabinoides por diminuir a concentração de cálcio intracelular (Di Marzo; Ligresti; Cristino, 2009). Com isso, também diminui a ativação dos neurônios orexígenos dependentes de CB1, que liberam MCH pelo hipotálamo lateral, para promover comportamento alimentar (Di Marzo *et al.*, 2001; Jo *et al.*, 2005).

Além do mais, quando há algum prejuízo na sinalização da leptina, como em casos de obesidade, ocorre um aumento nos níveis de endocanabinoides, o que

contribui para a hiperfagia levando a um quadro de obesidade ou ao agravamento da doença (Di Marzo *et al.*, 2001). Isso se dá em parte pela desinibição da liberação de MCH por meio de uma inibição retrógrada do GABA através dos receptores CB1, levando ao estímulo do comportamento alimentar (Di Marzo; Ligresti; Cristino, 2009; Jo *et al.*, 2005).

Por outro lado, o efeito orexigênico da ação da grelina no hipotálamo se dá através da sinalização canabinoides. A sinalização da grelina também aumenta os níveis de endocanabinoides no hipotálamo e inibe os neurônios anorexígenos do NPV do hipotálamo. Entretanto, quando há um prejuízo na sinalização endocanabinoide, a grelina não é capaz de promover seus efeitos orexígenos, demonstrando que é necessário a presença desse sistema para promover o estímulo do comportamento alimentar através desse hormônio (Kola *et al.*, 2008).

Na via de recompensa, o sistema eCB também desempenha um papel regulador, por meio da ativação dos receptores canabinoides que modulam a atividade dos neurônios dopaminérgicos envolvidos nas respostas relacionadas à recompensa (Maldonado; Valverde; Berrendero, 2006). O uso, por exemplo, de canabinoides sintéticos agonistas do receptor CB1 aumenta a função de recompensa do cérebro e a produção de efeitos de recompensa no teste de preferência condicionada ao lugar (PCL) (Vlachou; Panagis, 2014). Assim, a ativação dos receptores CB1 no NAc, leva a um aumento do efeito da dopamina na via da recompensa, podendo aumentar o consumo alimentar (Konstantakopoulos, 2018). Além do mais, os endocanabinoides parecem ter um papel no aumento da sensibilidade ao sabor doce via CB1, pois a administração exógena de 2-AG e AEA aumentaram a resposta celular ao doce e o uso de antagonistas CB1 bloquearam o efeito (Tarragon; Moreno, 2018).

Nesse sentido, foi demonstrado que o padrão dietético também influencia nos níveis de canabinoides endógenos. Dietas ricas em Ômega-6 ácido graxo poliinsaturado (PUFA, do inglês *polyunsaturated fatty acids*) e pobres em ômega-3 PUFA aumentam os níveis de AEA e 2-AG no cérebro. E que a suplementação crônica de ácido docosahexaenóico (DHA) e ácido eicosapentaenoico (EPA) diminuem os níveis plasmáticos de AEA (Berge *et al.*, 2013; Berger *et al.*, 2001; Watanabe; Doshi; Hamazaki, 2003). Isso é especialmente relevante, pois a razão ômega 6/ ômega 3 é

elevada no padrão de dieta ocidental conhecido como rico em açúcares e em gorduras. Outro estudo demonstrou em roedores que um padrão alimentar mais “ocidental”, utilizando HFD e sacarose de forma crônica também elevou os níveis plasmáticos de 2-AG e AEA, consumo alimentar e ganho de peso. Entretanto, quando administrado de forma periférica um agonista do receptor CB1, esses efeitos da dieta eram suprimidos (Argueta; Dipatrizio, 2017).

Devido a essas funções do receptor CB1, ele começou a ser estudado como alvo farmacológico para tratamento da obesidade, por meio do uso de antagonistas ou agonistas inversos desse receptor. Com isso poderia ter um papel terapêutico no tratamento dessa doença e de transtornos alimentares com desregulação na via de recompensa. Estudos utilizando tratamentos com bloqueadores deste receptor demonstraram efeitos positivos na diminuição do apetite e peso corporal, como foi o caso do fármaco antiobesidade Rimonabanto (Després; Golay; Sjöström, 2005; Van Gaal *et al.*, 2005). Entretanto, apesar desse efeito promissor, efeitos adversos psiquiátricos foram relatados, como aumento de ansiedade e intenção de suicídio de pacientes que utilizavam o fármaco, assim ele foi retirado do mercado em 2008 (Di Marzo; Després, 2009).

Sob outra perspectiva, a ativação dos receptores CB2, em neurônios dopaminérgicos da VTA, modulam negativamente a liberação de dopamina no NAc, diminuindo a excitabilidade desses neurônios (Ma *et al.*, 2019). Essa ativação levaria à uma redução do consumo de substâncias que agem como recompensas, como drogas e alimentos, suprimindo os comportamentos reforçadores (Canseco-Alba *et al.*, 2019; Liu, Qing-rong *et al.*, 2017; Onaivi *et al.*, 2008; Xi *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014, 2015, 2017). Por exemplo, um estudo utilizando camundongos mutantes geneticamente para superexpressar o receptor CB2, demonstrou que esses animais com uma quantidade maior de receptores CB2 tiveram um consumo menor de cocaína e resposta motora menor quando comparado aos animais sem mutação genética (Aracil-Fernández *et al.*, 2012). Nesse sentido, Canseco-Alba e colaboradores mostraram que um pré-tratamento com agonista do receptor CB2 bloqueou o efeito da preferência condicionada ao lugar provocada por cocaína e nicotina em comparação à animais sem tratamento (Canseco-Alba *et al.*, 2019).

Já no contexto da alimentação, tem se estudado a estimulação do receptor CB2 para promover efeitos antiobesidade, como a redução da ingestão de alimentos e o ganho de peso sem impacto no humor ou desencadeando efeitos psicóticos adversos como relatados no uso de antagonistas CB1 (Rossi *et al.*, 2018).

Além da alimentação, o sistema eCB tem efeitos na termogênese, no peso corporal e no metabolismo lipídico e glicolítico por estar envolvido no processo de transformação de células adiposas brancas em células adiposas marrons (Rossi, 2018). Apesar do receptor CB1 ser majoritariamente expresso no SNC, ele também é expresso de forma mais periférica, tendo evidências do impacto da sua ativação de forma negativa na termogênese. Em corroboração, estudos utilizando agonista inverso ou antagonista com distribuição mais periférica do receptor CB1, foram capazes de aumentar a troca de tecido adiposo branco para marrom (Akbas *et al.*, 2009; Bellocchio *et al.*, 2008; Gary-Bobo *et al.*, 2006).

Por outro lado, os receptores CB2 também parecem estar envolvidos na homeostase energética (Verty *et al.*, 2015). A administração de antagonista deste receptor parece aumentar adipocinas inflamatórias, estoque de gordura e diminuição da transformação de tecido adiposo branco em marrom. Porém o uso de agonista CB2 parece reverter esses efeitos obesogênico, aumentando a geração de calor e o gasto energético através do tecido adiposo marrom (Rossi *et al.*, 2016). Em outro estudo, verificou-se os efeitos do uso de crônico de agonista CB2 em animais que foram induzidos à obesidade por meio da dieta. A ativação desse receptor atenuou o ganho de peso, diminuiu o consumo alimentar, aumentou marcadores de lipólise e melhorou a resposta inflamatória, aumentando a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 e diminuindo TNF- α . Além do mais, reduziu níveis plasmáticos de insulina, triglicerídeos e transaminase oxalacética (TGO), melhorou o metabolismo da glicose no teste de tolerância à glicose (GTT, do inglês *Glucose Tolerance Test*) e reduziu o tamanho de células adiposas (Verty *et al.*, 2015). Já quando avaliado a questão de humor desses animais, o tratamento crônico não teve efeito no comportamento tipo-depressivo avaliado pelo teste de nado forçado (Verty *et al.*, 2015).

Assim, quando comparado aos receptores CB1, os receptores CB2 parecem ter vantagens se tratando de alvo terapêutico, pois os estudos indicam ser alvo promissor na descoberta de novos tratamentos para distúrbios envolvendo

desregulação na via de recompensa como compulsão alimentar e a obesidade sem provocar efeitos adversos no SNC (Rossi *et al.*, 2018).

1.4 CORDIA VERBENACEA

A *Cordia verbenacea* é uma planta medicinal nativa brasileira popularmente conhecida como Erva Baleeira que pode ser encontrada ao longo da costa sudeste do Brasil, que pertence à família das Boragináceas. As partes aéreas dessa planta vêm sendo utilizadas pela medicina popular como extratos, decocções e infusões para efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, reumáticos, cicatrização de feridas e outros (Martim; Maranhão; Costa-Casagrande, 2021; Sertié *et al.*, 2005). Além do mais, estudos utilizando o óleo essencial da *Cordia verbenacea* demonstraram efeitos anti-inflamatórios, antialérgicos, antibacteriano e cicatrizante (Fernandes *et al.*, 2007; Martim; Maranhão; Costa-Casagrande, 2021; Passos *et al.*, 2007; Pimentel *et al.*, 2012).

Esses efeitos são relatados principalmente pela composição do óleo essencial por terpenos como o cariofileno, alfa-humuleno, alfa copaeno, beta-sesquifelandreno e outros. Alguns destes também vêm sendo estudados isoladamente, como no caso do alfa-pineno e cariofileno que são aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos como aditivos alimentares. Estudos com alfa-pineno demonstraram efeitos anti-inflamatório, antifúngico, antibacteriano, antiviral, contra células tumorais, neuroprotetor e outros (Allenspach; Steuer, 2021).

No caso do cariofileno, já foi demonstrado seu potencial na diminuição do estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (Ullah *et al.*, 2021), na redução de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α especialmente em doenças caracterizadas pela inflamação e estresse oxidativo, como doenças metabólicas e neurodegenerativas (Scandiffio *et al.*, 2020), com propriedades anticâncer e analgésica (FIDYT *et al.*, 2016), potencial neuroprotetor (Machado *et al.*, 2018), potencial terapêutico no diabetes (Hashiesh *et al.*, 2020) e na diminuição da saliência motivacional por alimento palatável (Barbosa *et al.*, 2023).

Além do mais, estudos com cariofileno demonstram efeito protetor da sua suplementação em roedores na dislipidemia e inflamação cardiovascular induzidas por HFD (Niegawa *et al.*, 2018; Youssef; El-Fayoumi; Mahmoud, 2019), na redução

da resistência à insulina em modelo de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) induzidos através de dieta hiperlipídica e frutose (HFFD, do inglês, *high fat and fructose diet*) (Mani *et al.*, 2021) e na proteção contra mudanças comportamentais induzidas também por dieta, como prejuízos comportamentais frente a um estresse agudo inescapável, comportamento anedônico, de autocuidado e déficit de memória (Youssef; El-Fayoumi; Mahmoud, 2019).

Em relação à farmacodinâmica, estudos demonstram que os efeitos benéficos da suplementação com cariofileno ou outros agonistas CB2, como agonistas sintéticos, são suprimidos quando realizado previamente tratamento com antagonista desse receptor (e.g. AM630), sugerindo efeitos dependentes de CB2. Os efeitos benéficos incluem: proteção contra malefícios provocados por consumo de dietas ricas em gordura e açúcares, diminuição da massa corporal e tecido adiposo, menor consumo alimentar (mesmo após períodos de jejum), melhora do metabolismo glicídico e inibição das propriedades reforçadoras e motivacionais induzidas por alimento palatável, e proteção contra comportamento ansiogênico, tipo-depressivo e prejuízos na memória causados por HFFD (Barbosa *et al.*, 2023; Hashiesh *et al.*, 2020; Verty *et al.*, 2015; Youssef; El-Fayoumi; Mahmoud, 2019).

Através de uma ferramenta *web*, SwissTargetPrediction, online desde 2014, que visa prever os alvos proteicos mais prováveis de pequenas moléculas, onde as previsões são baseadas no princípio da similaridade, por meio de triagem reversa, os compostos presentes do óleo essencial de *Cordia verbenacea* podem ser analisados quanto seus alvos proteicos (Daina; Michielin; Zoete, 2019). Assim, nota-se que alguns compostos possuem atividade no receptor CB2 como o cariofileno, alfa-pineno, alfa-copaeno e beta-sesquifelandreno, sem afinidade pelo receptor CB1.

Por essas características, o óleo essencial de *Cordia verbenacea*, parece ser um candidato em potencial como alvo terapêutico para condições que envolvam desregulações na via de recompensa e na ingesta alimentar, como obesidade e TCA. Esse efeito se daria principalmente através de uma modulação do sistema endocanabinoide pela composição de óleo com terpenos que possuem afinidade pelo receptor CB2. Dessa forma, a hipótese desse estudo é que o óleo de *Cordia verbenacea* apresenta efeitos na diminuição do consumo alimentar crônico de dieta hiperlipídica e frutose, amenizando seus efeitos metabólicos e comportamentais.

2 JUSTIFICATIVA

A obesidade é uma doença crônica grave que atinge milhares de pessoas em todo o mundo. Por outro lado, devido as magnitudes epidemiológicas e as consequências da obesidade, há a necessidade de buscar tratamentos farmacológicos eficazes. O sistema eCB atua na regulação de processos fisiológicos como ingesta alimentar e termogênese. Fármacos com alvo nos receptores CB1 foram desenvolvidos, porém apesar de efeitos metabólicos promissores, foram retirados do mercado após efeitos psicológicos adversos. Por outro lado, a ativação do receptor CB2 não foi associado a esses efeitos adversos como na ativação do receptor CB1.

O óleo essencial de *Cordia verbenacea* é composto de terpenos que possuem afinidade pelo receptor CB2, sem afinidade pelo receptor CB1. Por essa característica, esse óleo parece ser um candidato em potencial como alvo terapêutico para condições que envolvam o sistema eCB, como desregulações no consumo alimentar e balanço energético.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento crônico com óleo essencial de *Cordia verbenacea* sobre o consumo alimentar e parâmetros metabólicos e comportamentais em camundongos expostos à dieta hiperlipídica e frutose (HFFD).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar a afinidade dos compostos presentes no óleo essencial de *Cordia verbenacea* por receptores específicos, e os possíveis efeitos adversos desses compostos, por meio de análises de bioinformática;

b) Avaliar os efeitos da administração de óleo essencial de *Cordia verbenacea* sobre as alterações metabólicas e comportamentais induzidas por consumo crônico de HFFD:

- Acompanhar e mensurar a massa corporal e consumo alimentar durante todo o protocolo;

- Avaliar locomoção espontânea; comportamento de autocuidado e anedonia; comportamento frente a um estresse agudo inescapável e memória de trabalho;

- Avaliar a tolerância a glicose dos animais;

- Avaliar colesterol, triglicerídeos e enzimas hepáticas TGO e TGP;

- Mensurar a massa de tecido adiposo.

c) Investigar se o óleo essencial de *Cordia Verbenacea* apresenta propriedades reforçadoras *per se* na tarefa de preferência/aversão condicionada ao lugar em camundongos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados um total de 60 camundongos C57BL/6 machos e fêmeas com idade entre três ou quatro meses no início dos experimentos, provenientes da colônia do próprio laboratório. Em consonância com as recomendações do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica do CONSEA (Resolução Normativa 13, 2013), os animais foram alojados em gaiolas retangulares, contendo entre 2 e 3 animais por gaiola, em temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), em ciclo claro escuro (12/12horas), com comida e água *ad libitum*. Para realização do estudo, ele foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para o uso de Animais (CEUA/UFSC) sob o número 6555200323, em concordância com a Lei Federal 11.794 de 2008.

4.2 ÓLEO ESSENCIAL DE CORDIA VERBENACEA

O óleo essencial de Cordia Verbenácea utilizado nos experimentos foi adquirido em frascos contendo 5ml do produto, da empresa Herbia, localizada em Joinville no Estado de Santa Catarina, que comercializa óleos essenciais e possui as especificações técnicas do produto, incluindo cromatografia em percentual dos terpenos presentes no óleo. A descrição dos terpenos presentes no óleo essencial de Cordia Verbenacea está apresentada no quadro 1.

Quadro 1. Descrição dos terpenos presentes no óleo essencial de *Cordia verbenacea*

Substância	Título % no óleo	Peso molecular	Densidade	Concentração comum no óleo (produto)	Molaridade Mol/L
Cariofileno	8,4	204.357 g/mol	0.9052 g/cm ³ (17 °C)	76,037 g/L	0,3721mol/L
Alfa-pineno	11,9	136.23 g/mol	0.8592 g/cm ³ (20°C)	102,25 g/L	0,7505 mol/L
Alfa-copaeno	4,9	204.35 g/mol	0.939g/cm ³	46,011 g/L	0,2252 mol/L
Trans-alfa- bergamoteno	3,1	204.35100 g/mol	0.881g/cm ³	27,311 g/L	0,1336 mol/L

Alfa-humuleno	1,3	204.35 g/mol	0.889 g/mL a 20 °C	11,557 g/L	0,0566 mol/L
Ar-curcumeno	22,7	202.33 g/mol	0.873g/cm3:	198,171 g/L	0,9794 mol/L
Alfa-zingibereno	8,5	204.35 g/mol	0.854g/cm3.	72,59 g/L	0,3552 mol/L
Beta-bisaboleno	4,9	204.35100 g/mol	0.854g/cm3	41,846 g/L	0,2048 mol/L
Beta- sesquifelandreno	18,7	204.35100 g/mol	0.85g/cm3	158,95 g/L	0,7778 mol/L

Fonte: A autora após buscas em: Pubchen; Swiss target prediction; cromatografia do óleo fornecida no site da empresa comercializadora.

4.3 DIETAS E FRUTOSE

Para os protocolos, foram utilizadas duas dietas: 1) Ração padrão para roedores (STD, do inglês *Standard*) [constituída por proteínas (22%), carboidratos (46,5%) e lipídeos (4,0%), Nuvilab CR1, Nuvital; Quimtia Nutrientes, Colombo, PR, Brasil] associada com água filtrada; e 2) Ração Hiperlipídica (HFD) [dieta AIN 93, *high-fat* purificada, constituída por proteínas (12%), carboidratos (27%) e lipídeos (61%), sendo a principal fonte lipídica proveniente de banha, Pragsoluções, Jaú, São Paulo, Brasil], associada à solução de Frutose (NEON Comercial, Suzano, SP, Brasil) na concentração de 10% na água filtrada dos animais.

O valor calórico das dietas e solução foi calculado com base nas informações nutricionais de cada dieta seguindo os valores: 4kcal/g de proteína; 4kcal/g de carboidrato e 9kcal/g de gordura. Dessa forma, obteve-se 3,1 kcal/g de dieta padrão para roedores; 7,05kcal/g de HFD; 0,4kcal/ml de solução de frutose.

Para a preparação da solução de frutose 10% foi realizada a pesagem de 25 gramas de frutose diluídas em água filtrada suficiente para completar 250 ml em balão volumétrico, repetindo o processo quantas vezes fosse necessário para atingir o volume final necessário.

