

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**PERFIL NOCICEPTIVO E INFLAMATÓRIO DE
RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA
HIPERCALÓRICA**

ANA LAURA OLIVEIRA CARVALHO

Alfenas – MG

2012

ANA LAURA OLIVEIRA CARVALHO

**PERFIL NOCICEPTIVO E INFLAMATÓRIO DE
RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA
HIPERCALÓRICA**

Dissertação apresentada no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, no Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Alfenas, como requisito para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Giovani de Oliveira Nascimento

Alfenas – MG

2012

DEDICATÓRIA

A minha querida filha Flávia Carvalho Trigo e ao meu marido Conrado de Ávila Silva, pelo apoio, compreensão e paciência.

A minha querida mãe Maria Helena de Oliveira Carvalho, pela minha vida e pelo apoio incondicional nos momentos difíceis.

“Não há fatos eternos, como não há
verdades absolutas”

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A minha filha Flávia Carvalho Trigo e meu marido Conrado de Ávila Silva, pelo apoio e paciência em todos os momentos.

À toda minha família, meus irmãos, cunhados e sogros por sempre acreditarem no meu trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Giovani de Oliveira Nascimento, pelo incentivo e apoio durante o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva, pelo profissionalismo e dedicação durante a realização de meu trabalho.

À Prof^a. Dr^a Luciana Azevedo e seus alunos de graduação, do Laboratório de Nutrição da Universidade Federal de Alfenas, pelo apoio na preparação da ração hipercalórica.

À Prof^a. Dr^a Amanda Latércia Tranches Dias por ter me recebido em seu laboratório e me auxiliado nas dosagens sanguíneas.

Aos meus colegas do Instituto de Ciências Biológicas que, de maneira direta ou indireta, participaram deste trabalho e tornaram possível a elaboração desta pesquisa.

A Marina e José pelo excelente apoio técnico.

Aos animais, que foram imprescindíveis à realização desta pesquisa.

À UNIFAL, por incentivar e proporcionar meu aperfeiçoamento profissional.

À CAPES e à FAPEMIG pelo suporte disponibilizado em forma de bolsa auxílio.

RESUMO

Embora a obesidade possa levar a mudanças no limiar de dor, o mecanismo pelo qual isto ocorre não é bem compreendido. Com as recentes descobertas das propriedades do tecido adiposo branco de secretar substâncias com relevantes efeitos biológicos, seu papel endócrino assumiu grande importância. A ocorrência e a magnitude da dor e do quadro inflamatório podem estar relacionadas a mudanças endócrinas causadas pela obesidade, entre as quais se destacam as alterações nos níveis de citocinas inflamatórias, leptina, grelina e opióides endógenos, entre outros. Por esta razão, o objetivo deste estudo foi avaliar, através de testes de nocicepção aguda, como Placa Quente, Retirada de Cauda, teste *Von Frey* eletrônico e avaliação do Edema de Pata por Pletismometria, as diferenças no limiar nociceptivo e perfil inflamatório, entre os animais que tiveram obesidade induzida por dieta hipercalórica (grupo HD) e os animais alimentados com dieta padrão (grupo CD) a partir da quarta semana de vida, durante 16 semanas. Além destes, foram realizados também testes de comportamento, como Labirinto em Cruz Elevado e teste de Campo Aberto, para avaliação de ansiedade e movimentações no aparato, entre os grupos. Parâmetros metabólicos, como Índice de Lee, glicemia de jejum, triglicerídeos e proteínas séricas foram avaliados e as gorduras perigonadal e retroperitoneal foram excisadas e pesadas para caracterização da obesidade experimental, em ambos os grupos. Nossos resultados demonstram que os parâmetros metabólicos e o peso das gorduras perigonadal e retroperitoneal foram maiores no grupo HD que no grupo CD, mostrando que a dieta hipercalórica foi efetiva em induzir obesidade no grupo HD. Nos testes de nocicepção aguda, a Retirada de Cauda não mostrou diferença entre os grupos, enquanto que, no teste de Placa Quente, o grupo HD mostrou menor período de latência em segundos para reação que o grupo CD, após aplicação intraplantar de carragenina em comparação ao grupo controle (salina). Também foi demonstrado que os animais do grupo HD tiveram maior hipernocicepção mecânica e maior edema de pata, após aplicação carragenina. Na avaliação dos testes de comportamento não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Os experimentos foram desenvolvidos no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alfenas.