4.4 DESENHOS EXPERIMENTAIS

4.4.1 Avaliação da bioinformática dos compostos presentes do óleo essencial de *Cordia verbenacea*, como a afinidade dos compostos por receptores e os efeitos adversos desses compostos

A avaliação da bioinformática do óleo essencial de *Cordia verbenacea* foi realizada conforme a cromatografia dos compostos do óleo fornecidos pelo fabricante e de dados obtidos na base de dados PubChem (Kim *et al.*, 2016). A partir desse dado, os compostos foram avaliados com seus principais alvos para a espécie *Mus musculus* através do website SwissTargetPrediction (Daina; Michielin; Zoete, 2019). Os compostos que foram encontrados na base de dados e que tinham alvos descritos por ela, foram descritos em tabela com o nome dos seus principais alvos e com os valores da probabilidade de ligação.

Já outros dados sobre propriedades farmacocinéticas e de toxicidade dos compostos foram avaliados a partir de outra ferramenta online ADMETlab, que permite verificar os dados de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade de diferentes moléculas (Xiong *et al.*, 2021). Foram analisados os dados sobre distribuição, avaliando a probabilidade de cada terpeno presente no óleo atravessar a Barreira Hematoencefálica (BHE). Também foi analisado os dados sobre absorção desses compostos, através da biodisponibilidade da via oral em humanos, avaliando a probabilidade de uma biodisponibilidade <20% ou <30%.

Por fim, verificou-se os compostos quanto à toxicidade. Nessa ferramenta, é possível verificar o risco de toxicidade para alguns parâmetros como: hepatotoxicidade humana, toxicidade aguda oral em roedores (baixa toxicidade > 500 mg/kg; alta toxicidade < 500 mg/kg), risco carcinogênico, sensibilização da pele, irritação e corrosão ocular, toxicidade respiratória e o máximo recomendado de dose diária que promove a estimativa de um limite de dose tóxica de cada composto (nesse caso remete a probabilidade de uma dose $\leq 0,011$ mmol/kg de massa corporal/dia ser tóxica). Para isso, os dados são apresentados na ferramenta por valores de probabilidade e cores (verde, amarelo e vermelho). Os dados verdes representam risco de até 30%, dados amarelos de 30-70% e vermelhos acima de 70%. Foram

computados os riscos de toxicidade classificados como amarelo e vermelhos, bem como seus valores de probabilidade.

Os dados encontrados em cada uma das ferramentas foram computados e descritos em tabelas.

4.4.2 Avaliação dos efeitos da administração de óleo essencial de *Cordia verbenacea* sobre as alterações metabólicas e comportamentais induzidas pelo consumo crônico de dieta hiperlipídica e frutose

Nessa parte do estudo, 40 camundongos machos e fêmeas foram divididos em 4 grupos (N=10, sendo 5 machos e 5 fêmeas). Dois desses grupos receberam dieta padrão e os outros dois receberam HFD associada com frutose 10% (HFFD). Após 30 dias de oferta das respectivas dietas, os animais continuaram recebendo suas respectivas dietas, porém um grupo com dieta padrão e outro com HFFD receberam tratamento diário (as 8 horas da manhã) de forma oral através de gavagem com óleo essencial de *Cordia verbenacea* diluído em salina na proporção 0,0657ml/kg. Os outros dois grupos foram os controles e receberam um veículo (salina) no lugar do tratamento, por mesma via e volume que os grupos experimentais.

Um estudo piloto foi realizado para definir a dose de tratamento, utilizando como base na dose de 50 mg/kg de cariofileno. Essa dosagem foi estudada anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, mostrando resultados na diminuição da saliência motivacional para alimento palatável (Barbosa *et al.*, 2023). Para tal, 50mg/kg de cariofileno correspondem a 0,657ml/kg de óleo essencial de *Cordia verbenacea* de acordo com as quantificações de compostos apresentados pelo fabricante. Todavia, essa dose mostrou efeitos depressores notórios nos animais, sendo observados poucas horas após a primeira administração, como por exemplo, pela diminuição da locomoção espontânea na própria gaiola moradia. Ainda, um dia após a primeira administração três camundongos machos vieram a óbito. Isso pode ser justificado pela presença de outros compostos nesse óleo. Assim, uma dose de 0,0657 ml/kg de óleo, que corresponde a 5 mg/kg de cariofileno, foi utilizada nesse estudo. Além disso, considerando que o óleo de *Cordia verbenacea* também possui

outros compostos com atividade no receptor CB2, uma dose menor do óleo pode ser utilizada a fim de avaliar o sinergismo (efeito *entourage*) dos compostos.

Ao final desses 60 dias de oferta de dieta (30 dias sem tratamento + 30 dias com tratamento), todos os animais foram submetidos a testes comportamentais (campo aberto, borrifagem de sacarose, labirinto em T, suspensão pela cauda), sendo realizado um por dia, do menos aversivo para o mais aversivo, e o Teste de Tolerância à Glicose (GTT), realizado no dia posterior ao último teste comportamental, obedecendo um jejum calórico de 6 horas, iniciado no período claro (7h -13h), com água *ad libitum*. Além disso, ao término desses testes, os animais ficaram novamente em jejum de 6 horas, para serem eutanasiados para a coleta de material biológico: sangue para avaliação de triacilgliceróis, colesterol total e enzimas hepáticas TGO e TGP, além do tecido adiposo visceral que foi pesado. Ambas as dietas e tratamentos foram mantidas ao longo da aplicação dos testes até a eutanásia dos animais. O desenho experimental dessa fase da pesquisa está apresentado na figura 1.

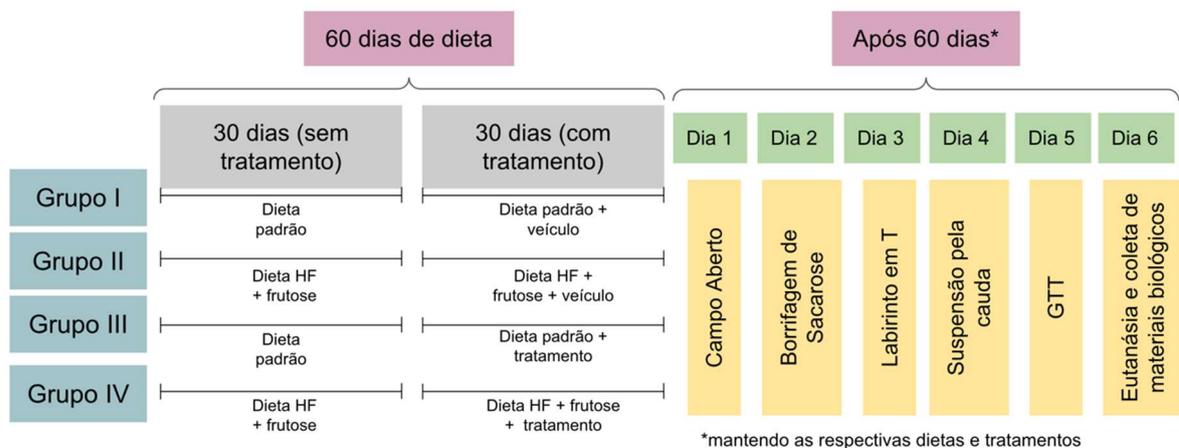


Figura 1. Desenho experimental da segunda etapa da pesquisa

4.4.3 Investigação se o óleo essencial de *Cordia Verbenacea* apresenta propriedades reforçadoras *per se* na tarefa de preferência/aversão condicionada ao lugar em camundongos

Para investigar se o óleo essencial de *Cordia verbenacea* apresenta propriedades reforçadoras *per se*, foram utilizados 20 animais fêmeas divididos em dois grupos (n= 10). Somente camundongos fêmeas foram utilizados nesse protocolo,

pois os animais machos não se mostraram tão responsivos a esse protocolo empregado anteriormente em nosso laboratório. Um dos grupos recebeu salina (grupo controle) e o outro foi condicionado ao longo do teste com o óleo essencial de *Cordia verbenacea* (Grupo experimental). Para esse objetivo os animais executaram a tarefa de preferência/aversão condicionada ao lugar (PCL) que será descrito no item 4.6.5.

4.5 ACOMPANHAMENTO DA MASSA CORPORAL E CONSUMO CALÓRICO

Com o objetivo de avaliar a massa corporal dos animais, eles foram pesados semanalmente, iniciando no primeiro dia de cada protocolo, seguindo o mesmo dia e horário em cada semana. Para isso, foi avaliado a massa corporal com o auxílio de uma balança digital três vezes em cada momento, a fim de verificar o valor mais frequente. Os dados foram anotados e ao final o valor de Delta (massa corporal final - massa corporal inicial) foi calculado. Os dados foram expressos em gramas.

Para o cálculo do consumo calórico dos animais, também foi mensurado semanalmente a quantidade de dieta e solução de frutose fornecida em cada momento, e a que era encontrada, de forma a obter o montante consumido na semana (Dieta e solução fornecida – dieta/solução encontrada= consumo de dieta/solução). Com o valor bruto em gramas, ele foi convertido em calorias seguindo a concentração calórica de cada tipo de dieta ofertada. Quando a dieta foi associada com solução de frutose, os valores calóricos de dieta e frutose foram somados. Ao final, foi calculado o valor *per capita* estimado do consumo calórico semanal, dividindo o valor calórico semanal consumido de cada gaiola pelo número de animais alojados na mesma.

4.6 EXPERIMENTOS COMPORTAMENTAIS

4.6.1 Campo Aberto

Este paradigma comportamental é um modelo utilizado para avaliar possíveis efeitos na locomoção e padrão exploratório dos animais. Cada camundongo foi colocado no início do experimento no centro de uma caixa nas proporções 50x50x40cm, ficando livre por 5 minutos para explorar o ambiente. Os roedores quando em ambientes novos tendem a explorar o espaço, mesmo com o estresse provocado pelo novo ambiente. Além do mais, uma menor exploração ao centro do

aparato tem sido atribuída a um comportamento do tipo ansioso, o que tem como base o uso de fármacos ansiolíticos e seus efeitos nesse teste (Prut; Belzung, 2003). Assim, para avaliar a atividade exploratória desses animais foi contabilizado o número total de cruzamentos periféricos e centrais, além do tempo no centro da caixa (Prut; Belzung, 2003). Um cruzamento foi contabilizado quando o animal cruzava de um quadrante para o outro com as quatro patas. Os cruzamentos totais foram expressos em valores brutos. Já os cruzamentos centrais e os cruzamentos periféricos foram expressos em percentual de acordo com o número de cruzamentos totais de cada animal. O tempo no centro foi expresso em percentual do tempo total do teste que era 5 minutos ou 300 segundos.

4.6.2 Borrifagem de Sacarose

O teste de borrifagem de sacarose, também conhecido por *Splash Test*, foi utilizado para avaliar comportamento de autocuidado e anedonia, seguindo o protocolo de Isingrini e colaboradores com modificações (Isingrini *et al.*, 2010). Os animais foram isolados 1 hora antes do início do teste em uma caixa de acrílico (30x30x20cm). Após 1 hora, foi borrifado 1ml de solução viscosa de 10% de sacarose no dorso do animal. Essa solução induz autolimpeza no animal, assim após a aplicação, foi realizado durante 5 minutos o registro do tempo de limpeza (*grooming*). Os parâmetros analisados foram: tempo de autolimpeza e tempo até o primeiro comportamento de autolimpeza. Ambos os dados foram expressos em segundos.

4.6.3 Labirinto em T

O protocolo aqui empregado do labirinto em T avalia a memória de trabalho dos animais através do monitoramento do comportamento de alternância espontânea durante uma sessão única no labirinto de T (Hughes, 2004). Para esse teste, foi utilizado um aparato de acrílico em formato de labirinto em T. No início do teste, o animal é colocado no início de um braço e pode se mover livremente durante 5 minutos por todo o aparato. Foi anotado a sequência de entrada do animal, atribuindo uma letra (A, B ou C) para cada braço. Para isso, o animal precisava entrar no braço com todas as patas. Ao final foram contabilizadas as trincas completas de alternâncias (e. g. ABC; CBA, BAC etc.) e calculado o percentual de alternância seguindo a fórmula: $[\text{Alternâncias totais} / (\text{número de entrada nos braços} - 2)] \times 100$.

4.6.4 Suspensão pela Cauda

Este teste avalia a estratégia de enfrentamento a um estresse agudo inevitável (Commons *et al.*, 2017). E tem como base a hipótese de que um animal, ao ser submetido a uma situação aversiva e inescapável, apresenta dois tipos de comportamentos alternados: a agitação característica da movimentação para fuga da situação aversiva e imobilidade. Este padrão temporal de movimentação também pode ser chamado comportamento de busca, caracterizado por intensa atividade motora e gasto de energia e comportamento de espera com imobilidade e menor gasto de energia (Steru *et al.*, 1985). Este teste comportamental é amplamente utilizado para avaliação de fármacos antidepressivos, no qual seu potencial foi relatado por diminuir o tempo de imobilidade e aumentar a tentativa de escapar da situação aversiva (Cryan; Holmes, 2005).

Para realização do teste, os animais foram suspensos por 30cm longe de qualquer parede/objeto por meio de fita adesiva presa aproximadamente 1 cm da ponta da cauda ao suporte em superfície plana (Steru *et al.*, 1985). A duração do teste foi de 5 minutos e foi analisado o tempo para a primeira imobilidade (latência) e o tempo sem qualquer movimento (imobilidade). Ambos os dados foram expressos em segundos.

4.6.5 Preferência Condicionada ao Lugar (PCL)

Este teste avalia a capacidade do animal em associar o efeito reforçador da substância com o ambiente (Sun *et al.*, 2018). Os experimentos da PCL foram realizados em uma caixa retangular de madeira constituída por dois compartimentos A e B (20 x 30 x 40 cm cada) separados por uma porta de guilhotina (10 x 10 cm) que dá acesso ao outro compartimento. Os compartimentos A e B possuem diferentes pistas visuais e táteis, podendo conter pistas olfativas (aroma de café ou baunilha). Os experimentos de PCL foram conduzidos em uma sala de baixa iluminação ($\cong 20$ lux) e o comportamento de cada animal foi registrado através de uma câmera de vídeo posicionada acima da caixa e monitorada em uma sala adjacente. Ao final de cada

sessão, os animais retornaram para seus respectivos ambientes e os aparatos foram limpos com papel toalha embebidos com solução de etanol 5%.

O protocolo de aquisição da PCL consistiu em pré-condicionamento (dia 1), condicionamento (dias 2-5) e teste pós-condicionamento (dia 6) (Figura 2). No pré-condicionamento, cada animal foi colocado em um dos compartimentos com as portas das guilhotinas abertas e livre acesso aos dois compartimentos, durante 15 minutos. No dia seguinte, cada animal foi submetido ao condicionamento, conduzido de maneira enviesada. Assim, os animais foram sempre condicionados com a droga (óleo essencial de *Cordia verbenacea*) no compartimento em que eles permaneceram menos tempo no dia anterior.

Os animais foram divididos em 2 grupos (n = 10 / grupo): Um grupo recebeu o óleo na dose 0,657ml/kg e outro solução veículo, ambos de forma subcutânea. A dose do óleo foi baseada na quantidade equivalente de 50mg de cariofileno, composto já testado anteriormente no PCL e que não apresentou propriedades reforçadoras *per se* (Barbosa *et al.*, 2023).

Em cada sessão de condicionamento, o animal recebeu o tratamento subcutâneo com óleo essencial de *Cordia verbenacea* ou veículo e foi imediatamente confinado no compartimento de condicionamento por 45 min. Na sessão seguinte, o animal recebeu o tratamento com solução veículo e foi confinado no compartimento oposto. O condicionamento foi conduzido através de duas sessões diárias com intervalo de 6h entre elas totalizando 8 sessões de treinamento (4 com a droga alternadas por 4 com veículo, exceto para grupo veículo que recebeu apenas solução veículo todas as sessões do condicionamento). A ordem das injeções foi contrabalanceada entre os grupos e entre os dias de condicionamento.

Um dia (24 horas) após a última sessão de condicionamento, os animais foram colocados no aparato e foi avaliado se os animais desenvolveram a memória associativa induzida pelo óleo, através da expressão ou não de preferência / aversão condicionada ao lugar. Ambos os testes de pré e pós-condicionamento foram conduzidos na ausência de qualquer tratamento. Cada animal foi colocado em um dos compartimentos e teve livre acesso ao aparato, durante 15 min, onde foi registrado o tempo gasto pelo animal em cada compartimento. O escore de preferência/aversão

induzido pela droga foi representado como tempo gasto no compartimento parado à droga – tempo gasto no compartimento pareado com veículo).

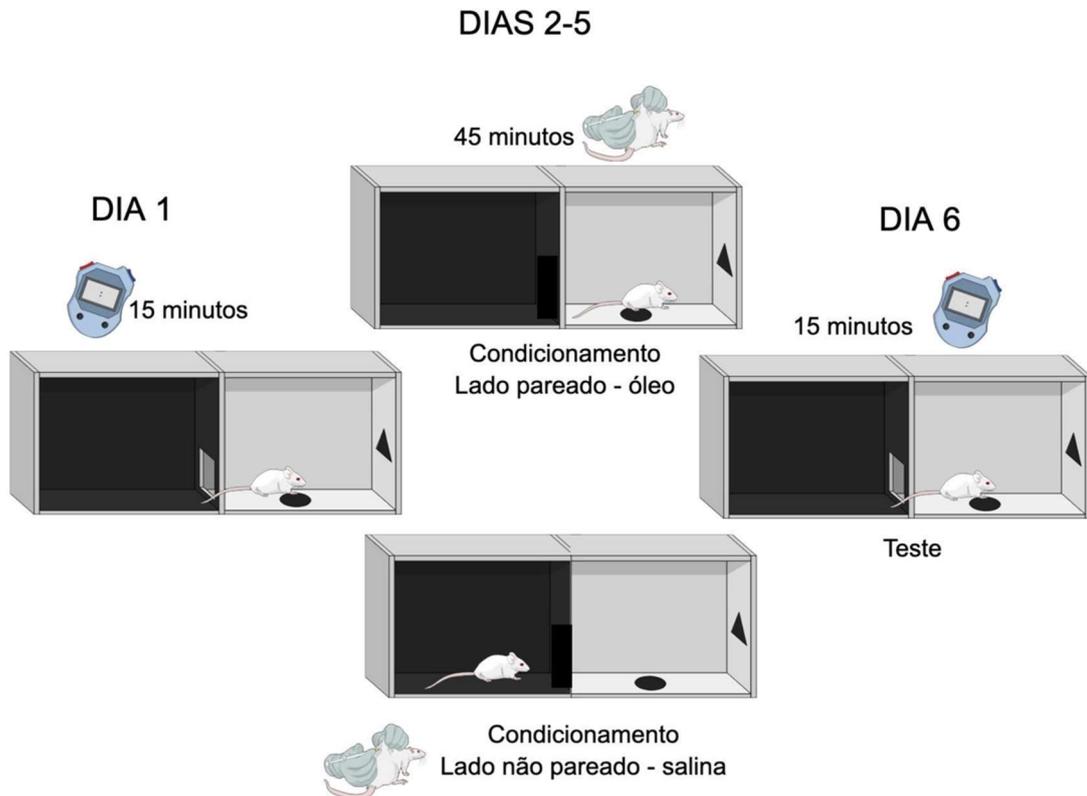


Figura 2. Representação esquemática do Teste de Preferência Condicionada ao Lugar
Fonte: Produzida pela autora com imagens do Mind the Graph ®.