Palavras chaves: nocicepção, inflamação, obesidade, dieta hipercalórica.

ABSTRACT

Although obesity can lead to changes in pain threshold, the mechanism by which this occurs is not well understood. With the recent discoveries of the properties of white adipose tissue to secrete substances with important biological effects, endocrine role has assumed greater importance. The occurrence and magnitude of pain and inflammation may be related to endocrine changes caused by obesity, among which we highlight the changes in the levels of inflammatory cytokines, leptin, ghrelin and endogenous opioids, among others. For this reason, the objective of this study was to evaluate, through tests of acute nociception, such as Hot Plate, Tail Withdrawal, electronic *Von Frey* test and evaluation of Paw Edema by Pletismometry, differences in nociceptive threshold and inflammatory profile, between animals that had high-calorie diet-induced obesity (HD group) and animals fed a standard diet (CD) from the fourth week of life, for 16 weeks. In addition, behavioral tests were also performed, such as Elevated Plus Maze and Open Field test to evaluate anxiety and movement in the apparatus, between the groups. Metabolic parameters, such as Lee Index, fasting glucose, triglycerides and serum proteins were evaluated and perigonadal and retroperitoneal fat were excised and weighed to the characterization of experimental obesity in both groups. Our results demonstrate that metabolic parameters and weight of perigonadal and retroperitoneal fat were higher in HD than in group CD, showing that high calorie diet was effective in inducing obesity in the HD group. In tests of acute nociception, the Tail Withdrawal showed no difference between groups, while in the Hot Plate test, the HD group showed a shorter latency period in seconds for the CD group reaction after application intraplantar carrageenan compared the control group (saline). It was also shown that animals of the HD group had a greater mechanical hypernociception and a greater paw edema after carrageenan application. In the assessment of behavioral tests were not significant differences between groups. The experiments were conducted at the Institute of Biological Sciences, Federal University of Alfenas.

Keywords: nociception, inflammation, obesity, high calorie diet.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS UTILIZADAS:

% - Porcentagem

BA – Braço aberto

BF – Braço fechado

CA – Campo aberto

CD – Dieta padrão

Cg – Carragenina

CINC - Citocina indutora de quimioatração em neutrófilo

CRH - Hormônio liberador de corticotrofina

COX – Ciclooxigenase

DAINEs – Drogas anti-inflamatórias não esteroidais

DIO – Obesidade induzida por dieta

EM - Eminência média

EP – Edema de pata

G - Grama

GH – Hormônio do crescimento

GHS – R - Receptor secretagogo de hormônio do crescimento

HD – Dieta hipercalórica

HPA – Hipotálamo-hipófise-adrenal

IFN – *Interferon*

IL - Interleucina

IL-1ra - Antagonista do receptor IL-1

IMC – Índice de massa corporal

I.Pl. – Intra-plantar

KC - Quimiocina derivada de queratinócitos

Kcal - Quilocaloria

LCE – Labirinto em cruz elevado

LPS – Lipopolissacarídeo bacteriano

MSH – Hormônio estimulador de melanócitos

NK – *Natural killer*

PQ – Placa quente

RC – Retirada de cauda

SAL – Solução salina estéril

SHRs – Ratos espontaneamente hipertensos

TAB – Tecido adiposo branco

TAM – Tecido adiposo marrom

TGF – Fator transformador de crescimento

Th - *T helper*

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

SNC – Sistema nervoso central

VF – *Von frey*

WKYs – Ratos *Wistar-Kyoto*

μg – Micro grama

μl – Micro litro

LISTA DE FIGURAS E QUADROS:

Quadro 1: Quantidade de calorias (Kcal/100g) e composição centesimal da dieta padrão (CD) e da dieta hipercalórica (HD)	38
Figura 1: Ganho de peso corporal em gramas, nos animais dos grupos HD e CD, da 4 ^a até a 20 ^a semana de dieta.....	39
Figura 2: Ingestão alimentar em gramas da ração hipercalórica comparada à ração padrão, avaliada por 24 h, quinzenalmente, iniciando-se na 4 ^a até a 20 ^a semana de dieta, nos animais dos grupos HD e CD.....	40
Quadro 2: Índice de Lee, glicemia de jejum, triglicerídeos e proteínas plasmáticas nos animais dos grupos HD e CD, após 16 semanas de dieta.....	40
Figura 3: Índice de Lee nos animais dos grupos HD e CD.....	41
Figura 4: Peso em gramas das gorduras perigonadal e retroperitoneal, nos grupos CD e HD, após 16 semanas de dieta.....	42
Figura 5a: Porcentagem de entrada nos braços fechados do Labirinto em Cruz Elevado nos grupos HD e CD.....	42
Figura 5b: Porcentagem de entrada nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado nos grupos HD e CD.....	43
Figura 5c: Número total de entradas nos braços fechados e braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado nos grupos HD e CD.....	43
Figura 5d: Tempo gasto nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado nos grupos HD e CD.....	43
Figura 6a: Número de <i>crossings</i> na periferia do Campo Aberto dos animais dos grupos HD e CD.....	44

Figura 6b: Número de <i>crossings</i> no centro do Campo Aberto dos animais dos grupos HD e CD.....	44
Figura 6c: Número total de <i>crossings</i> no Campo Aberto dos animais dos grupos HD e CD.....	45
Figura 6d: Efeito antitigmotático no Campo Aberto dos animais dos grupos HD e CD.....	45
Figura 6e: Número de <i>rearings</i> no Campo aberto dos animais dos grupos HD e CD...45	
Figura 7a: Latência em segundos para retirada da cauda dos animais dos grupos HD e CD.....	46
Figura 7b: Limiar térmico em °C para retirada da cauda dos animais dos grupos HD e CD.....	46
Figura 8: Latência em segundos, para reação na Placa Quente, dos animais dos grupos HD e CD	47
Figura 9a: Intensidade de hipernocicepção nos animais dos grupos HD e CD após 1 e 3 hs da aplicação I.Pl de Cg ou salina.....	48
Figura 9b: Intensidade de hipernocicepção 1 h após aplicação I.Pl. de Cg ou veículo, nos animais dos grupos HD e CD.....	49
Figura 9c: Intensidade de hipernocicepção 3 hs após aplicação I.Pl. de Cg ou veículo, nos animais dos grupos HD e CD.....	49
Figura 10a: Variação do volume podal 1, 2, 3 e 4 horas após aplicação I. Pl. de Cg nos animais dos grupos HD e CD.....	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Tecido adiposo como órgão endócrino.....	15
1.2	Citocinas.....	17
1.2.1	Conceitos Gerais.....	17
1.2.2	Regulação da produção das citocinas.....	20
1.2.3	Citocinas pró-inflamatórias e dor inflamatória.....	22
1.3	Leptina	24
1.4	Grelina.....	26
1.5	Opióides endógenos.....	27
2	OBJETIVOS.....	29
2.1	Geral.....	29
2.2	Específicos.....	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1	Animais experimentais.....	30
3.2	Indução de obesidade.....	30
3.3	Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	31
3.4	Teste do Campo Aberto.....	32
3.5	Teste de Retirada de Cauda.....	32
3.6	Teste da Placa Quente.....	33
3.7	Teste de <i>Von Frey</i> eletrônico.....	34
3.8	Teste do Edema de Pata.....	35
3.9	Dosagem de glicemia, triglicerídeos e proteínas plasmáticas.....	36
3.10	Excisão e pesagem do tecido adiposo branco.....	36
3.11	Drogas utilizadas.....	36
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5	RESULTADOS.....	38
5.1	Valores nutricionais da dieta hipercalórica e da dieta padrão.....	38
5.2	Peso corporal e ingestão.....	38
5.3	Índice de Lee e parâmetros metabólicos.....	40
5.4	Peso das gorduras perigonadal e retroperitoneal.....	41
5.5	Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	42
5.6	Teste do Campo aberto.....	44
5.7	Teste de Retirada de Cauda.....	46
5.8	Teste da Placa Quente.....	47
5.9	Teste de <i>Von Frey</i> eletrônico.....	48
5.10	Teste do Edema de Pata.....	50
6	DISCUSSÃO.....	51
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Há pouco tempo acreditava-se que o tecido adiposo era um tecido inerte do corpo que tinha basicamente a função de armazenar energia. Estudos recentes, porém, mostram que se trata de um complexo reservatório energético regulado por nervos, hormônios, nutrientes e mecanismos autócrinos e parácrinos. Além disso, o tecido adiposo é considerado um importante órgão endócrino com funções reguladoras no balanço energético e outras funções neuroendócrinas, incluindo produção e secreção de muitos peptídeos e proteínas bioativas. Cada adipócito produz uma pequena quantidade dessas substâncias, porém, como o tecido adiposo é o maior órgão do corpo, o total produzido tem grande repercussão nas funções corporais (Prado et al., 2009).