4.7 ANÁLISE BIOQUÍMICA E PESAGEM DO TECIDO ADIPOSEO VISCERAL

O GTT foi realizado após 6 horas de jejum calórico, iniciado no início do período claro (7 - 13 horas). A glicemia em jejum foi medida por meio da coleta de uma gota de sangue na ponta da cauda dos animais (tempo 0) sendo aferida com glicosímetro. Após essa coleta, foi realizada a administração intraperitoneal de D-(+) -glicose na concentração de 2g/kg de massa corporal em cada animal. A concentração de glicose no sangue foi avaliada nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos após a aplicação. Os resultados foram expressos em mg/dL. Com os dados, foi construída a curva glicêmica dos animais e posteriormente calculado a Área Sob a Curva (AUC) para cada grupo.

No dia seguinte, os camundongos foram novamente privados de alimentos por seis horas e, posteriormente, foi realizada coleta de sangue por punção cardíaca. A amostra foi centrifugada durante 10 minutos por 5000rpm para separação do plasma. O plasma foi pipetado e armazenado em freezer com temperatura de -80°C até o momento da análise. Para dosagem do colesterol total, triglicerídeos e as enzimas hepáticas TGO e TGP as amostras foram previamente descongeladas para que pudessem ser pipetadas em placa. Para cada exame, kits específicos de reagentes da fabricante Bioclin foram utilizados conforme as instruções de uso. As amostras foram analisadas em duplicatas e ao final foi realizada a leitura da absorbância dessas amostras, para o cálculo de cada resultado. Os dados do colesterol total e triglicerídeos foram expressos em mg/dL e TGO e TGP foram expressos em U/ml.

O tecido adiposo visceral foi retirado durante a eutanásia dos animais e foi alojado em papéis cortados de forma padrão para posterior pesagem em balança analítica. Os dados foram expressos em % de gordura visceral em relação à massa corporal total dos animais ao final do experimento.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram testados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Foi verificado a presença de outliers pelo teste de Grubbs. As comparações estatísticas foram realizadas utilizando a análise de variância (ANOVA) de duas vias, com medidas repetidas quando necessário. Quando significativa a ANOVA, múltiplas comparações *post hoc* foram feitas pelo teste de Newman Keul. Os fatores considerados na ANOVA de duas vias foram os fatores dieta e tratamento. Embora animais machos e fêmeas foram utilizados nos experimentos, eles foram agrupados nos mesmos grupos para as análises estatísticas. Esse agrupamento foi em virtude no N amostral pequeno em caso de separação por sexo.

Para comparação dos deltas de massa corporal antes e durante os tratamentos e peso inicial e final no protocolo de PCL foi utilizado o teste *t student* para dados pareados, exceto para dados que não passaram no teste de normalidade. Nesse caso, o teste Wilcoxon para dados não paramétricos foi utilizado. Para

comparação do índice de PCL foi utilizado o teste *t student* não pareado. Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. O nível de significância aceito para os testes foi de $p < 0,05$. Os testes de normalidade, outlier, teste *t student*, Wilcoxon e construção dos gráficos foram realizados utilizando o programa Prism Graph-Pad (StatSoft Inc., San Diego, CA, EUA). As comparações entre os grupos por ANOVA e testes *post hoc* foram realizadas utilizando o programa Statistica® (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA BIOINFORMÁTICA DOS COMPOSTOS PRESENTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CORDIA VERBENACEA*, COMO A AFINIDADE DOS COMPOSTOS POR RECEPTORES E OS EFEITOS ADVERSOS DESSES COMPOSTOS

No quadro 2, estão descritos alguns compostos presentes no óleo de *Cordia verbenacea* e seus principais alvos, bem como a probabilidade de ligação de acordo com os dados encontrados no SwissTargetPrediction. Os demais compostos não tinham alvos descritos ou não foram encontrados na base de dados.

Quadro 2. Compostos do óleo de *Cordia verbenacea* e seus principais alvos

Composto	Principais alvos	Probabilidade
Cariofileno	Receptor Canabinoide 2 (CB2)	71,9%
	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa (PPARs)	71,9%
	Amida hidrolase de ácido graxo (FAAH)	4,3%
Alfa-copaeno	Receptor Canabinoide 2 (CB2)	10,9%
	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa (PPARs)	10,9%
	Transportador de serotonina	4,3%
	Transportador de noraepinefrina	4,3%
	Receptor muscarínico de acetilcolina M2 (CHRM2)	4,3%
	Acetilcolinesterase	4,3%
	Amida hidrolase de ácido graxo (FAAH)	4,3%
Alfa-pineno	Receptor Canabinoide 2 (CB2)	6,5%

	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa (PPARs)	6,5%
	Acetilcolinesterase	4,4%
	Amida hidrolase de ácido graxo (FAAH)	3,3%
Alfa-humuleno	Receptor Canabinoide 2 (CB2)	4,3%
	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa (PPARs)	4,3%
	Monoamina oxidase B (MAOB)	4,3%

Fonte: A autora após buscas em SwissTarget Prediction.

Quando aos dados de probabilidade de atravessar a BHE, biodisponibilidade oral e toxicidade de cada composto presente no óleo estão descritos respectivamente nos quadros 3, 4 e 5.

Quadro 3. Probabilidade de atravessar a BHE dos compostos do óleo de *Cordia verbenacea*

Composto	Probabilidade de atravessar a BHE
Alfa-copaeno	66,4%
Alfa-humuleno	11,1%
Alfa-zingibereno	41,5%
Alfa-pineno	89,6%
Ar-curcumeno	24%
Beta-bisaboleno	54,4%
Beta-sesquifelandreno	47,8%
Cariofileno	83,2%
Trans-alfa-bergamoteno	52,2%

Fonte: A autora após pesquisas em ADMETlab 2.0.

Quadro 4. Probabilidade da biodisponibilidade de absorção oral dos compostos da *Cordia verbenacea*

Composto	Absorção	
	Biodisponibilidade <20%	Biodisponibilidade <30%
Alfa-copaeno	2,7%	57,8%
Alfa-humuleno	83,5%	96,9%
Alfa-zingibereno	23,2%	25,5%
Alfa-pineno	10,2%	10,2%
Ar-curcumeno	66,6%	83,1%
Beta-bisaboleno	91,5%	95,7%
Beta-sesquifelandreno	0,7%	1,7%
Cariofileno	88,5%	15,6%
Trans-alfa-bergamoteno	86,9%	91,3%

Fonte: A autora após pesquisas em ADMETlab 2.0.

Quadro 5. Risco de toxicidade dos compostos do óleo de *Cordia verbenacea*

Composto	Classificação de risco de toxicidade			
	Amarelo	Probabilidade	Vermelho	Probabilidade
Cariofileno	-Dose máxima diária recomendada (FDAMDD)	63,4%	-Irritação ocular	76,9%
	-Carcinogênico	35,7%		
Alfa-copaeno	-Tóxico Agudo Oral em ratos	45,1%	NA	NA
		57,2%		

	-Dose máxima diária recomendada (FDAMDD) -Toxicidade respiratória	54,5%		
Alfa-humuleno	NA	NA	-Sensibilização da pele - Carcinogênico -Corrosão ocular -Irritação ocular	95% 93,8% 91,3% 97,9%
Alfa-zingibereno	-Dose máxima diária recomendada (FDAMDD) -Toxicidade respiratória	54,8% 45%	-Hepatotoxicidade humana -Sensibilização da pele -Irritação ocular	94% 96,3% 84,5%
Alfa-pineno	-Dose máxima diária recomendada (FDAMDD)	42%	-Corrosão ocular -Irritação ocular	95,5% 98,5% 82,5%

			-Toxicidade respiratória	
Ar-curcumeno	Hepatotoxicidade humana -Sensibilização da pele -Corrosão ocular	51,5% 58,9% 49%	-Irritação ocular	98,5%
Beta-bisaboleno	-Sensibilização da pele -Carcinogênico	40,2% 64%	-Hepatotoxicidade humana -Irritação ocular	87,5% 89,1%
Beta-sesquifelandreno	-Carcinogênico	65,9%	-Hepatotoxicidade humana -Dose máxima diária recomendada (FDAMDD) -Sensibilização da pele -Irritação ocular -Toxicidade respiratória	76,4% 71,9% 95,4% 70,6% 90,7%
Trans-alfa-bergamoteno	-Sensibilização da pele	56,5%	-Hepatotoxicidade humana	73,2%

	-Corrosão ocular	50,2%	-Irritação ocular	94,9%
--	------------------	-------	-------------------	-------

Fonte: A autora após pesquisas em ADMETlab 2.0.

5.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE CORDIA VERBENACEA SOBRE AS ALTERAÇÕES METABÓLICAS E COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELO CONSUMO CRÔNICO DE DIETA HIPERLIPÍDICA E FRUTOSE (HFFD)

5.2.1 Consumo Calórico

Na figura 3 está representado a média do consumo calórico ao longo das 9 semanas de experimento, onde entre a quarta e quinta semana, iniciou-se o tratamento dos animais. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo da dieta ($F_{(1, 33)} = 69,857$, $p = ,00000$), da repetição ($F_{(8, 264)} = 114,40$, $p = 0,0000$), da interação entre repetição e dieta ($F_{(8, 264)} = 31,121$, $p = 0,0000$) e da interação entre repetição, tratamento e dieta ($F_{(8, 264)} = 3,1342$, $p = ,00210$). No *post hoc* foram detectadas as diferenças entre os grupos que receberam HFFD e dieta padrão, obtendo um consumo calórico maior para os grupos que receberam HFFD ao longo de todo o experimento. Não foram detectadas diferenças em relação ao tratamento com o óleo.

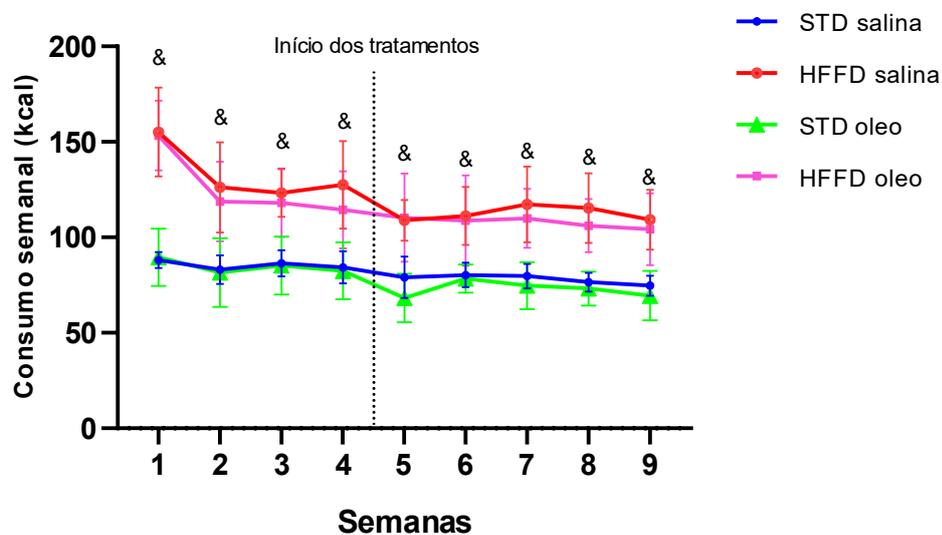


Figura 3. Média do consumo calórico durante as 9 semanas de experimento

Início dos tratamentos entre a quarta e quinta semana. Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão da média. STD salina (n=10), HFFD salina (n=10), STD óleo (n=10), HFFD óleo (n=7). & indica efeito do fator dieta e repetição por ANOVA de duas vias ($p \leq 0,05$).

5.2.2 Variação da massa corporal e Gordura Visceral

Em relação a variação da massa corporal dos animais ao longo do experimento, não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos na ANOVA de duas vias (Figura 4). Nesse sentido, foram comparados os deltas da massa corporal dos grupos no período sem tratamento e no período com tratamento (Figura 5). Foram encontradas diferenças significativas através do teste T pareado no antes e durante os tratamentos entre o grupo que recebeu dieta padrão associado com salina ($p=0,031$). Já entre o grupo que recebeu dieta padrão associado com óleo também houve diferença significativa entre os períodos sem tratamento e com tratamento ($p=0,0078$). Entretanto, para esse grupo o teste utilizado foi para dados não paramétricos (Wilcoxon), pois eles não passaram pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Por fim, os animais que receberam HFFD associado com salina ou com óleo não tiveram diferenças significativas identificadas pelo teste t pareado entre os períodos antes e durante os tratamentos.

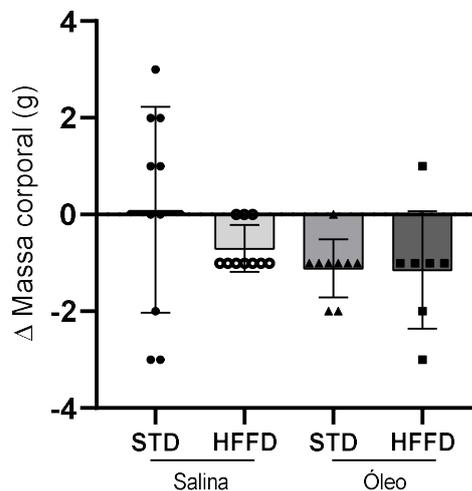


Figura 4. Delta da massa corporal (peso final - inicial) após 9 semanas. Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão da média. STD salina (n=10), HFFD salina (n=10), STD óleo (n=9), HFFD óleo (n=7).

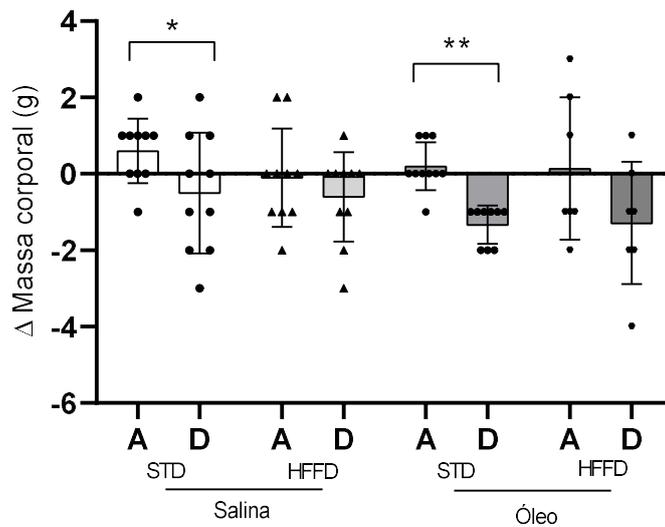


Figura 5. Delta da massa corporal antes e após tratamento

A representa delta da massa corporal após 30 dias iniciais (sem tratamento); e D representa delta da massa corporal após início dos tratamentos (4 à 9ª semana). Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão da média. STD salina (n=10), HFFD salina (n=10), STD óleo (n=9), HFFD óleo (n=7). * = $p < 0,5$ e ** = $p < 0,005$

Quando avaliado os animais quanto a quantidade de gordura visceral em relação ao seu peso corporal, a ANOVA de duas vias identificou uma significância em relação ao fator dieta, mostrando um aumento na gordura visceral nos animais que receberam dieta HFFD ($F(1, 32)=21,825, p=,00005$).

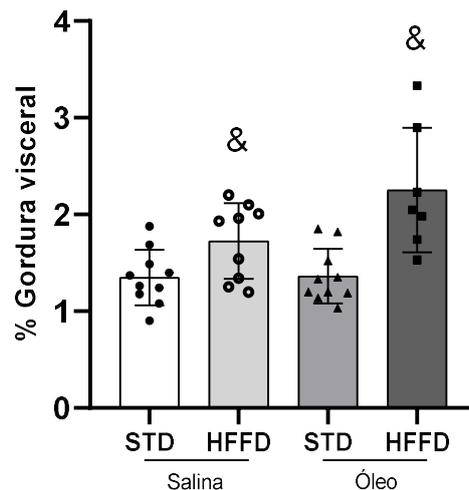


Figura 6. Percentual do peso da gordura visceral em relação a massa corporal total de camundongos. Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão da média. & indica efeito do fator dieta por ANOVA de duas vias ($p \leq 0,05$); STD salina (n=10), HFFD salina (n=9), STD óleo (n=10), HFFD óleo (n=7).

5.2.3 Níveis plasmáticos de colesterol, triglicerídeos, TGO e TGP

A figura 7 mostra os resultados das análises plasmáticas realizadas. Ao verificarmos os níveis plasmáticos de colesterol (figura 7A), pela ANOVA de duas vias a dieta teve um efeito significativo aumentando os níveis de colesterol nos animais que receberam HFFD ($F_{(1, 33)}=10,448$, $p=,00278$). Já em relação aos triglicerídeos (Figura 7B), a dieta também teve um efeito significativo, porém o consumo de HFFD levou à uma diminuição dos níveis plasmáticos de triglicerídeos ($F_{(1, 33)}=5,5448$, $p=,02464$). Para TGO, nenhuma significância foi detectada pelo teste (Figura 7C). Por fim, a dieta também teve um efeito significativo nos níveis plasmáticos de TGP ($F_{(1, 32)}=8,2048$, $p=,00732$), diminuindo seus níveis nos animais que receberam HFFD (Figura 7D).

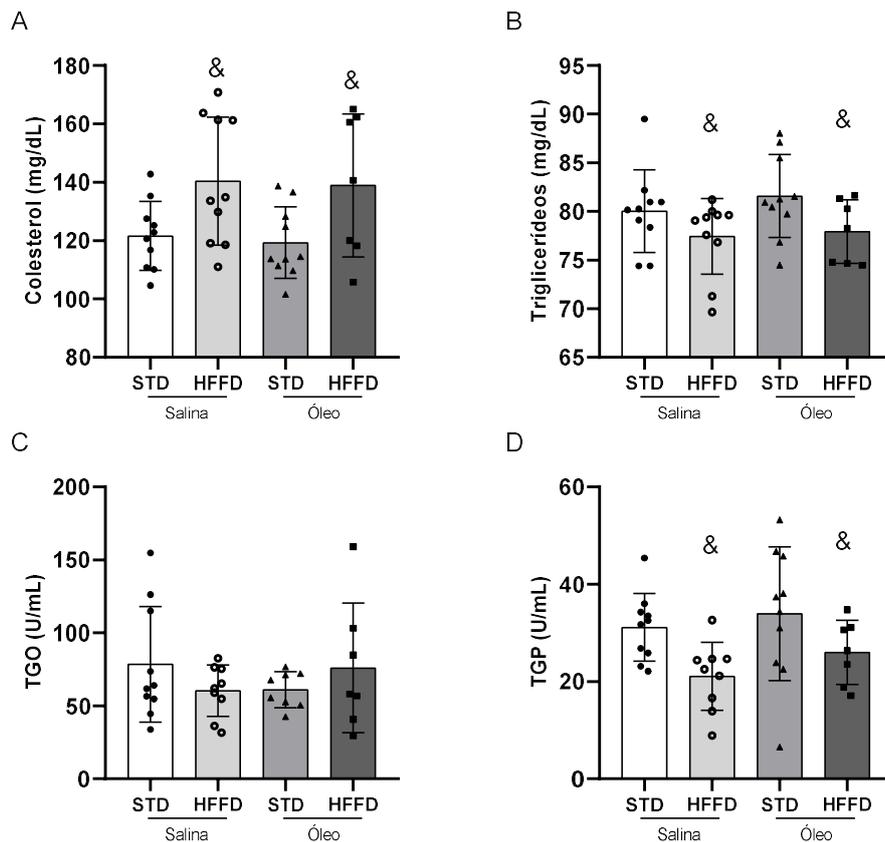


Figura 7. Análise plasmática ao final dos experimentos

A) Níveis de colesterol- mg/dL. B) Níveis de triglicerídeo- mg/dL. C) Níveis de TGO- U/mL. D) Níveis de TGP- U/mL. Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão da média. & indica efeito do fator dieta por ANOVA de duas vias ($p \leq 0,05$); STD salina (n=10), HFFD salina (n=10, exceto TGP e TGO=9), STD óleo (n=10 exceto TGO=9), HFFD óleo (n=7).