Entre as substâncias bioativas produzidas pelo tecido adiposo estão as citocinas imunomoduladoras, as quais afetam os sistemas fisiológico e comportamental, incluindo-se também a ingestão alimentar e a termoregulação (Plata-Salamán et al., 1998). As citocinas podem afetar o metabolismo dos sistemas noradrenérgico, serotoninérgico e dopaminérgico (Dunn et al., 2005). Durante a inflamação, são produzidas citocinas pró- e anti-inflamatórias e seu equilíbrio determina a magnitude da resposta inflamatória (Verri et al., 2006). O acúmulo de tecido adiposo por alta ingestão calórica leva à liberação de substâncias bioativas, as quais exercem vários efeitos sobre o metabolismo de glicose, lipídeos e função cardiovascular (Kobayasi et al., 2010).

Portanto, o acúmulo de tecido adiposo ocasiona modificações endócrinas e metabólicas, as quais poderiam levar a alterações no perfil nociceptivo e inflamatório em humanos e animais experimentais submetidos a dietas palatáveis e de alta ingestão calórica.

1.1 Tecido adiposo como órgão endócrino

A obesidade é o problema nutricional de maior crescimento em todo o mundo. Devido à dimensão que esta vem adquirindo nas últimas décadas, tem sido referendada como uma epidemia, não só nas Américas, mas, praticamente, no mundo inteiro. Nossa sociedade vive num ambiente obesigênico que afeta o desequilíbrio ponderal no sentido da obesidade (Castro et al., 2002) e sua prevalência cresce exponencialmente (Fliers et al., 2003; Kershaw et al., 2004) a ponto de constituir uma ameaça crescente em termos de morbidade e mortalidade e também em termos evolutivos, antropomórficos e de sobrevivência na espécie humana e animal. O aumento de sua prevalência faz com que seja considerada um sério problema de saúde pública (Bélanger-Ducharme et al., 2005).

Nos mamíferos, existem dois tipos de tecido adiposo: o branco (TAB) e o marrom (TAM). Na espécie humana, o TAM inicia a sua formação nas últimas semanas de vida intrauterina, persiste algumas semanas ou mais de acordo com a temperatura ambiente e o uso de agasalhos, e tende a atrofiar-se por apoptose quando a temperatura a que o recém-nascido está exposto oscila entre os 25 e 30 °C (Cannow & Nedergaard, 2004). Até o final do século passado, acreditava-se que os depósitos de tecido adiposo eram apenas uma estrutura passiva (Albright et al., 1998). Atualmente, sabe-se que recebe sinais neuroendócrinos, nutrientes, autócrinos e parácrinos e que por sua vez, é um órgão endócrino-metabólico produtor de moléculas que não só regulam o seu metabolismo, atividade e composição, como sinalizam estruturas cerebrais, sobretudo hipotalâmicas, que são determinantes para a regulação da fome, saciedade, a ingestão e o consumo energético e a regulação de muitas estruturas somáticas relacionadas com a produção e regulação metabólica, reprodutora e de sobrevivência (Kershaw et al., 2004).

Embora a relação entre obesidade e o desenvolvimento de doenças como hipertensão e diabetes tipo 2 esteja bem documentada, pouco se conhece sobre a causa

mediando esta associação. Evidências recentes sugerem que uma causa comum de muitas destas condições é a inflamação. Biomarcadores de inflamação, tais como contagem de leucócitos, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e proteína C reativa estão aumentados na obesidade e associados com a resistência à insulina e à predisposição a diabetes tipo 2 e à doença cardiovascular (Lee et al.,2005). Acredita-se que a adiposidade abdominal desempenha um papel fundamental no estado inflamatório crônico que predispõe à hipertensão, diabetes e doença cardiovascular (Björntorp,1997; Couillard et al.,1999).). A obesidade está associada a várias condições médicas, entre as quais estão a hipertensão, diabetes tipo 2 e doença cardiovascular (Hubert et at.,1983; Messerli et al.,1982; Poirier et al.,2006).