5.2.4 Teste de Tolerância à Glicose

A figura 8 mostra os dados do GTT, sendo o gráfico A representativo da curva glicêmica dos animais ao longo do teste, o B a área sob a curva (AUC) do GTT e o C a glicemia basal dos animais. Para a curva glicêmica, a ANOVA de duas vias detectou um efeito significativo dos fatores tratamento ($F_{(1, 33)}=8,2182$, $p=,00717$), da repetição ($F_{(4, 142)}=482,41$, $p=0,0000$) e da interação entre repetição e dieta ($F_{(4, 142)}=4,0149$, $p=,00418$). As comparações *post hoc* revelaram uma tendência a níveis de glicose mais altos nos animais que receberam HFFD associada com salina em comparação aos animais com dieta padrão e salina aos 15 e 60 minutos do teste ($p= 0,054$ e $p=0,055$ respectivamente). Além do mais, aos 15 minutos de teste, o teste revelou níveis de glicose mais altos nos animais com HFFD e salina em comparação com os animais que receberam dieta padrão e o tratamento com o óleo e animais que receberam HFFD e o tratamento com o óleo ($p=0,034$ e $p=0,031$ respectivamente). Aos 30 minutos de teste, foram detectadas novamente glicemias maiores entre o grupo que recebeu HFFD com salina em comparação ao grupo que recebeu dieta padrão associada com o tratamento do óleo ($p=0,012$). Também aos 30 minutos de teste, foi detectado níveis de glicose menores no grupo dieta padrão associado com o óleo em comparação ao grupo HFFD também associado ao óleo ($p=0,027$).

Em relação a área sob a curva (AUC) do GTT (Figura 8B), a ANOVA de duas vias revelou uma tendência para o efeito do fator tratamento ($F_{(1, 33)}=3,5704$, $p=,06763$). O mesmo acontece para a glicemia basal (Figura 8C), onde foi identificada uma tendência para glicemias mais baixas nos animais que receberam o tratamento com o óleo ($F_{(1, 33)}=3,1414$, $p=,08556$).

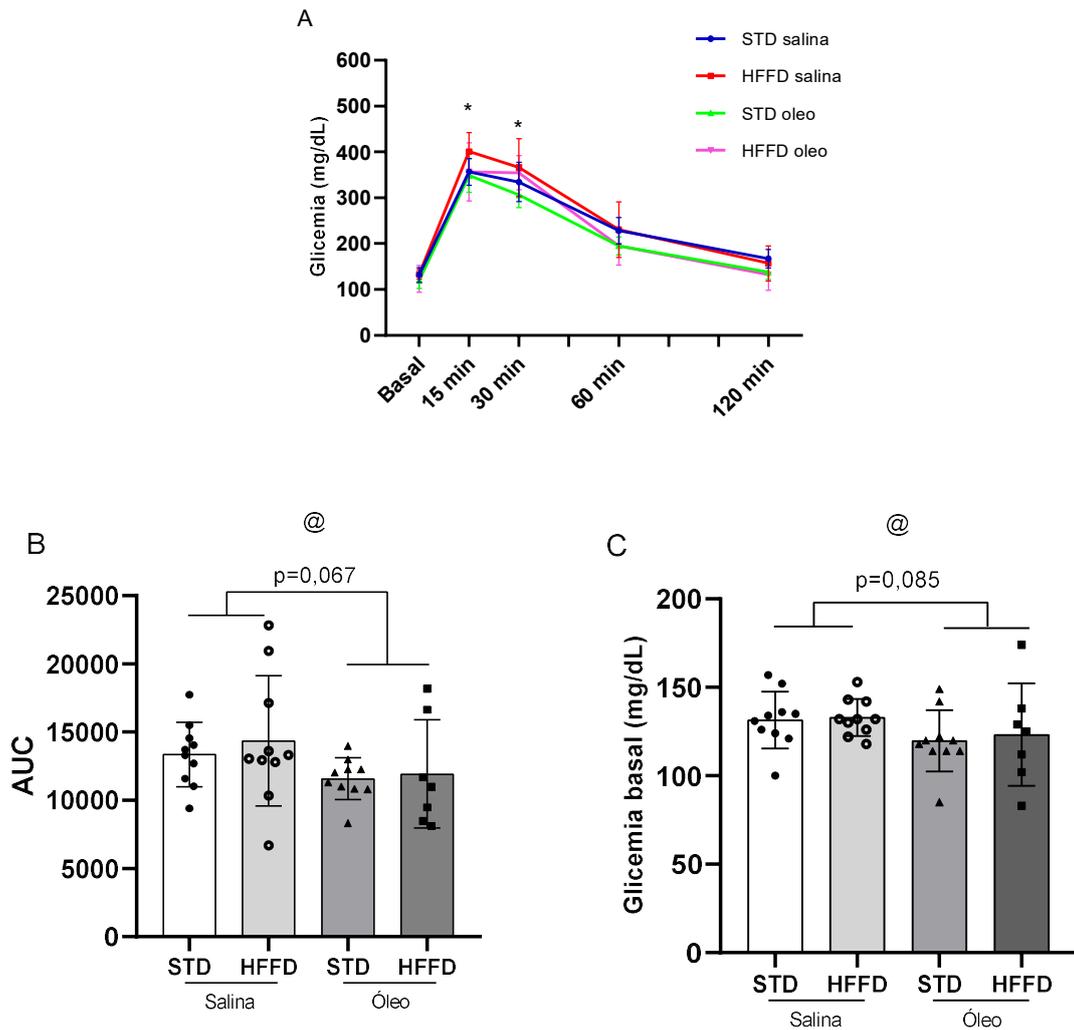


Figura 8. Efeito no metabolismo glicêmico

A) Curva glicêmica; B) Área sob a curva (AUC); C) Glicemia basal. Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão da média. No gráfico A* = $p < 0,05$ nas comparações post-hoc, onde em 15 minutos: animais HFFD salina tiveram uma glicemia maior que animais com dieta padrão (STD) associado com o óleo e HFFD associado com óleo. Aos 30 minutos, HFD salina teve glicemias maiores que STD óleo e HFFD óleo teve glicemia maior que STD óleo. Em 15 e 60 minutos HFD salina teve uma tendência a ter glicemias maiores que STD salina ($p=0,055$). Nos gráficos B e C, @ demonstra uma tendência do efeito do tratamento. STD salina ($n=10$), HFFD salina ($n=10$), STD óleo ($n=10$), HFFD óleo ($n=7$).

5.2.5 Testes Comportamentais

No teste comportamental Campo Aberto a ANOVA de duas vias não demonstrou nenhum efeito significativo em nenhuma variável: Cruzamentos totais (figura 9A), % tempo no centro (figura 9B), e % de cruzamentos periféricos (figura 9C) e no centro (9D).

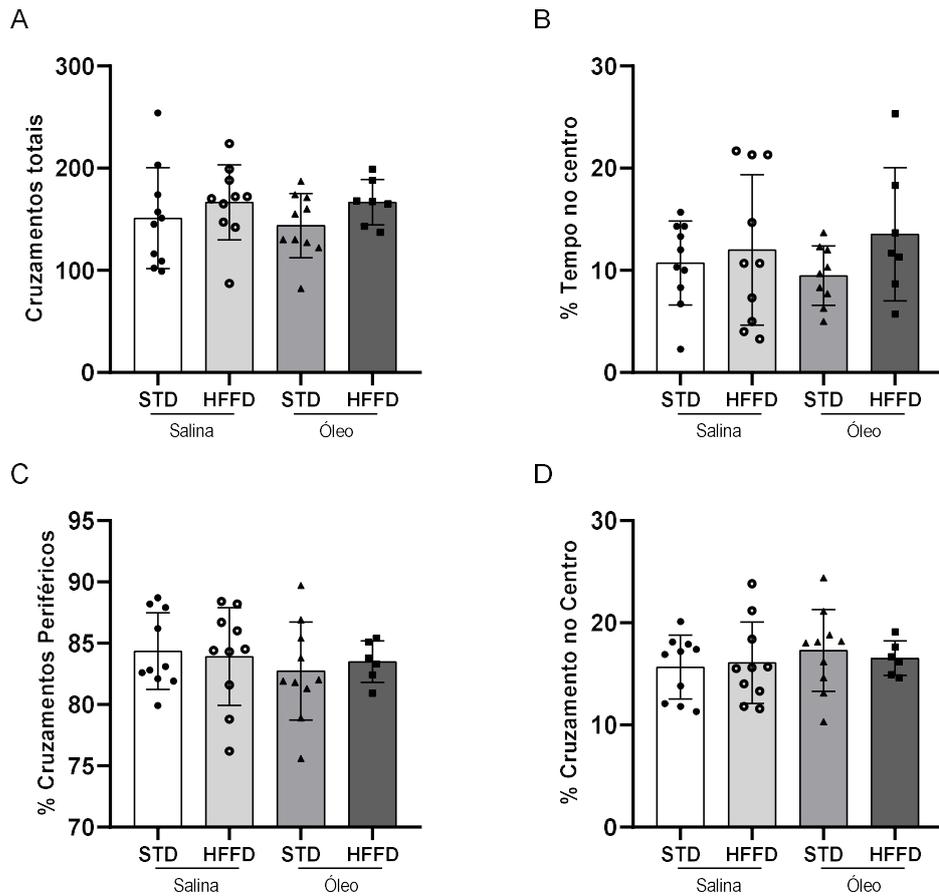


Figura 9. Efeito na locomoção espontânea e comportamento do tipo ansioso no campo aberto em camundongos

A) Cruzamentos totais. B) % Tempo no centro. C) Cruzamentos Periféricos (%). D) Cruzamentos no Centro (%). Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão da média. STD salina (n=10), HFFD salina (n=10), STD óleo (n=10, exceto % Tempo no centro=9), HFFD óleo (n=7, exceto Cruzamentos no Centro=6).

No teste comportamental Borrifagem de Sacarose a ANOVA de duas vias não demonstrou nenhum efeito significativo em nenhuma variável: Latência para comportamento de *grooming* (Figura 10A) e Tempo total de *grooming* (Figura 10B).

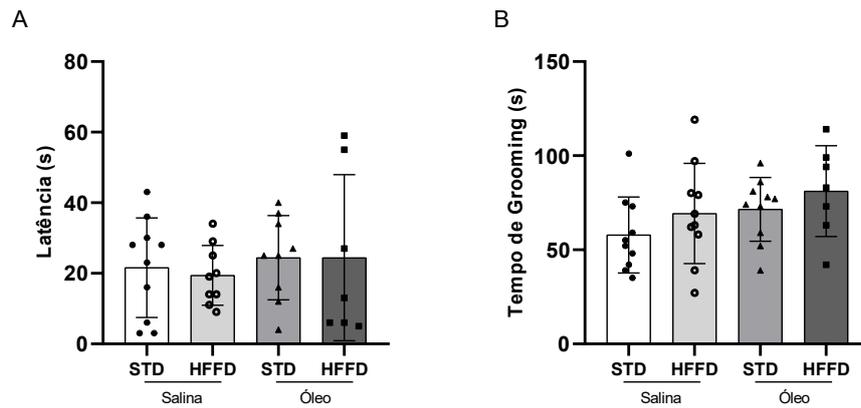


Figura 10. Efeito no comportamento anedônico no teste borrifagem de sacarose em camundongos A) Latência para iniciar o *grooming*. B) Tempo de *grooming*. Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão da média. STD salina (n=10), HFFD salina (n=10 exceto Latência=9), STD óleo (n=10 exceto Latência=9), HFFD óleo (n=7).

No teste comportamental Suspensão pela Cauda a ANOVA de duas vias não demonstrou nenhum efeito significativo em nenhuma variável: Latência para primeira imobilidade (Figura 11A) e Tempo total de imobilidade (Figura 11B).

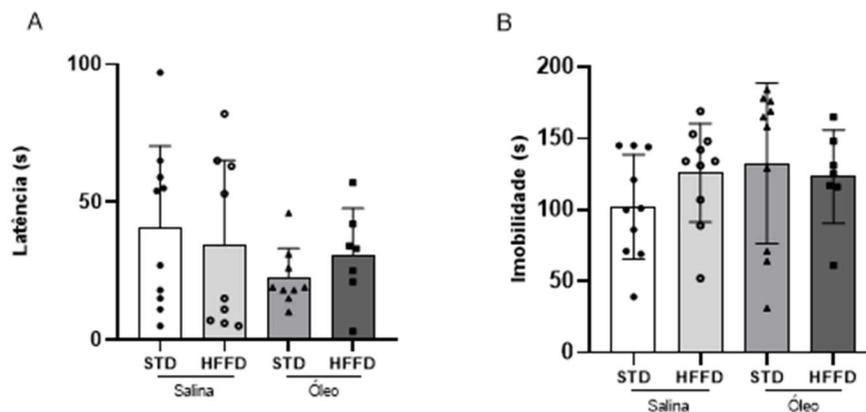


Figura 11. Efeito no comportamento no teste de suspensão pela cauda em camundongos A) Latência para primeira imobilidade B) Tempo total de imobilidade. Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão da média. STD salina (n=10), HFFD salina (n=10, exceto Latência=9), STD óleo (n=10, exceto Latência= 9), HFFD óleo (n=7).

Quando avaliado os animais em relação a sua memória através da alternância espontânea dos animais no Teste do Labirinto em T, não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos na ANOVA de duas vias (Figura 12).

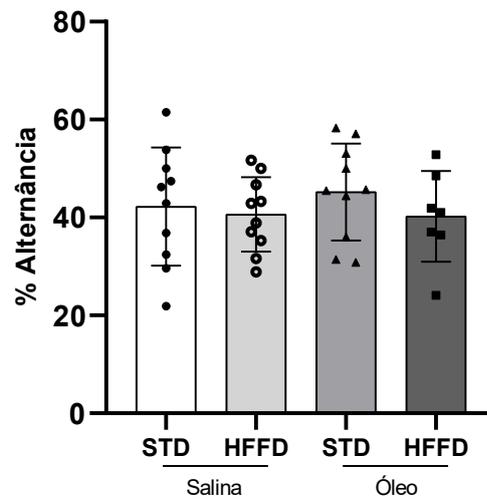


Figura 12. Avaliação do efeito na memória dos camundongos através do % de alternância dos braços do teste labirinto em T
Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão da média. STD salina (n=10), HFFD salina (n=10), STD óleo (n=10), HFFD óleo (n=7).

5.3 INVESTIGAÇÃO SE O ÓLEO ESSENCIAL DE *CORDIA VERBENACEA* APRESENTA PROPRIEDADES REFORÇADORAS *PER SE* NA TAREFA DE PREFERÊNCIA/AVERSÃO CONDICIONADA AO LUGAR EM CAMUNDONGOS

Na figura 13 está o índice de Preferência Condicionada ao Lugar (PCL) dos animais submetidos a esse teste com aplicação de salina (grupo controle) ou de óleo essencial de *Cordia verbenacea* diluído em salina, aplicado em via subcutânea na proporção de 0,657ml/kg de massa corporal. Os animais do grupo experimental tiveram menor tempo gasto no compartimento que foram condicionados com o óleo em relação ao grupo controle demonstrando uma aversão causada pelo tratamento (p=0,0010).

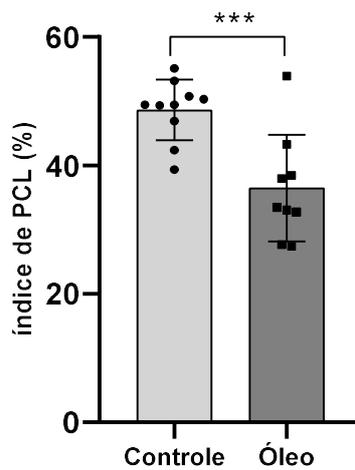


Figura 13. Índice de PCL dos animais submetidos a condicionamento com óleo essencial de *Cordia verbenacea*

*** $p = 0,001$ demonstrado pelo teste *t student*. Controle (N=10), Óleo (N=9)

A massa corporal dos animais também foi acompanhada no primeiro e no último dia (6º dia) de teste. A variação da massa corporal do grupo controle e grupo experimental estão demonstradas na figura 14. Ambos os grupos tiveram uma redução significativa da massa corporal ao longo do protocolo. Os dados de peso inicial e final para cada grupo foram comparados usando teste *t student* pareado (Grupo controle $p = 0,0011$ e grupo experimental $p = 0,0009$).

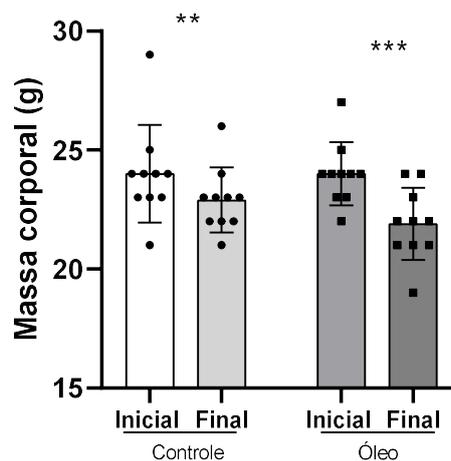


Figura 14. Variação da massa corporal antes e ao final do protocolo de PCL

** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Controle (N=10), Óleo (N=10)

6 DISCUSSÃO

A obesidade é um problema de saúde pública mundial, onde estima-se que até 2035 mais da metade da população estará com sobrepeso ou obesidade (World Obesity Federation, 2023). Essa doença trás diversos prejuízos metabólicos como aumento do tecido adiposo, aumento de secreção de citocinas inflamatórias no tecido adiposo, prejuízo na homeostase glicêmica, aumento de colesterol, triglicerídeos, enzimas hepáticas, entre outros, sendo fator de risco para DCNTs (Gregor; Hotamisligil, 2011; OMS, 2021). Além do mais, a obesidade tem sido associada com prejuízos cognitivos e doenças psiquiátricas como a depressão e transtorno de compulsão alimentar (Li *et al.*, 2023; Luppino; *et al.*, 2010; Udo; Grilo, 2018).

Em modelos animais, especialmente de roedores, essa doença é comumente estudada a partir da indução ao ganho de peso e desses prejuízos metabólicos com o uso de HFD (Kleinert *et al.*, 2018). O consumo de HFD e frutose por roedores tem sido associado a distúrbios metabólicos e prejuízos comportamentais (Arnold *et al.*, 2014; Buettner; Schölmerich; Bollheimer, 2007; De Souza *et al.*, 2021; Kleinert *et al.*, 2018; Sweeney *et al.*, 2017; Tsai *et al.*, 2022). Entretanto, a temporalidade, isto é o tempo de oferta e consumo da dieta, parece ser fator determinante nas mudanças causadas (Buettner; Schölmerich; Bollheimer, 2007).