Há evidências de sensibilidade barreflexa diminuída em ratos com obesidade induzida por dieta (Bunag et al.,1996; Miller et al.,1999). Dentro deste modelo, a obesidade também produz mudanças no balanço energético, induzindo à adipogênese (Levin,1994) e aumento da circulação de leptina (Carroll et al., 2006), angiotensina II (Boustany et al.,2004), e insulina (Levin et al., 1997). A obesidade pode também ativar o sistema simpático, aumentando o consumo de oxigênio (Himms-Hagen et al.,1981; Himms-Hagen, 1984) e a mobilização de ácidos graxos livres do TAB (Park et al.,2000). A perda da sensibilidade barreflexa em ratos obesos pode induzir respostas metabólicas que são dependentes da regulação cardiovascular (Lima et al.,2008).

Com as recentes descobertas das propriedades do TAB de secretar substâncias com relevantes efeitos biológicos, seu papel endócrino assumiu grande importância. Com a descoberta de uma ampla gama de proteínas secretadas pelo TAB, denominadas adipocinas, um novo conceito sobre a função biológica deste tecido vem surgindo, consolidando a ideia de este tecido ser não apenas um fornecedor e armazenador de energia, mas sim, um órgão dinâmico, envolvido em vários processos metabólicos e

fisiológicos. A estrutura proteica, assim como a função fisiológica das adipocinas identificadas até o momento é bastante variada e compreende proteínas relacionadas ao sistema imune, como as citocinas clássicas – TNF- α e IL-6, fatores de crescimento (fator transformador de crescimento β – TGF- β) e proteínas da via complemento alternativa (adipsina), entre outras. A expansão do TAB que ocorre na obesidade resulta em aumento no tamanho e número de células adiposas e em uma progressiva infiltração de macrófagos não derivados do TAB (Weisberg et al., 2003). Adipócitos maiores adquirem maior capacidade de produção de citocinas (Le Lay et al., 2001). Alterações nos níveis de adipocinas foram observadas em condições inflamatórias diversas, embora sua função patogênica ainda não tenha sido completamente esclarecida (Fantuzzi, 2005).

Existe uma correlação positiva entre a adiposidade (ou seja, IMC e % de gordura corporal), níveis da proteína IL-6 no soro, bem como os níveis de RNAm do TNF- α e IL-6 no tecido adiposo abdominal (Kern et al., 1995, 2001). Em várias espécies de roedores geneticamente obesos e resistentes à insulina, o tecido adiposo apresenta maior expressão de TNF- α (Borst & Conover, 2005).

O reconhecimento de que o tecido adiposo branco é uma importante fonte de citocinas nos proporciona um forte mecanismo de ligação entre obesidade e função imune (Hotamisligil et al., 1993). Um entendimento melhor da função do tecido adiposo na ativação da via inflamatória e imunológica pode sugerir novos tratamentos e estratégias de prevenção que ajudariam na redução da mortalidade e morbidade associadas à obesidade (Lee et al., 2005).

1.2 Citocinas

1.2.1 Conceitos gerais

As citocinas são hormônios proteicos, produzidos durante as fases efetoras das imunidades natural e específica e servem para mediar e regular respostas imunes e inflamatórias. Elas são produzidas na periferia por uma variedade de células do sistema imunológico, como os monócitos, macrófagos, células T ativadas, células B, células *natural killer* (NK) e fibroblastos (Abbas et al.,2000). São também produzidas por outros tipos celulares, como células musculares lisas, células endoteliais, fibroblastos (Vilcek, 2003), queratinócitos, células musculares cardíacas e glândulas sudoríparas écrinas (Jones et al.,1995) e no SNC por micróglia, astrócitos, células endoteliais vasculares e fibroblastos (Vilcek,2003). Desde a primeira citocina descoberta, os interferons (Isaacs & Lindernmann,1957), um considerável número de citocinas e suas ações foram descritas.

As citocinas pró-inflamatórias, entre elas as IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α e o Interferon-gama (IFN-g), promovem a ativação do processo inflamatório, auxiliando na eliminação de patógenos e na resolução do processo inflamatório. Elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias levam à ativação dos macrófagos, células NK, células T e células B, proliferação de células T e células B, e à proliferação e secreção de imunoglobulinas. Sistemicamente, podem induzir febre e aumentar a síntese de proteínas da fase aguda. Localmente, promovem o recrutamento de células inflamatórias para os sítios da inflamação. As citocinas anti-inflamatórias, entre elas as IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β , reduzem a resposta inflamatória por meio da diminuição das citocinas pró-inflamatórias e da supressão da ativação de monócitos (Abbas et al.,2000).