Nossos resultados, mostram que a oferta de HFFD em camundongos C57Bl/6 por 60 dias foi capaz de levar a alguns prejuízos metabólicos. O grupo que recebeu HFFD associado com salina, teve um consumo calórico maior, elevação da gordura visceral, prejuízo no metabolismo glicêmico no GTT e elevação dos níveis plasmáticos de colesterol total em relação ao grupo que receberam dieta padrão (associado com salina). Todavia, não houve diferença na massa corporal e nos níveis de TGO desses animais. Por outro lado, houve uma diminuição nos níveis plasmáticos de triglicerídeos e dos níveis plasmáticos de TGP dos animais alimentados com HFFD associado com salina.

O consumo de HFFD por 60 dias aumentou a proporção de gordura visceral em relação aos animais que consumiram dieta padrão. Um estudo foi realizado por Li e colaboradores (2020) com o objetivo de avaliar as mudanças metabólicas causadas pelo consumo de HFD (51% lipídeos) durante 10 semanas em

camundongos C57Bl/6 machos com 6 semanas de idade ao início do experimento também encontrou índices maiores de tecido adiposo nos animais submetidos a HFD. Esse aumento do tecido adiposo visceral também foi descrito por Liang e colaboradores após estudarem camundongos C57BL/6 fêmeas 12 semanas consumindo HFD (60% lipídeos) (Liang *et al.*, 2021).

Apesar do aumento do tecido adiposo visceral, não houve aumento da massa corporal dos animais mesmo naqueles que receberam HFFD, embora o consumo calórico total tenha sido maior nesse grupo em relação ao grupo controle durante todo o protocolo experimental. Esse achado vai contra o fenótipo clássico da obesidade onde se tem aumento da massa corporal. Em humanos, o aumento da massa corporal associado com a altura (IMC) do indivíduo é um dos principais e mais utilizado parâmetro para diagnóstico da obesidade (ABESO, 2016). Todavia, esse resultado também foi descrito por Li e colaboradores (2020), onde os animais machos alimentados por HFD tiveram um aumento do tecido adiposo, sem diferença na massa corporal em comparação aos animais do grupo controle. Em outro estudo realizado anteriormente em nosso laboratório, utilizando o mesmo modelo animal, porém apenas em fêmeas, encontrou-se que 4 semanas de consumo de HFD não haviam sido suficientes para provocar mudanças significativas na massa corporal dos animais C57BL/6. Entretanto, após 8 semanas de consumo de HFD os animais já apresentavam ganho de massa corporal significativamente maior do que os animais que consumiram dieta padrão durante os experimentos (Braga *et al.*, 2021).

Ayabe e colaboradores, realizaram um estudo utilizando animais C57Bl/6 machos com idade de 6 semanas no início dos experimentos alimentados por HFD em um período de 8 semanas. Na mensuração e análise da massa corporal dos animais ao longo do experimento, foi encontrado diferenças estatísticas após 3 semanas de alimentação HFD (Ayabe *et al.*, 2018). Liang e colaboradores (2020) estudando animais C57BL/6 fêmeas encontraram diferenças na massa corporal dos animais alimentados com HFD (60% lipídeos) após uma semana de consumo dessa dieta, perdurando durante todo o protocolo experimental. Entretanto, iniciaram os experimentos com animais com 5 semanas de idade. Essas diferenças encontradas logo nas primeiras semanas de consumo de HFD pode se dar ao fato da utilização de animais mais jovens no início dos experimentos. Nesse sentido, a indução do aumento da massa corporal por HFD parece ser mais efetiva e pronunciada quando

iniciada em animais jovens e prolongada por várias semanas. Todavia, o fenótipo de obesidade aparece em média após ao menos 4 semanas de exposição à dieta hipercalórica (Buettner; Schölmerich; Bollheimer, 2007; Peckham; Entenman; Carroll, 1962).

Nesse ponto, além da idade dos animais e o tempo de oferta da dieta, a linhagem de camundongos parece ser um ponto determinante no grau de mudanças metabólicas que será encontrado após a alimentação com HFD. Por exemplo, no estudo de Li e colaboradores (2020), eles objetivaram comparar 4 diferentes modelos de camundongos: Kunming, C57BL/6, BALB/c e ICR quanto aos efeitos do consumo de HFD (53% gordura) por 10 semanas. Nos resultados, apenas as linhagens Kunming e ICR obtiveram diferença significativa na massa corporal do grupo HFD comparado aos animais do grupo controle. Entretanto, apesar da linhagem C57BL/6 não ter apresentado aumento significativo na massa corporal, houve um aumento significativo no % do tecido adiposo no grupo alimentado com HFD.

Outra linhagem comumente utilizada para modelos de indução de fenótipos obesos é os camundongos Swiss. São animais que parecem ser mais susceptíveis ao ganho de peso quando alimentados com dietas ricas em gorduras e alta densidade energética. Quando verificamos outros estudos realizados em nosso laboratório, como por exemplo, utilizando camundongos fêmeas Swiss, 15 dias de HFD associado com 15% de solução de frutose já é capaz de elevar a massa corporal em 10%, aumentar os níveis plasmáticos de colesterol e levar a um prejuízo na tolerância a glicose demonstrada pelo GTT (Veloso *et al.*, 2021). Já em camundongos Swiss machos, 15 dias de alimentação com HFD (61% lipídeos) foi suficiente para elevar a quantidade de tecido adiposo visceral, níveis glicêmicos basais e AUC na performance do GTT, com glicemias elevadas nos tempos de 30, 60 e 120 minutos. Já após 25 dias dessa alimentação ocorreu um aumento significativo da massa corporal, um incremento no prejuízo da tolerância a glicose encontrado após 15 dias de HFD no GTT, além de aumentos significativos nos níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol total. Com 35 dias de dieta esses aumentos se mantiveram sendo ainda mais expressivos (Machado, 2022).

Por outro lado, a temperatura ambiente parece também influenciar no grau de mudanças metabólicas induzidas por HFD nos animais (Ginting; Lee; Lee, 2023). A

temperatura termoneutra dos roedores, ou seja, a variação na temperatura onde o corpo mantém sua taxa metabólica e possui atividades termogênicas mínimas, se encontra na faixa de 28 a 33°C. A exposição a temperaturas do ambiente abaixo da temperatura termoneutra leva a uma ativação do tecido adiposo marrom, conhecido por aumentar o gasto energético e aumentar a produção de calor (Ginting; Lee; Lee, 2023).

Em contrapartida, a maioria dos alojamentos de animais ficam em temperatura ambiente de 20-23°C. Stemmer e colaboradores (2015) realizaram um estudo utilizando camundongos C57BL/6 alimentados com dieta baixa em gorduras (do inglês *Low Fat diet*, LFD) ou HFD (60% gordura), alojados em diferentes temperaturas, 23°C ou 33°C. Os resultados que eles obtiveram incluíram um menor ganho de peso para os animais que foram alojados em temperaturas menores. Isso aconteceu mesmo esses animais sendo alimentados com HFD e tendo um consumo calórico similar dos animais alojados em temperatura termoneutra. Além do mais, houve um aumento no gasto energético dos animais alojados em 23°C em comparação aos animais à 33°C, tanto no ciclo claro, quanto no escuro, embora a atividade locomotora dos animais em ambas as temperaturas foi semelhante. Ademais, os animais em temperatura termoneutra tiveram níveis significativamente maiores de citocinas como TNF, IL-6 e IL-10 (Stemmer *et al.*, 2015).

Por fim, analisando em conjunto os dados de que os animais alimentados com HFFD obtiveram porcentagens de tecido adiposo visceral maiores que os animais alimentados por dieta padrão, e que apesar desse aumento a massa corporal total não teve mudanças, abre lacunas para o que pode ter acontecido com a composição corporal desses animais. Guo e colaboradores após estudarem camundongos C57BL/6 machos alimentados por 6 meses com HFD (60% lipídeos) encontraram níveis de massa muscular menores nesses animais em relação ao grupo controle através do teste de Absorbância de Raios-X de Dupla Energia (DEXA) (Guo *et al.*, 2021). Além do mais, animais alimentados com HFD tem perda muscular maior durante o processo de envelhecimento (Lee *et al.*, 2015). A sarcopenia é uma condição caracterizada pela diminuição da força e massa muscular esquelética, associada ao consumo de HFD e obesidade (Hong; Choi, 2020). Nesse caso, a composição corporal muda, sem mudanças ou com valores similares de massa corporal e IMC, levando a alterações na taxa metabólica basal, diminuição no número

e volume de mitocôndrias, aumentando estresse oxidativo, levando a um ciclo vicioso (Batsis; Villareal, 2018).

Com o consumo de dietas hipercalóricas, ocorre um aumento de ácidos graxos dentro e fora do músculo. Fora do músculo, adipócitos também são acumulados, levando a secreção de citocinas inflamatórias como TNF α , IL-6 e IL-1, e assim, a um aumento da infiltração de citocinas e células inflamatórias, como macrófagos no tecido muscular esquelético. Com essa infiltração, antígenos são ativados e um processo apoptótico se inicia, podendo levar a atrofia muscular (Hong; Choi, 2020). Esse acúmulo de adipócitos também pode ocorrer dentro do músculo esquelético e levar a um prejuízo na sinalização da insulina. Por exemplo, em situações normais, a insulina se liga a seu receptor nas células, que se autofosforila nos resíduos de tirosina, levando a ativação do IRS-1 e assim, de uma cascata de sinalização, até a translocação do GLUT4 para a membrana da célula para captação da glicose. Com o aumento de lipídeos intramusculares, quinases ligadas ao estresse, como PKC, JNK, IKK são ativadas ocasionando a fosforilação do IRS-1 nos resíduos de serina/treonina. Isso resulta em um prejuízo na sinalização da insulina, e como consequência, uma diminuição da captação de glicose pelo músculo esquelético (Hong; Choi, 2020). Além do mais, com a resistência à insulina há um prejuízo na oxidação lipídica na mitocôndria, levando ao acúmulo de seus metabólitos e assim a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e estresse do retículo endoplasmático, e assim, a uma disfunção mitocondrial. Essa disfunção resulta em menor oxidação lipídica e dessa forma, um ciclo vicioso, levando a ativação de vias como IKK e JNK (Hong; Choi, 2020). Por fim, prejuízos na sinalização da insulina podem levar a uma diminuição na via das MAP quinases. Essas levam à ativação da mTOR1, importante para a síntese muscular. Quando há um prejuízo na sinalização de insulina, também pode ocorrer uma diminuição da síntese muscular (Hong; Choi, 2020).

Além desses fatores que podem estar por trás desses achados, como mudança na composição corporal com diminuição de massa muscular e aumento do tecido adiposo visceral e temperatura ambiente e ativação do tecido adiposo marrom, a oferta do tratamento também pode ter contribuído para tal. Embora a gavagem seja importante para a oferta do tratamento, ela pode ter sido um efeito estressor e contribuinte para a resistência ao ganho de peso dos animais (Jones; Boyd; Wallace, 2016). Quando comparado a variação da massa corporal nas primeiras semanas do

experimento (sem tratamento/gavagem) com a variação da massa corporal ao final do experimento (com tratamento/gavagem), os animais que receberam dieta padrão com salina ou óleo tiveram diminuição de peso. Essa diminuição da massa corporal tanto no grupo que recebeu salina tanto no grupo que recebeu o óleo, demonstra que houve um estresse provocado nos animais pela gavagem levando a diminuição da massa corporal. Já no caso dos animais alimentados por HFFD, não houve diferenças significativas na comparação entre a massa corporal do período sem tratamento e do período com tratamento. Essa inexistência de diferença pode demonstrar uma resistência ao ganho de peso nesses grupos, mesmo consumindo dietas hipercalóricas. Todavia, o tratamento durante todo o período foi realizado através de gavagem, devido o mesmo ser um óleo e, após testes pilotos com administração via subcutânea, ter demonstrado irritação na pele dos animais. Esses efeitos adversos vão de encontro aos resultados obtidos na pesquisa de bioinformática dos compostos do óleo onde a maioria tem média ou alta probabilidade de sensibilização e irritação da pele.

Dessa forma, a oferta do óleo deveria ser via oral e não poderia ser ofertado pelo consumo hídrico por exemplo, para se conhecer as quantidades exatas consumidas por cada animal. Além do mais, outras formas de administração oral como consumo voluntário foram cogitadas, entretanto os animais apenas adquirem o aprendizado do consumo na presença de alimentos palatáveis como aqueles ricos em açúcares e gorduras (e.g. leite condensado, creme de avelã, açúcar etc.) o que invalidaria os resultados, principalmente pela comparação ao grupo controle que receberia esse tipo de alimento de forma crônica.

Em relação ao metabolismo glicêmico, os animais que foram submetidos ao consumo de HFFD (associado com salina) obtiveram um prejuízo na tolerância a glicose demonstrada pelo GTT em relação aos que receberam dieta padrão. As diferenças foram encontradas nas glicemias após 15 e 30 minutos da aplicação da glicose. De forma geral, camundongos com obesidade levam mais tempo para diminuir seus níveis glicêmicos quando lidam com altas doses de glicose, como no GTT. Apesar de níveis glicêmicos maiores durante a performance do GTT, os níveis glicêmicos basais foram iguais para o grupo alimentado com dieta padrão e com HFFD. Li e colaboradores (2020) quando analisaram camundongos C57BL/6 machos após 10 semanas de consumo de HFD (51% lipídeos) também não encontraram

diferenças na glicemia basal entre os grupos dieta padrão e HFD. Entretanto, encontraram que os animais que receberam HFD tiveram uma AUC maior no GTT oral em relação aos animais alimentados com dieta padrão.

Outro estudo de nosso laboratório realizado com animais C57Bl/6 fêmeas avaliou os prejuízos causados por dieta HFD no metabolismo glicêmico dos mesmos animais após 4, 8 e 12 semanas de exposição a HFD. Após 4 semanas de consumo dessa dieta não foram encontradas diferenças significativas na AUC do GTT, nem nos níveis glicêmicos basais dos animais. Entretanto, houve diferença entre os grupos após 60 minutos durante a performance do GTT, apontando níveis glicêmicos maiores para os animais alimentados com HFD. Após 8 semanas de dieta, as diferenças entre os grupos já foram significativas na glicemia basal e AUC, com diferenças ainda maiores na glicemia após 60 minutos de performance no GTT, apontando um prejuízo no metabolismo da glicose nos animais submetidos a uma dieta rica em lipídeos e calorias após 8 semanas. Por fim, 12 semanas de dieta foi capaz de induzir uma diferença ainda maior na glicemia basal e na AUC do GTT, elevando a glicemia nos animais com HFD nos tempos de 30 e 60 minutos (Braga *et al.*, 2021). Por outro lado, o estudo de Liang e colaboradores (2021), utilizando fêmeas C57BL/6 alimentadas por HFD (60% lipídeos) por 12 semanas, a dieta nesse período não foi capaz de provocar diferenças nos níveis basais de glicemia dos animais, nem durante a performance do GTT. Apenas houve uma tendência para glicemias maiores no tempo de 30 minutos do GTT para o grupo HFD quando comparado ao grupo controle.

Nesse estudo, além da utilização da HFD, solução de frutose 10% também foi ofertada para consumo dos animais. A frutose é um monossacarídeo encontrado naturalmente em frutas e mel, na composição da sacarose (dissacarídeo formado por frutose e glicose) e xaropes de milho. Com a crescente industrialização, o xarope de milho tem sido amplamente usado na formulação de produtos alimentícios como bebidas açucaradas e sobremesas. O consumo desse tipo de alimentos tem sido associado ao desenvolvimento da obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (Malik *et al.*, 2010). Apesar da associação do consumo de HFD (61% lipídeos) com solução de frutose 10%, mesmo após 60 dias de consumo, a dieta não foi capaz de insultar os níveis de glicemia basal dos animais. Esse resultado aponta que os animais, submetidos a HFFD tiveram um prejuízo ao lidar com cargas elevadas de

glicose, levando mais tempo para normalizar seus níveis glicêmicos durante o GTT, porém ainda não obtinham um prejuízo na homeostase basal da glicemia.

No estudo de Jeong e Kim (2019) com animais C57BL/6 machos com 5 semanas ao início dos experimentos, alimentados durante 9 semanas com HFFD 60% gordura e 10% de frutose adicionada na água, os animais alimentados com essa dieta obtiveram níveis glicêmicos basais maiores em relação ao grupo controle. Entretanto, não houve diferença nos tempos de 30 e 60 minutos entre os grupos, apenas após 120 minutos que o grupo alimentado com HFFD teve glicemias mais elevadas mesmo após duas horas da aplicação de glicose. Isso significa que esses animais tiveram um prejuízo no metabolismo glicêmico basal e dificuldades em lidar com uma carga elevada de glicose, necessitando mais tempo para normalizar suas glicemias em relação ao grupo controle (Jeong; Kim, 2019).

Na clínica, a elevação da glicemia em jejum é usada como um dos critérios de diagnóstico para pré-diabetes ($> 100\text{mg/dL}$ a 125mg/dL) ou Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) ($> 126\text{mg/dL}$) em humanos. Entretanto, não é o único exame aplicado para diagnóstico da doença. O GTT oral também é empregado para diagnóstico. Humanos que após duas horas do consumo de 75g de glicose estejam com glicemias entre 140mg/dL à 199mg/dL são diagnosticados com pré-diabetes e $> 200\text{mg/dL}$ são diagnosticados com DM2 (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2023).

O consumo de dietas inadequadas e assim, o surgimento do fenótipo de obesidade estão associados a maiores riscos de desenvolver DM2. Com o consumo de dietas hipercalóricas, ricas em gorduras e açúcares, ocorre um aumento de lipogênese. Com esse processo há um aumento do estoque e tamanho das células adiposas e assim, do tecido adiposo. Esse aumento pode levar a uma inflamação de baixo grau e a ativação de vias pró-inflamatórias. Essa ativação leva a produção e liberação de citocinas inflamatórias que podem desencadear um prejuízo na sinalização da insulina. Por exemplo, a fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS) pode ocorrer na serina ao invés da tirosina, reduzindo assim a sinalização da insulina. Sem a sinalização adequada da insulina, os receptores de glicose (os GLUTs) que ficam internalizados nas células, não vão até as membranas das células, por consequência a glicose circulante não consegue entrar efetivamente

nessas células, aumentando os níveis glicêmicos sanguíneos, levando a resistência à insulina (Ellies; Johnson; Olefsky, 2013).

Possivelmente nesse estudo, um tempo maior de dieta poderia levar a esse prejuízo basal na glicemia. Mesmo com um aumento do tecido adiposo, ele pode não ter sido suficiente para provocar esse insulto. Assim, tempos maiores de dieta nesse modelo animal podem ser necessárias para elevar os níveis glicêmicos basais dos animais.

Com o consumo de HFFD, os níveis plasmáticos de colesterol total também foram significativamente maiores. Esse achado também vai de encontro com os resultados de Li e colaboradores, onde os níveis plasmáticos de CT foram significativamente maiores nos animais que receberam HFD. Nesse estudo, eles também avaliaram e encontraram níveis maiores de colesterol LDL nos animais do grupo HFD (Li *et al.*, 2020). Já no estudo de Jeong e Kim, que alimentaram os animais com HFFD (60% gordura e 10% de frutose) também encontram níveis plasmáticos de colesterol mais elevados nos animais alimentados com essa dieta em relação aos do grupo controle após 10 semanas de consumo (Jeong; Kim, 2019). Já Gao e colaboradores que também fizeram uma associação entre HFD (45% lipídeos) e solução 10% de frutose também encontram níveis maiores de colesterol total em camundongos machos após 8 semanas de consumo de HFFD (Gao *et al.*, 2023).