Algumas citocinas – conhecidas como quimiocinas – são responsáveis pelo recrutamento, ativação e retenção dos leucócitos nos sítios de inflamações locais. As quimiocinas têm importante função no desenvolvimento do estado inflamatório, atuando no recrutamento de glóbulos brancos para o local da inflamação. Outras

funções, como angiogênese, modulação da resposta imune e febre também têm sido atribuídas às quimiocinas (Baggiolini, 2001).

As citocinas podem também ser classificadas pela fonte de produção do linfócito T helper, se produzidas pelos linfócitos T helper 1 (Th-1) ou T helper 2 (Th-2). As citocinas Th-1 são principalmente pró-inflamatórias, enquanto as Th-2 são principalmente anti-inflamatórias. O equilíbrio entre elas é essencial para manter a homeostase sistêmica e seu desequilíbrio (Th1 versus Th2) está envolvido na patogênese de muitas doenças humanas, como alergia e doenças auto-imunes, doenças infecciosas e septicemia. Ademais, evidências recentes também indicam que tais desequilíbrios ocorrem na aterosclerose, obesidade do tipo visceral, síndrome metabólica, distúrbios do sono e depressão maior (Cizza et al.,2001).

A atuação das citocinas se dá sobre muitos tipos celulares diferentes, propriedade conhecida como pleiotropismo, e como outros hormônios polipeptídicos, iniciam sua ação por ligação a receptores específicos na superfície da célula-alvo. A célula-alvo pode ser a mesma célula que secreta a citocina (ação autócrina), uma célula vizinha (ação parácrina) ou, como os hormônios verdadeiros, uma célula distante estimulada por meio de citocinas secretadas na circulação (ação endócrina) (Abbas et al.,2000).

A secreção de citocinas é um evento breve e autolimitado, sendo sua síntese iniciada por nova transcrição genética, não sendo armazenadas como moléculas pré-formadas, sendo rapidamente eliminadas. Após a administração intravenosa, a meia-vida da maioria delas é, geralmente, medida em minutos (Vilcek, 2003).

As citocinas produzidas no sistema periférico podem sinalizar o cérebro por meio de várias rotas, como o transporte ativo e a entrada passiva através de áreas em que a barreira sanguínea esteja enfraquecida ou ausente (órgãos circumventriculares e

plexo coróide). No entanto, como são moléculas pró-hidrofílicas relativamente grandes, este mecanismo não é aceito por alguns autores (Banks et al.,2004). Além disso, podem se ligar aos receptores nas células dos paragânglios próximos ao nervo vago, ativando-o e à região do córtex cerebral onde o vago se projeta, o Núcleo do Trato Solitário, podendo também exercer efeitos nos neurônios produtores de hormônio liberador de corticotrofina (CRH), na eminência média (EM) e podem atuar nas células endoteliais da vasculatura cerebral ou nas células gliais nos órgãos circunventriculares, induzindo a síntese e a liberação de mensageiros secundários que, por sua vez, ativam os neurônios do hipotálamo (Silverman et al., 2005). No sistema nervoso periférico, as citocinas coordenam componentes complexos da resposta imunológica, incluindo as respostas inatas e adaptativas (Abbas et al., 2000).

No cérebro, as citocinas são responsáveis pela ativação neuroendócrina e neuronal. Elas regulam o crescimento e a proliferação das células gliais, modulam a atividade dos peptídeos opióides endógenos e ativam o eixo HPA (Silverman et al.,2005; Sternberg et al.,1989). Além disso, podem afetar o metabolismo dos sistemas noradrenérgico, serotoninérgico e dopaminérgico (Dunn et al.,2005). A ativação de citocinas no SNC produz febre, sonolência e diversas alterações comportamentais associadas a enfermidades, denominadas "comportamento doentio" (Dantzer et al.,2007).

1.2.2 Regulação da produção de citocinas

Múltiplos e diversos estímulos regulam a produção de citocinas. A maioria das citocinas pró-inflamatórias é produzida em resposta a patógenos ou a produtos patogênicos, como lipopolissacarídeos (LPS) derivados das paredes celulares de bactérias Gram negativas, composto por moléculas de polissacarídeos, lipídeos e proteínas (Kluger,1991). O LPS é o modelo experimental mais comumente utilizado

para estudo da inflamação sistêmica e induz respostas vegetativas e comportamentais