Quando analisado os níveis plasmáticos de triglicerídeos, houve uma diminuição significativa dos seus níveis nos que receberam HFFD. No estudo de Li e colaboradores, não houve mudanças significativas nos níveis de triglicerídeos dos animais C57BL/6 alimentados com HFD. Já a associação de HFD com 10% de frutose foi capaz de elevar os níveis de triglicerídeos após 10 semanas de consumo dessa dieta nos animais C57BL/6 machos estudados por Jeong e Kim (2019). Gao e colaboradores (2023), após 8 semanas alimentando camundongos C57BL/6 machos com HFD (45% lipídeos) associado com solução 10% de frutose encontraram níveis plasmáticos de triglicerídeos maiores nesses animais em comparação aos do grupo controle. Em fêmeas, após 12 semanas de HFD (60% lipídeos) não foram encontradas alterações nos níveis plasmáticos de triglicerídeos (Liang *et al.*, 2021).

O consumo de dietas ricas em gorduras e açúcares é associado com o aumento dos níveis de triglicerídeos (Faludi *et al.*, 2017). Todavia, apesar da literatura mostrar um aumento dos níveis plasmáticos de triglicerídeos em animais alimentados com HFD ou HFFD, ou uma falta de mudança significativa desse parâmetro bioquímico frente a esse tipo de dieta, nesse estudo tivemos uma diminuição dos níveis plasmáticos após 60 dias de alimentação com HFFD. Assim como os animais tiveram uma resistência ao ganho de peso, os resultados dos níveis séricos de triglicerídeos também podem ter sido influenciados pelos mesmos fatores que levaram a essa resistência. Por exemplo, o estresse provocado pelo tratamento e manipulação diária dos animais, bem como pela temperatura ambiente dos alojamentos dos animais. Nesse sentido, em um estudo realizado por Tian e colaboradores, animais C57BL/6 alimentados por HFD e alojados em temperatura de 22°C, não tiveram mudanças nos níveis de triglicerídeos plasmáticos em relação aos animais que consumiram dieta padrão alojados em mesma temperatura. Todavia, os níveis de triglicerídeos plasmáticos foram maiores tanto em animais alimentados com dieta padrão tanto com HFD quando alojados em temperatura termoneutra (30°C), sem diferença estatística entre as diferentes dietas (Tian *et al.*, 2016).

Os níveis plasmáticos das enzimas hepáticas TGO e TGP também foram analisadas. Em relação a TGO, não houve diferença entre os grupos que receberam dieta padrão e HFFD. Já em relação a TGP houve uma diminuição em seus níveis plasmáticos nos animais que receberam a HFFD. As enzimas hepáticas TGO e TGP quando elevadas podem indicar disfunção hepática. O consumo de dietas ricas em gorduras e açúcares pode levar a disfunções hepáticas e é associado por exemplo com a Doença Hepática Gordurosa Não Alcólica (DHGNA). Essa doença é caracterizada por esteatose macrovesicular em pelo menos 5% das células hepáticas (hepatócitos), sem uma causa secundária como uso de álcool e drogas (Maurice; Manousou, 2018). Gao e colaboradores (2023) avaliaram animais C57BL/6 machos após 8 semanas consumindo HFD (45% lipídeos) associada com solução de 10% de frutose e encontraram níveis plasmáticos maiores de TGP nos animais alimentados com HFFD em comparação aos animais controle. Além disso, houve uma tendência ao aumento de TGO nesses animais, porém sem uma significância estatística. Yan e colaboradores (2021) também avaliaram animais C57BL/6 machos, porém após 12 semanas de dieta HFD (60% lipídeos) e encontraram níveis maiores de TGP para os

animais alimentados com essa dieta, sem diferenças nos níveis de TGO. Já em fêmeas, Liang e colaboradores (2021) avaliaram após 12 semanas de HFD (60% lipídeos) e não encontraram diferenças entre o grupo HFD e controle em relação aos níveis de TGO e de TGP. De forma semelhante aos nossos resultados, outro estudo do nosso grupo de pesquisa encontrou níveis menores de TGP em animais C57BL/6 machos após 16 semanas de consumo de HFD (dados não publicados).

Por outro lado, quando analisamos o comportamento desses animais, como o a locomoção espontânea e comportamento tipo ansioso no Campo Aberto, comportamento anedônico e de autocuidado no teste de borrifarem de sacarose (do inglês *splash test*), de estratégia comportamental frente a estresse agudo inescapável no teste de Suspensão pela cauda (do inglês *Tail suspension test*) e memória de trabalho no teste de alternância espontânea no labirinto em T, não encontramos nenhuma diferença significativa entre os grupos controles e os que receberam HFFD em nenhum dos testes. Nesse sentido, é importante destacar um possível estresse nos animais influenciando os resultados comportamentais, devido a gavagem e as manipulações diárias. Além do mais, não houve separação por sexo para análise estatística, embora animais machos e fêmeas possam ter valores basais distintos em testes comportamentais (De Souza *et al.*, 2021). Isso contribui para uma maior variação intragrupo, dificultando a observação de efeitos entre os grupos. Entretanto, a análise conjunta dos animais machos e fêmeas foi em razão do pequeno tamanho amostral, justificado pelo desencorajamento causado pelos efeitos adversos do tratamento na continuidade e expansão dos experimentos.

Analisando estudos anteriores realizados em nosso laboratório, camundongos fêmeas C57BL/6 alimentadas com HFD (61% lipídeos) obtiveram aumento da locomoção espontânea (cruzamentos totais) no campo aberto após 8 e 12 semanas de HFD (Braga *et al.*, 2021). Zemdegs e colaboradores estudando camundongos C57BL/6 machos após 12 e 16 semanas de consumo de HFD (45% lipídeos) encontraram menor tempo no centro e menor número de cruzamentos centrais apenas após 16 semanas de HFD, demonstrando que a dieta foi capaz de levar a comportamento tipo ansiogênico, porém com tempo maior de consumo da dieta (Zemdegs *et al.*, 2016). Isso também foi descrito por Sweeney e colaboradores ao estudarem camundongos C57BL/6 machos e fêmeas após consumirem HFD (60% lipídeos). Eles analisaram os animais após 10 e 14 semanas de consumo de HFD no

campo aberto, realizando uma média dos dados de cada animal para análise de correlação com a massa corporal desses animais. Como resultados obtiveram uma correlação positiva entre aumento da massa corporal e diminuição do tempo no centro, bem como a distância percorrida no centro. Isso demonstra que o consumo crônico de HFD pode modular e levar a comportamento do tipo ansioso nos animais (Sweeney *et al.*, 2017).

Em relação ao teste de borrifagem de sacarose, não encontramos diferenças entre os grupos. Debler e colaboradores (2023) após estudar camundongos C57BL/6 fêmeas consumindo HFD (60% lipídeos) por 9-10 semanas também não encontrou diferença no tempo total de comportamento de autolimpeza (*grooming*) desses animais (Debler *et al.*, 2023). Em machos, Zemdegs e colaboradores encontraram menos tempo de *grooming* apenas após 16 semanas de consumo de HFD (45% lipídeos). Isso demonstra que apesar da dieta ter sido capaz de induzir um comportamento tipo anedônico, um tempo maior de exposição a dieta foi necessário (Zemdegs *et al.*, 2016).

No teste de suspensão pela cauda, que analisa estratégia comportamental frente a estresse agudo inescapável, também a dieta não foi capaz de promover mudanças comportamentais após 60 dias de consumo. Nesse sentido, previamente em nosso laboratório, 4 semanas de oferta de HFD (61% lipídeos) em fêmeas também não havia sido suficiente para provocar mudança no comportamento tipo depressivo dos animais (Braga *et al.*, 2021). Zemdegs que avaliou animais machos após 12 e 16 semanas de exposição a HFD (45% lipídeos) não encontrou diferenças no tempo total de imobilidade mesmo após 4 meses de dieta (Zemdegs *et al.*, 2016). A depressão apesar de ser correlacionada com a obesidade, pode necessitar mais tempo para desenvolver os primeiros sintomas. Além do mais, é uma doença multifatorial, com uma diversidade de sintomas. O teste de suspensão pela cauda avalia apenas um, o de desesperança frente a uma situação inescapável, sintoma esse que pode não ser necessariamente acometido pela HFD (Zemdegs *et al.*, 2016).

Por fim, quando avaliado a memória de trabalho dos animais através do teste de alternância espontânea no labirinto em T (adaptação do labirinto em Y), os animais não tiveram diferenças entre os grupos independente do tempo de dieta. Wang e colaboradores avaliaram camundongos C57BL/6 machos após 10 semanas

consumindo HFFD (45% lipídeos associado com solução 10% de frutose) e encontraram % de alternância menores nos animais que consumiram essa dieta em relação ao grupo controle, demonstrando possíveis prejuízos na memória de trabalho desses animais (Wang *et al.*, 2019). Outro estudo, utilizando C57BL/6 machos alimentados por HFD (45% lipídeos) por 8 semanas ou HFD (60% lipídeos) por 17 dias, encontrou diminuição na alternância espontânea dos animais (Arnold *et al.*, 2014). A memória de trabalho se refere à capacidade de monitorar a relevância de estímulos recebidos e atualizar informações na memória conforme necessário, sendo um dos componentes da função executiva. Prejuízos na memória de trabalho (e outros componentes da função executiva) são correlacionados com obesidade e sobrepeso (Yang *et al.*, 2018).

Levando em consideração todos os resultados e pontos levantados até aqui, não obtivemos diferenças em todos os parâmetros avaliados provocados pelo consumo de HFFD após 60 dias. Entretanto, apesar de encontrarmos outros estudos mostrando diferenças em parâmetros metabólicos e comportamentais em tempos menores que 60 dias de oferta de dietas em diferentes linhagens de camundongos, algumas dessas alterações não foram encontradas aqui (Braga *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2020; Machado, 2022). Esses resultados podem ser reflexos do camundongo C57BL/6 parecer ser mais resistente a algumas mudanças causadas por HFD, como ganho de massa corporal, em relação à outras linhagens (Li *et al.*, 2020). Dessa forma, levanta-se a hipótese da necessidade de tempos maiores de dieta para prejuízos maiores nessa linhagem, como o estudo de Zemdegis e colaboradores (2016) que estudou animais com 16 semanas de consumo de HFD e encontrou algumas diferenças comportamentais não encontradas por exemplo, após 12 semanas de dieta.

Com relação ao sexo dos animais, nesse estudo, utilizamos ambos os sexos para acompanhar as mudanças provocadas pela HFFD, embora a maioria dos estudos utilize apenas um sexo para estudos, sendo na grande maioria animais machos. Quando pensamos em delineamentos experimentais para entendimento ou busca por tratamentos para doenças, como a obesidade, devemos levar em consideração o dimorfismo sexual. Ao ignorar o sexo, também corremos o risco de ignorar intervenções em potencial pelo seu desempenho (ou falta dele), por exemplo,

em machos, que poderiam ser benéficos para fêmeas e vice-versa (Kleinert *et al.*, 2018).

Quando avaliamos os efeitos da administração de óleo essencial de *Cordia verbenacea* sobre as alterações metabólicas e comportamentais induzidas por consumo crônico de HFFD, o óleo não foi capaz de diminuir o consumo calórico dos animais, nem reverter os efeitos da dieta no % de gordura visceral e níveis plasmáticos de colesterol. Em relação aos triglicerídeos e TGP nesse protocolo também foram encontrados níveis menores para os grupos alimentados com HFFD, sem nenhum efeito do tratamento. Não houve diferenças para TGO causados pela dieta ou pelo tratamento. Em relação a performance do GTT, o óleo induziu glicemias mais baixas nos grupos alimentados com dieta padrão e dieta HFFD em tratamento com o óleo no tempo de 15 minutos em relação ao grupo HFFD que recebeu salina. Já aos 30 minutos de teste, o grupo que recebeu dieta padrão associada com o óleo teve glicemias menores em relação aos grupos que receberam dieta HFFD associada com salina ou tratamento. Na glicemia basal e na AUC do GTT o tratamento com óleo desencadeou uma tendência a níveis glicêmicos mais baixos em relação aos animais que não foram tratados com o óleo. Por fim, assim como não houve mudanças comportamentais causadas pelo consumo crônico da HFFD, o tratamento com o óleo também não induziu nenhuma alteração comportamental.

Como exposto anteriormente, o tratamento com o óleo foi ofertado de forma oral. Entretanto, após pesquisa de bioinformática dos compostos presentes no óleo, encontrou-se que 2 (alfa-humuleno e cariofileno) dos 4 compostos que possuem probabilidade de atividade no receptor CB2, possuem baixa biodisponibilidade quando ofertados via oral. Quando analisado a probabilidade de atravessar a BHE, o alfa copaeno (4,9% do óleo com 10,9% de probabilidade de atividade CB2) possui uma probabilidade de 66,4% de atravessar a BHE. O alfa-humuleno (1,3% do óleo com 4,3% de probabilidade de atividade CB2) possui uma probabilidade de apenas 11,1% de atravessar a BHE. O alfa-pineno (11,9% do óleo com 6,5% probabilidade de atividade CB2) possui uma probabilidade de 89,6% de atravessar a BHE. Por fim, o cariofileno, (8,4% do óleo com 71,9% de probabilidade de atividade CB2), possui 83,2% de probabilidade de atravessar a BHE. Esses dados mostram que apesar de 3 dos 4 compostos com probabilidade de atividade em CB2, terem chances maiores de atravessarem a BHE, a biodisponibilidade de absorção e quantidade disponível no

óleo de cada composto não são tão significativas. De maneira geral, pode ser que os compostos não estejam sendo efetivamente absorvidos para que posteriormente entrem no encéfalo para terem ação nos receptores. Além do mais, a quantidade ofertada de cada composto, bem como a probabilidade de ação nos receptores CB2, pode ser pequena e mesmo que em partes os compostos sejam absorvidos, talvez não seja capaz de promover algum efeito significativo.

Na literatura, estudos utilizando agonistas de receptor CB2 mostram diminuição e prevenção dos efeitos causados por indução de obesidade por meio de dieta. No estudo de Verty e colaboradores, eles utilizaram tratamento com JWH-015 (i.p. 10mg/kg), um agonista CB2, durante 21 dias, após um período de 20 semanas de oferta de dieta hipercalórica (21% lipídeos) em camundongos C57BL/6 machos. Em seus resultados encontraram consumo alimentar menor nos animais que receberam o tratamento, perda de peso ao longo dos dias, níveis de glicose menores durante a performance de GTT, diminuição de níveis plasmáticos de insulina, triglicerídeos, TGO e TNF- α . Quando avaliado o comportamento dos animais, não houve diferenças entre os grupos no teste de nado forçado, que avalia estratégia comportamental frente a estresse agudo inescapável, e no labirinto em cruz elevada o tratamento aumentou as entradas e tempo gasto pelos animais nos braços abertos, demonstrando comportamento ansiogênico (Verty *et al.*, 2015). Já no estudo de Youssef e colaboradores (2019), utilizando ratos Wistar alimentados com HFFD (40% lipídeos associado com solução 10% frutose) por 9 semanas, seguidas de 4 semanas com tratamento com cariofileno 30mg/kg via oral. O tratamento atenuou o índice de massa adiposa, níveis basais de glicemia e insulina em jejum, triglicerídeos e colesterol total. Também diminuiu níveis de TNF- α e Nf- κ B no grupo que recebeu o tratamento em comparação ao grupo apenas alimentado com HFFD. Em outro estudo do mesmo autor, eles também demonstraram melhoras em parâmetros metabólicos com o tratamento com o cariofileno, verificaram que com o tratamento protegia da hipolocomoção causada pela HFFD no teste do campo aberto, e no número de entradas e tempo gasto no centro do aparato, bem como no número de entradas e tempo gasto nos braços abertos do teste de labirinto em cruz elevada, demonstrando uma reversão do comportamento ansiogênico causado pela HFFD nesses animais. Além do mais, o tratamento reverteu o prejuízo na memória espacial testado pelo teste do labirinto em T e atenuou o comportamento tipo-depressivo diminuindo o tempo de

imobilidade no teste de nado forçado em relação ao grupo alimentado com HFFD sem tratamento, porém sem conseguir reverter totalmente os efeitos da dieta nesse comportamento. Todos os efeitos do cariofileno foram suprimidos quando administrado anteriormente um antagonista do receptor CB2, o Am630 (Youssef; El-Fayoumi; Mahmoud, 2019).

Nesse estudo, não encontramos diferenças nos níveis plasmáticos das enzimas hepáticas após o tratamento com o óleo. A única diferença nesses parâmetros foi a indução a níveis menores de TGP pelo consumo crônico de HFFD, sem efeito do óleo. Isso demonstra que apesar do tratamento crônico com o óleo e probabilidade de toxicidade hepática de alguns compostos, o tratamento não gerou um insulto hepático capaz de elevar as enzimas hepáticas mesmo após mais de 30 dias de tratamento até o final dos experimentos.

Por outro lado, apesar de o tratamento não ter atenuado os efeitos de peso, gordura visceral, consumo alimentar e outros parâmetros bioquímicos, houve um efeito nos níveis glicêmicos dos animais, tanto dos que receberam dieta padrão com o tratamento, e os animais alimentados com HFFD associado com o tratamento. Na performance do GTT, o tratamento melhorou a tolerância a glicose nos grupos alimentados com dieta padrão e dieta HFFD em tratamento com o óleo no tempo de 15 minutos em relação ao grupo HFFD que recebeu salina. Já aos 30 minutos de teste, o grupo que recebeu dieta padrão associada com o óleo teve glicemias menores em relação aos grupos que receberam dieta HFFD associada com salina ou tratamento. Na glicemia basal e na AUC do GTT o tratamento com óleo desencadeou uma tendência a níveis glicêmicos mais baixos em relação aos animais que não foram tratados com o óleo.

Esses resultados podem se dar por uma atuação mais periférica dos compostos. Por exemplo, Mani e colaboradores (2021) realizaram um estudo com ratos Wistar machos, alimentados com HFFD (30% lipídeos e 25% frutose) por 60 dias para indução de DM2. Após esse período, trataram os animais com Cariofileno (200mg/kg) durante 30 dias. Com análise de mRNA e proteica (Western Blotting) do tecido muscular (gastrocnêmico), verificou-se reversão da diminuição da expressão de mRNA do receptor de insulina dos animais alimentados com HFFD para aqueles que receberam o tratamento com cariofileno. Além do mais, houve um aumento do

mRNA da AKT nos que receberam o tratamento, embora não tenha sido suficiente para reverter totalmente o efeito da dieta e atingir os níveis dos animais controle. Por fim, teve-se tanto um aumento do mRNA do GLUT 4, quanto da sua proteína nos animais tratados com cariofileno em comparação aos que apenas receberam HFFD, sendo que esse aumento foi capaz de igualar os níveis do transportador aos do grupo controle. Dessa forma, com a reversão da expressão do receptor de insulina e componentes da sua sinalização intracelular, bem como expressão do transportador de glicose (GLUT4), há um aumento na sensibilização da insulina, que havia sido prejudicado devido o consumo de HFFD, melhorando os níveis glicêmicos dos animais (Mani *et al.*, 2021). Além de aumentar expressão do GLUT 4, a suplementação com cariofileno aumenta sua translocação para a membrana das células musculares, aumentando a captação de glicose. Nas células B-pancreáticas, aumenta a secreção de insulina estimulada por glicose de uma forma dose-dependente, tendo seu efeito abolido quando associado com bloqueadores do CB2, demonstrando um mecanismo de ação dependente de CB2. Esse mecanismo estaria ligado a uma ativação de CB2 que faria aumentar a entrada de cálcio nas células Beta, aumentando a liberação de insulina pelo pâncreas (Hashiesh *et al.*, 2020). Outros mecanismos os quais o tratamento com cariofileno mantém níveis adequados de glicose no sangue são pela diminuição da gliconeogênese, aumento do uso de glicose e armazenamento no fígado, prevenção e atenuação do estresse oxidativo e inflamação no pâncreas e redução de absorção de glicose no intestino (Hashiesh *et al.*, 2020).

Outros estudos, como Escandón-Rivera e colaboradores (2017) encontraram níveis glicêmicos menores em animais que foram tratados com o óleo essencial de *Calea ternifolia* em comparação aos animais que receberam veículo, tendo sido ambos previamente induzidos a hiperglicemia farmacologicamente. O óleo essencial de *Calea ternifolia* possui em sua composição sesquiterpenos como curcumeno e cariofileno, assim como no óleo essencial da *Cordia verbenacea* utilizada no presente estudo (Escandón-Rivera *et al.*, 2017). Além disso, outros compostos presentes no óleo de *Cordia verbenacea*, como alfa-humuleno tem potencial de atenuar processos inflamatórios, podendo ter uma contribuição nessa atenuação dos efeitos da dieta na glicemia dos animais (Fernandes *et al.*, 2007).

Por fim, quando avaliado o comportamento dos animais, não obtivemos nenhum efeito do tratamento, seja de prejuízo ou benefício. Essa falta de mudança

pode se dar por alguns fatores, como: a) a exposição da dieta por 60 dias *per se* não foi capaz de provocar prejuízos no comportamento dos animais, assim, mesmo se houvesse um fator protetivo do tratamento o mesmo não seria perceptível; b) Como a biodisponibilidade de absorção dos compostos segundo a pesquisa realizada na plataforma ADMETlab não é muito alta e as concentrações dos compostos com atividade CB2 acabam sendo pequenas na composição final do óleo, talvez não houve quantidades suficientes no SNC para de fato provocar alguma efeito, seja ele positivo ou negativo.

Nesse contexto de tratamento, a avaliação comportamental dos animais tratados é de suma importância. Nos anos 2000, após a descoberta do sistema endocanabinoide e do receptor CB1, constatou-se que o uso de antagonistas desse receptor promovia efeitos antiobesidade. Todavia, apesar de promissor o tratamento no sentido metabólico, após lançamentos de um medicamento antiobesidade no mercado, o mesmo teve de ser suspenso por efeitos adversos como aumento de sintomas tipo depressivo (Di Marzo; Després, 2009). Já nos estudos básicos e pré-clínicos com agonistas de receptores CB2, até o momento, não há indícios de prejuízos comportamentais causadas pelo tratamento, podendo ocorrer até uma proteção contra prejuízos causados por dieta (Rossi *et al.*, 2018).

Outro objetivo específico desse estudo foi avaliar se o óleo essencial de *Cordia verbenacea* apresenta propriedades reforçadoras *per se* na tarefa de preferência/aversão condicionada ao lugar (PCL) em camundongos. Com a performance da tarefa, os animais do grupo experimental tiveram menor tempo gasto no compartimento que foram condicionados com o óleo em relação ao grupo controle. Esse achado demonstra uma aversão causada pelo tratamento. No estudo de Barbosa e colaboradores (2023), quando realizado o mesmo protocolo apenas para um dos compostos presentes no óleo, o cariofileno, sendo o composto com maior probabilidade de atividade no receptor CB2, não houve diferenças significativas entre os grupos controle e experimentais, mesmo testando doses de 100mg/kg de cariofileno. Dessa forma, os efeitos negativos do tratamento com o óleo nessa tarefa, pode se dar pela presença de outros compostos ou pelo conjunto deles.

Nesse sentido, quando avaliado os compostos quanto a seus possíveis efeitos tóxicos através da plataforma ADMETlab 2.0, dos 9 compostos presentes no óleo, 6

possuíam alguma probabilidade de sensibilização na pele. Sendo esse efeito perceptível após aplicação das doses, mesmo diluídas em salina, por via subcutânea. Além do mais, 7 compostos possuíam alguma probabilidade de irritação ou corrosão ocular, 4 para problemas respiratórios e 5 para hepatotoxicidade. Apenas o Alfa-copaeno possuía 45,1% de probabilidade de ser tóxico agudamente em ratos segundo o ADMETlab 2.0, sendo que esse composto representa apenas 4,9% do óleo. Assim, o efeito aversivo provocado pelo tratamento do óleo na PCL pode estar relacionado a questões envolvendo a aplicação e sensibilização da pele dos animais, ou a outras questões envolvendo efeitos não descritos nos possíveis efeitos de cada composto. Além disso, os animais tiveram perda de peso significativa ao longo dos 6 dias da execução do teste. Essa perda ocorreu tanto no grupo controle quanto no grupo experimental. Assim, a perda de peso não parece ter sido causada pelo tratamento *per se*, mas pelas condições de estresse geradas pelo teste e restrição alimentar que ocorreu em consequência da aplicação do teste nas duas sessões diárias de condicionamento de 45 minutos cada.

Diante de todos esses achados e resultados obtidos, novas análises e testes não foram encorajados para a continuidade do estudo, concluindo que apesar de um efeito promissor na glicemia dos camundongos, o tratamento foi aversivo aos animais, mesmo não tendo sido capaz de levar a outros prejuízos comportamentais, como comportamento do tipo depressivo. Além do mais, não foi capaz de reverter ou atenuar outros efeitos do consumo crônico de HFFD, objetivo principal do estudo.

7 CONCLUSÃO

O tratamento crônico com o óleo de *Cordia verbenacea* não foi capaz de diminuir o consumo alimentar dos animais e de amenizar os efeitos metabólicos do consumo crônico de HFFD. Entretanto, foi capaz de promover melhora no metabolismo glicêmico dos animais tratados com o óleo. Por outro lado, houve um efeito aversivo nos animais que receberam o óleo no teste de Preferência Condicionada ao Lugar (PCL).

REFERÊNCIAS

ABESO. Diretrizes brasileiras de obesidade 2016. **VI Diretrizes Brasileiras de Obesidade**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 7–186, 2016. Disponível em: <https://abeso.org.br/wp-content/uploads/2019/12/Diretrizes-Download-Diretrizes-Brasileiras-de-Obesidade-2016.pdf>.

ÁGH, Tamás *et al.* Epidemiology, health-related quality of life and economic burden of binge eating disorder: a systematic literature review. **Eating and Weight Disorders**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1–12, 2015.

AKBAS, F. *et al.* A critical review of the cannabinoid receptor as a drug target for obesity management. **Obesity Reviews**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 58–67, 2009.

ALJADA, Ahmad *et al.* **Increase in intranuclear nuclear factor B and decrease in inhibitor B in mononuclear cells after a mixed meal: evidence for a proinflammatory effect 1-3**. [S. l.: s. n.], 2004.

ALLENSPACH, Martina; STEUER, Christian. α -Pinene: A never-ending story. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 190, p. 112857, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112857>.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais DSM-5-TR**. 5-TR. ed. Porto Alegre: Artmed, 2023.

ARACIL-FERNÁNDEZ, Auxiliadora *et al.* Decreased cocaine motor sensitization and self-administration in mice overexpressing cannabinoid CB2receptors. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 37, n. 7, p. 1749–1763, 2012.

ARGUETA, Donovan A; DIPATRIZIO, Nicholas V. Physiology & Behavior Peripheral endocannabinoid signaling controls hyperphagia in western diet-induced obesity. **Physiology & Behavior**, [s. l.], v. 171, p. 32–39, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.12.044>.

ARNOLD, Steven E. *et al.* High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 67, p. 79–87, 2014.

ATWOOD, Brady K.; MACKIE, Ken. CB 2: A cannabinoid receptor with an identity crisis. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 160, n. 3, p. 467–479, 2010.

AYABE, Tatsuhiro *et al.* Iso- α -acids, bitter components of beer, prevent obesity-induced cognitive decline. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-23213-9>.

BAGDADE, J. D.; BIERMAN, E. L.; PORTE, D. The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 46, n. 10, p. 1549–1557, 1967.

BARAKAT, Beatriz; ALMEIDA, Martha E F. Biochemical and immunological changes in obesity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 708, n. May, p. 108951, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108951>.

BARBOSA, Lucas Antônio *et al.* β -caryophyllene, a cannabinoid receptor 2 agonist, decreases the motivational salience and conditioning place preference for palatable food in female mice. **Addiction Biology**, [s. l.], n. October 2022, p. 1–12, 2023.

BATSIIS, John A.; VILLAREAL, Dennis T. Sarcopenic obesity in older adults: aetiology, epidemiology and treatment strategies. **Nature Reviews Endocrinology**, [s. l.], v. 14, n. 9, p. 513–537, 2018.

BELLOCCHIO, Luigi *et al.* Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 281–283, 2010.

BELLOCCHIO, L. *et al.* Cannabinoid type 1 receptor: Another arrow in the adipocytes' bow. **Journal of Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 20, n. SUPPL. 1, p. 130–138, 2008.

BERGE, Kjetil *et al.* Chronic treatment with krill powder reduces plasma triglyceride and anandamide levels in mildly obese men. **Lipids in health and disease**, [s. l.], p. 1–8, 2013.

BERGER, Alvin *et al.* Anandamide and diet: Inclusion of dietary arachidonate and docosahexaenoate leads to increased brain levels of the corresponding N-acylethanolamines in piglets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], p. 18–22, 2001.

BERRIDGE, Kent C.; ROBINSON, Terry E.; ALDRIDGE, J. Wayne. Dissecting components of reward: “liking”, “wanting”, and learning. **Current Opinion in Pharmacology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 65–73, 2009.

BERTHOUD, Hans Rudolf; MÜNZBERG, Heike; MORRISON, Christopher D. Blaming the Brain for Obesity: Integration of Hedonic and Homeostatic Mechanisms. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 152, n. 7, p. 1728–1738, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2016.12.050>.

BLÜHER, Matthias. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 288–298, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>.

BRAGA, Sara Pereira *et al.* Switching from high-fat feeding (HFD) to regular diet improves metabolic and behavioral impairments in middle-aged female mice. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 398, n. July 2020, p. 112969, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112969>.

BRASIL. **VIGITEL BRASIL 2021**. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/vigitel/vigitel-brasil-2021-estimativas-sobre-frequencia-e-distribuicao-sociodemografica-de-fatores-de-risco-e-protecao-para-doencas-cronicas%0A>.

BROWNLEY, Kimberly A. *et al.* Binge-Eating Disorder in Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 176, n. 1, p. 139–148, 2017.

BUETTNER, Roland; SCHÖLMERICH, Jürgen; BOLLHEIMER, L. Cornelius. High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 798–808, 2007.

BULIK, Cynthia M. *et al.* Genetics and neurobiology of eating disorders. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 543–554, 2022.

CANSECO-ALBA, Ana *et al.* Behavioral effects of psychostimulants in mutant mice with cell- type specific deletion of CB2 cannabinoid receptors in dopamine neurons. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 360, p. 286–297, 2019.

COMMONS, Kathryn G. *et al.* The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. **ACS Chemical Neuroscience**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 955–960, 2017.

COTA, D. *et al.* Endogenous cannabinoid system as a modulator of food intake. **International Journal of Obesity**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 289–301, 2003.

COWLEY, Michael A *et al.* Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. **Nature**, [s. l.], v. 411, n. May, 2001.

COWLEY, Michael A. *et al.* The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis.

Neuron, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 649–661, 2003.

CRYAN, John F.; HOLMES, Andrew. Model organisms: The ascent of mouse: Advances in modelling human depression and anxiety. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 4, n. 9, p. 775–790, 2005.

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 47, n. W1, p. W357–W3664, 2019.

DAWES, Aaron J. *et al.* Mental health conditions among patients seeking and undergoing bariatric surgery a meta-analysis. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 315, n. 2, p. 150–163, 2016.

DE FELICE, Fernanda G.; GONÇALVES, Rafaella A.; FERREIRA, Sergio T. Impaired insulin signalling and allostatic load in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 215–230, 2022.

DE SOUZA, Cláudio T. *et al.* Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, [s. l.], v. 146, n. 10, p. 4192–4199, 2005.

DE SOUZA, Letícia *et al.* Impact of different fructose concentrations on metabolic and behavioral parameters of male and female mice. **Physiology and Behavior**, [s. l.], v. 228, n. September 2020, p. 113187, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113187>.

DEBLER, Roanna A. *et al.* Selective aryl hydrocarbon receptor modulators can act as antidepressants in obese female mice. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 333, p. 409–419, 2023.

DEGEN, Lukas *et al.* Effect of peptide YY3-36 on food intake in humans. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 129, n. 5, p. 1430–1436, 2005.

DESPRÉS, Jean-Pierre; GOLAY, Alain; SJÖSTRÖM, Lars. Effects of Rimonabant on Metabolic Risk Factors in Overweight Patients with Dyslipidemia. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 353, n. 20, p. 2121–2134, 2005.

DI MARZO, Vincenzo *et al.* Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. **Nature**, [s. l.], v. 410, n. 6830, p. 822–825, 2001.

DI MARZO, Vincenzo; DESPRÉS, Jean Pierre. CB1 antagonists for obesity: what lessons have we learned from rimonabant?. **Nature Reviews Endocrinology**, [s. l.], v. 5, n. 11, p. 633–638, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2009.197>.

DI MARZO, V.; LIGRESTI, A.; CRISTINO, L. The endocannabinoid system as a link between homeostatic and hedonic pathways involved in energy balance regulation. **International Journal of Obesity**, [s. l.], v. 33, n. S2, p. S18–S24, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2009.67>.

DONNELLY, Brooke *et al.* Neuroimaging in bulimia nervosa and binge eating disorder: A systematic review. **Journal of Eating Disorders**, [s. l.], v. 6, n. 1, 2018.

DRUCKER, Daniel J. The biology of incretin hormones. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 153–165, 2006.

ELLIES, Lesley G; JOHNSON, Andrew; OLEFSKY, Jerrold M. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. [s. l.], 2013.

ESCANDÓN-RIVERA, Sonia *et al.* Anti-hyperglycemic activity of major compounds from *Calea ternifolia*. **Molecules**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 1–13, 2017.

ESCHER, Pascal; WAHLI, Walter. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. **Mutation Research**, [s. l.], 2000.

FALUDI, AA *et al.* Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose - 2017. **Arq Bras Cardiol**, [s. l.], v. 109, n. 2(Sulp. 1), p.

1–76, 2017.

FERNANDES, Elizabeth S. *et al.* Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 569, n. 3, p. 228–236, 2007.

FIGLEWICZ, D P *et al.* Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area / substantia nigra (VTA / SN) of the rat. **Brain Research**, [s. l.], v. 964, p. 107–115, 2003.

FIGLEWICZ, Dianne P *et al.* Intraventricular insulin and leptin decrease sucrose self-administration in rats. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 89, p. 611–616, 2006.

GAO, Xiang *et al.* Lycopene prevents non-alcoholic fatty liver disease through regulating hepatic NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway and intestinal microbiota in mice fed with high-fat and high-fructose diet. **Frontiers in Nutrition**, [s. l.], v. 10, 2023.

GARY-BOBO, Magali *et al.* The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant (SR141716) inhibits cell proliferation and increases markers of adipocyte maturation in cultured mouse 3T3 F442A preadipocytes. **Molecular Pharmacology**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 471–478, 2006.

GATTA-CHERIFI, B.; COTA, D. New insights on the role of the endocannabinoid system in the regulation of energy balance. **International Journal of Obesity**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 210–219, 2016.

GIEL, Katrin E. *et al.* Binge eating disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2022.

GINTING, Rehna Paula; LEE, Ji-Min; LEE, Min-Woo. The Influence of Ambient Temperature on Adipose Tissue Homeostasis, Metabolic Diseases and Cancers. **Cells**, [s. l.], v. 12, n. 881, 2023.

GLASS, M.; DRAGUNOW, M.; FAULL, R. L.M. Cannabinoid receptors in the human brain: A detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. **Neuroscience**, [s. l.], v. 77, n. 2, p. 299–318, 1997.

GODOY-MATOS, Amélio F. de *et al.* O Sistema Endocanabinóide: Novo Paradigma no Tratamento da Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [s. l.], v. 50, p. 390–399, 2006.

GONG, Jian-ping *et al.* Cannabinoid CB2 receptors : Immunohistochemical localization in rat brain. **Brain Research**, [s. l.], v. 71, p. 10–23, 2006.

GREGOR, Margaret F.; HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annual Review of Immunology**, [s. l.], v. 29, p. 415–445, 2011.

GUO, Ai *et al.* FGF19 protects skeletal muscle against obesity-induced muscle atrophy, metabolic derangement and abnormal irisin levels via the AMPK/SIRT-1/PGC- α pathway. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 25, n. 7, p. 3585–3600, 2021.

HALAAS, Jeffrey L. *et al.* Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 94, n. 16, p. 8878–8883, 1997.

HASHIESH, Hebaallah Mamdouh *et al.* Therapeutic potential of β -caryophyllene: A dietary cannabinoid in diabetes and associated complications. **Nutrients**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 1–30, 2020.

HOMMEL, Jonathan D *et al.* Leptin Receptor Signaling in Midbrain Dopamine Neurons Regulates Feeding. **Neuron**, [s. l.], p. 801–810, 2006.

HONG, So Hyeon; CHOI, Kyung Mook. **Sarcopenic obesity, insulin resistance, and their implications in cardiovascular and metabolic consequences**. [s. l.]: MDPI AG, 2020.

HORN, Henrike *et al.* Endocannabinoids in Body Weight Control. **Pharmaceuticals**, [s. l.], 2018.

HUGHES, Robert N. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 28, p. 497–505, 2004.

ISINGRINI, Elsa *et al.* Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: A model of fluoxetine resistance in mice. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 5, n. 4, 2010.

JEONG, Oeuk; KIM, Hyun Sook. Dietary chokeberry and dried jujube fruit attenuates high-fat and high-fructose diet-induced dyslipidemia and insulin resistance via activation of the IRS-1/PI3K/Akt pathway in C57BL/6 J mice. **Nutrition and Metabolism**, [s. l.], v. 16, n. 1, 2019.

JERLHAG, Elisabet *et al.* Ghrelin administration into tegmental areas stimulates locomotor activity and increases extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens. **Addiction Biology**, [s. l.], p. 6–16, 2006.

JERLHAG, Elisabet. Systemic administration of ghrelin induces conditioned place preference and stimulates accumbal dopamine. **Addiction Biology**, [s. l.], p. 358–363, 2008.

JIN, Xin *et al.* Pathophysiology of obesity and its associated diseases. **Acta Pharmacologica Sinica**, [s. l.], v. 13, n. 6, 2023.

JO, Young Hwan *et al.* Integration of endocannabinoid and leptin signaling in an appetite-related neural circuit. **Neuron**, [s. l.], v. 48, n. 6, p. 1055–1066, 2005.

JONES, Carissa P; BOYD, Kelli L; WALLACE, Jeanne M. Evaluation of Mice Undergoing Serial Oral Gavage While Awake or Anesthetized. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, [s. l.], v. 55, n. 6, p. 805–810, 2016.

KIM, Sunghwan *et al.* PubChem substance and compound databases. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, n. D1, p. D1202–D1213, 2016.

KING, S J *et al.* Hormones and Behavior Motivation to obtain preferred foods is enhanced by ghrelin in the ventral tegmental area. **Hormones and Behavior**, [s. l.], v. 60, n. 5, p. 572–580, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.08.006>.

KLEINERT, Maximilian *et al.* Animal models of obesity and diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 140–162, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2017.161>.

KOLA, Blerina *et al.* The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 3, n. 3, 2008.

KONSTANTAKOPOULOS, George. Psychobiology of feeding behaviour. **Dialogues in Clinical Neuroscience & Mental Health Index**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 9–15, 2018.

L. ARTHUR CAMPFIELD, FRANÇOISE J. SMITH, YVES GUISEZ, RENE DEVOS, Paul Burn. Recombinant Mouse OB Protein: Evidence for a Peripheral Signal Linking Adiposity and Central Neural Networks. **Proc. Physiol. Soc**, [s. l.], v. 269, p. 546–549, 1995. Disponível em: www.sciencemag.org.

LAM, Tony K.T. Neuronal regulation of homeostasis by nutrient sensing. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 392–395, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nm0410-392>.

LANGIN, Dominique. Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics. **Nature Reviews Endocrinology**, [s. l.], v. 17, n. May, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41574-021-00471-8>.

LEE, Gwo Hwa *et al.* **Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice**. [S. l.: s. n.], 1996.

LEE, Sang Rok *et al.* Effects of chronic high-fat feeding on skeletal muscle mass and function in middle-aged mice. **Ageing Clinical and Experimental Research**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 403–411, 2015.

LEE, Phong Ching; DIXON, John B. Food for Thought: Reward Mechanisms and Hedonic Overeating in Obesity. **Current obesity reports**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 353–361, 2017.

LI, Guanya *et al.* Brain functional and structural magnetic resonance imaging of obesity and weight loss interventions. **Molecular Psychiatry**, [s. l.], n. August 2022, 2023.

LI, Jinglei *et al.* High fat diet induced obesity model using four strains of mice: kunming, c57bl/6, balb/c and icr. **Experimental Animals**, [s. l.], v. 69, n. 3, p. 326–335, 2020.

LIANG, Huijing *et al.* A high-fat diet and high-fat and high-cholesterol diet may affect glucose and lipid metabolism differentially through gut microbiota in mice. **Experimental Animals**, [s. l.], v. 70, n. 1, p. 73–83, 2021.

LIU, Qing-rong *et al.* Cannabinoid type 2 receptors in dopamine neurons inhibits psychomotor behaviors, alters anxiety, depression and alcohol preference. **Scientific Reports**, [s. l.], n. November, p. 1–17, 2017.

LIU, Ting *et al.* **NF- κ B signaling in inflammation**. [S. l.]: Springer Nature, 2017.

LOUIS-GRAY, Kathleen; TUPAL, Srinivasan; PREMKUMAR, Louis S. TRPV1: A Common Denominator Mediating Antinociceptive and Antiemetic Effects of Cannabinoids. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], p. 1–15, 2022.

LUPPINO, Floriana S. *et al.* Overweight, Obesity, and Depression. **Arch Gen Psychiatry**, [s. l.], v. 67, n. 3, p. 220–229, 2010.

MA, Zegang *et al.* Mechanisms of cannabinoid CB 2 receptor-mediated reduction of dopamine neuronal excitability in mouse ventral tegmental area. **EBioMedicine**, [s. l.], v. 42, p. 225–237, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.040>.

MACHADO, Keylla da Conceição *et al.* A systematic review on the neuroprotective perspectives of beta-caryophyllene. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 32, n. 12, p. 2376–2388, 2018.

MACHADO, Adriano Emanuel. **Intervenções metabólicas sobre o comportamento e cognição: efeitos de dietas hiperlipídicas e fármacos da classe estatina em processos comportamentais e na memória de roedores**. 2022. 1–129 f. - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

MALDONADO, Rafael; VALVERDE, Olga; BERRENDERO, Fernando. Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. **TRENDS in Neurosciences**, [s. l.], v. 29, n. 4, 2006.

MALIK, Vasanti S. *et al.* Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: A meta-analysis. **Diabetes Care**, [s. l.], v. 33, n. 11, p. 2477–2483, 2010.

MANI, Vadivel *et al.* Effect of β -Caryophyllene on insulin resistance in skeletal muscle of high fat diet and fructose-induced type-2 diabetic rats. **Bioinformation**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 741–747, 2021.

MARTIM, Jessica K.P.; MARANHO, Leila T.; COSTA-CASAGRANDE, Thais A. Review: Role of the chemical compounds present in the essential oil and in the extract of *Cordia verbenacea* DC as an anti-inflammatory, antimicrobial and healing product. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 265, n. July 2020, p. 113300, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113300>.

MAURICE, James; MANOUSOU, Pinelopi. **Non-alcoholic fatty liver disease** **CME GASTROENTEROLOGY**. [S. l.: s. n.], 2018.

MAZON, Janaína Niero *et al.* The impact of obesity on neurodegenerative diseases. **Life Sciences**, [s. l.], v. 182, p. 22–28, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2017.06.002>.

MORAES, Juliana C. *et al.* High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 4, n. 4, 2009.

MORRISON, Shaun F. Central neural control of thermoregulation and brown adipose tissue. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, [s. l.], v. 196, p. 14–24, 2016.

MORTON, Gregory J.; MEEK, Thomas H.; SCHWARTZ, Michael W. Neurobiology of food intake in health and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 367–378, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3745>.

MÜLLER, Timo D. *et al.* Anti-obesity drug discovery: advances and challenges. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 201–223, 2022.

NIEGAWA, Tomomi *et al.* Hypocholesterolemic effect of β caryophyllene in rats fed cholesterol and fat enriched diet. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, [s. l.], v. 62, n. 2, p. 179–186, 2018.

NORA D. VOLKOW, GENE-JACK WANG, DARDO TOMASI, Ruben D. Baler. The Addictive Dimensionality of Obesity. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 73, n. 9, p. 811–818, 2013.

NÚÑEZ, ESTEFANÍA *et al.* Cannabinoid CB 2 Receptors Are Expressed by Perivascular Microglial Cells in the Human Brain. **Synapse**, [s. l.], v. 213, n. May, p. 208–213, 2004.

OMS. **Obesidade e Sobrepeso**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 27 jun. 2022.

ONAIVI, Emmanuel S *et al.* Functional Expression of Brain Neuronal CB2 Cannabinoid Receptors Are Involved in the Effects of Drugs of Abuse and in Depression. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 449, p. 434–449, 2008.

PAGOTTO, Uberto *et al.* The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 73–100, 2006.

PARSONS, Loren H.; HURD, Yasmin L. Endocannabinoid signalling in reward and addiction. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 579–594, 2015.

PASSOS, Giselle F. *et al.* Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 110, n. 2, p. 323–333, 2007.

PECIÑA, Susana; BERRIDGE, Kent C. Hedonic hot spot in nucleus accumbens shell: Where do μ -Opioids cause increased hedonic impact of sweetness?. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 25, n. 50, p. 11777–11786, 2005.

PECKHAM, S C; ENTENMAN, C; CARROLL, Andh W. The Influence of a Hypercaloric Diet on Gross Body and Adipose Tissue Composition in the Rat. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 77, n. 2, p. 187–197, 1962. Disponível em:

<https://academic.oup.com/jn/article-abstract/77/2/187/4775498>.

PIMENTEL, Suzana Peres *et al.* Protective effect of topical *Cordia verbenacea* in a rat periodontitis model: immune-inflammatory, antibacterial and morphometric assays. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], 2012.

PIRONI, Loris *et al.* Fat-induced heal brake in humans: A dose-dependent phenomenon correlated to the plasma levels of peptide YY. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 105, n. 3, p. 733–739, 1993.

POP, Miana Gabriela; CRIVII, Carmen; OPINCARIU, Iulian. Anatomy and Function of the Hypothalamus Chapter. *In: HYPOTHALAMUS IN HEALTH AND DISEASES*. [S. l.: s. n.], 2016. v. 11, p. 13. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>.

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

QUARTA, Davide *et al.* Neurochemistry International Systemic administration of ghrelin increases extracellular dopamine in the shell but not the core subdivision of the nucleus accumbens. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 54, p. 89–94, 2009.

ROBINSON, Terry E.; BERRIDGE, Kent C. Addiction. **Annual Review of Psychology**, [s. l.], v. 54, p. 25–53, 2003.

ROSSI, F. *et al.* Cannabinoid receptor 2 as antiobesity target: Inflammation, fat storage, and browning modulation. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 101, n. 9, p. 3469–3478, 2016.

ROSSI, Francesca *et al.* Role of cannabinoids in obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 9, 2018.

SAELY, Christoph H.; GEIGER, Kathrin; DREXEL, Heinz. Brown versus white adipose tissue: A mini-review. **Gerontology**, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 15–23, 2011.

SAKURAI, Takeshi. The role of orexin in motivated behaviours. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 15, n. November, 2014.

SCANDIFFIO, Rosaria *et al.* Protective effects of (E)- β -caryophyllene (bcp) in chronic inflammation. **Nutrients**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 1–24, 2020.

SCHULTZ, Wolfram. Dopamine signals for reward value and risk: Basic and recent data. **Behavioral and Brain Functions**, [s. l.], v. 6, n. 24, p. 1–9, 2010.

SCHULTZ, Wolfram. Getting formal with dopamine and reward. **Neuron**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 241–263, 2002.

SCHULZ, Tim J.; TSENG, Yu Hua. Brown adipose tissue: Development, metabolism and beyond. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 453, n. 2, p. 167–178, 2013.

SCHWARTZ, Gary J.; ZELTSER, Lori M. Functional organization of neuronal and humoral signals regulating feeding behavior. **Annual Review of Nutrition**, [s. l.], v. 33, p. 1–21, 2013.

SERTIÉ, J. A.A. *et al.* Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: Oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 338–344, 2005.

SMALL, Caroline J *et al.* Gut hormone PYY 3-36 physiologically inhibits food intake. **Nature**, [s. l.], v. 418, n. August, p. 728–730, 2002.

SMITH, Kyle S.; BERRIDGE, Kent C. The ventral pallidum and hedonic reward: Neurochemical maps of sucrose “liking” and food intake. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 25, n. 38, p. 8637–8649, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes**. 2023. [s. l.], 2023. Disponível em: <https://diretriz.diabetes.org.br/>. Acesso

em: 9 nov. 2023.

STEMMER, K *et al.* Thermoneutral housing is a critical factor for immune function and diet-induced obesity in C57BL/6 nude mice. **International Journal of Obesity**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 791–797, 2015.

STERU, Lucien *et al.* The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 85, n. 3, p. 367–370, 1985.

SUN, Yongmei *et al.* A Conditioned Place Preference Protocol for Measuring Incubation of Craving in Rats. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], n. 141, p. 1–7, 2018.

SWEENEY, P. *et al.* HFD-induced energy states-dependent bidirectional control of anxiety levels in mice. **International Journal of Obesity**, [s. l.], v. 41, n. 8, p. 1237–1245, 2017.

TARRAGON, Ernesto; MORENO, Juan José. Role of endocannabinoids on sweet taste perception, food preference, and obesity-related disorders. **Chemical Senses**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 3–16, 2018.

TIAN, Xiao Yu *et al.* Thermoneutral housing accelerates metabolic inflammation to potentiate atherosclerosis but not insulin resistance. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 165–178, 2016.

TOMAZI, Lediane *et al.* A Nonrewarding NMDA Receptor Antagonist Impairs the Acquisition, Consolidation, and Expression of Morphine Conditioned Place Preference in Mice. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 710–721, 2017.

TSAI, Sheng Feng *et al.* High-fat diet induces depression-like phenotype via astrocyte-mediated hyperactivation of ventral hippocampal glutamatergic afferents to the nucleus accumbens. **Molecular Psychiatry**, [s. l.], v. 27, n. 11, p. 4372–4384, 2022.

TSO, Patrick; LIU, Min. Gastrointestinal regulation of food intake. **Principles of Molecular Medicine**, [s. l.], v. 117, n. 1, p. 513–517, 2006.

UDO, Tomoko; GRILLO, Carlos M. Prevalence and Correlates of DSM-5-Defined Eating Disorders in a Nationally Representative Sample of U.S. Adults. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 84, n. 5, p. 345–354, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.03.014>.

ULLAH, Hammad *et al.* Improvement of oxidative stress and mitochondrial dysfunction by β -caryophyllene: A focus on the nervous system. **Antioxidants**, [s. l.], v. 10, n. 4, 2021.

VAN GAAL, Luc F. *et al.* Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-Year experience from the RIO-Europe study. **Lancet**, [s. l.], v. 365, n. 9468, p. 1389–1397, 2005.

VELOSO, Izolene Corrêa *et al.* A selanylimidazopyridine (3-SePh-IP) reverses the prodepressant and anxiogenic-like effects of a high-fat/high-fructose diet in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 73, n. 5, p. 673–681, 2021.

VERTY, A. N.A. *et al.* Anti-obesity effect of the CB2 receptor agonist JWH-015 in diet-induced obese mice. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 1–19, 2015.

VLACHOU, S.; PANAGIS, G. Regulation of Brain Reward by the Endocannabinoid System: A Critical Review of Behavioral Studies in Animals. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 20, n. 13, p. 2072–2088, 2014.

WANG, Jia *et al.* Lycopene attenuates western-diet-induced cognitive deficits via improving glycolipid metabolism dysfunction and inflammatory responses in gut–liver–brain axis. **International Journal of Obesity**, [s. l.], v. 43, n. 9, p. 1735–1746, 2019.

WANG, X. *et al.* Preferential limbic expression of the cannabinoid receptor mRNA in the human fetal brain. **Neuroscience**, [s. l.], v. 118, n. 3, p. 681–694, 2003.

WATANABE, S; DOSHI, M; HAMAZAKI, T. n-3 Polyunsaturated fatty acid (PUFA) deficiency elevates and n-3 PUFA enrichment reduces brain 2-arachidonoylglycerol level in mice. [s. l.], v. 69, p. 51–59, 2003.

WEST, D. B.; FEY, D.; WOODS, S. C. Cholecystokinin persistently suppresses meal size but not food intake in free-feeding rats. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 776–787, 1984.

WILSON, R. I.; NICOLL, R. A. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. **Nature**, [s. l.], v. 410, n. 6828, p. 588–592, 2001.

WORLD OBESITY FEDERATION. **World Obesity Atlas 2023**. [S. l.: s. n.], 2023. Disponível em: https://www.worldobesityday.org/assets/downloads/World_Obesity_Atlas_2022_WEB.pdf.

WU, Chunyan *et al.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters proliferator-activated receptor- α Fold induction. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.], v. 24, n. 14, p. 3168–3174, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.04.112>.

XI, Zheng-xiong *et al.* Brain Cannabinoid CB2 Receptors Modulate Cocaine's Actions in Mice. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 14, n. 9, p. 1160–1166, 2012.

XIONG, Guoli *et al.* ADMETlab 2.0: An integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 49, n. W1, p. W5–W14, 2021.

YANG, Yingkai *et al.* Executive function performance in obesity and overweight individuals: A meta-analysis and review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 84, n. 2, p. 225–244, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.11.020>.

YOUSSEF, Dareen A.; EL-FAYOUMI, Hassan M.; MAHMOUD, Mona F. Beta-caryophyllene alleviates diet-induced neurobehavioral changes in rats: The role of CB2 and PPAR- γ receptors. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 110, n. October 2018, p. 145–154, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.039>.

YOUSSEF, Dareen A.; EL-FAYOUMI, Hassan M.; MAHMOUD, Mona F. Beta-caryophyllene protects against diet-induced dyslipidemia and vascular inflammation in rats: Involvement of CB2 and PPAR- γ receptors. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 297, n. September 2018, p. 16–24, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.10.010>.

YU, Yang *et al.* Gut hormones, adipokines, and pro- and anti-inflammatory cytokines/ markers in loss of control eating: A scoping review. **Appetite**, [s. l.], v. 166, n. June 2020, 2021.

ZEMDEGS, Juliane *et al.* Themed Section: Updating Neuropathology and Neuropharmacology of Monoaminergic Systems High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice LINKED ARTICLES. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 173, p. 2095, 2016. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.v173.13/www.brjpharmacol.org>.

ZHANG, Hai Ying *et al.* Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 111, n. 46, p. E5007–E5015, 2014.

ZHANG, Hai Ying *et al.* Expression of functional cannabinoid CB2 receptor in VTA dopamine neurons in rats. **Addiction Biology**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 752–765,

2017.

ZHANG, Yiyi *et al.* **Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.** [S. l.: s. n.], 1994.

ZHANG, Hai Ying *et al.* Species differences in cannabinoid receptor 2 and receptor responses to cocaine self-administration in mice and rats. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 1037–1051, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2014.297>.

ZIAUDDEEN, Hisham; FAROOQI, I. Sadaf; FLETCHER, Paul C. Obesity and the brain: How convincing is the addiction model?. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 279–286, 2012.

ANEXO A – APROVAÇÃO CEUA



Universidade Federal de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos da administração de óleo essencial de Cordia verbenacea sobre a saliência motivacional induzida por alimento palatável e sobre as alterações metabólicas, comportamentais e neuroquímicas induzidas por consumo crônico de dieta hiperlipídica e frutose em camundongos.", protocolada sob o CEUA nº 6555200323 (ID 002396), sob a responsabilidade de **Eduardo Luiz Gasnhar Moreira e equipe; Talissa Dezanetti** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 09/05/2023.

We certify that the proposal "The effects of Cordia verbenacea essential oil administration on motivational salience induced by palat.a.b.l.e food and on the metabolic, behavioral and neurochemical changes induced by chronic consumption of a high-fat diet and fructose in mice.", utilizing 50 Heterogenics mice (50 females), 40 Isogenics mice (males and females), protocol number CEUA 6555200323 (ID 002396), under the responsibility of **Eduardo Luiz Gasnhar Moreira and team; Talissa Dezanetti** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 05/09/2023.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 05/2023 a 05/2025 Área: Ciências Fisiológicas

Origem:	Biotério Central	sexo:	Fêmeas	idade:	2 a 4 meses	Quantidade:	50
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	20 a 50 g		
Linhagem:	Swiss						

Origem:	CCB - Biotério Multiusuário de Roedores para Estudos na Área de Neuroquímica						
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	2 a 4 meses	Quantidade:	40
Linhagem:	C57BI 6			Peso:	20 a 35 g		

Florianópolis, 03 de janeiro de 2024

Luciana Aparecida Honorato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Vanessa Rafaella Foletto da Silva
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina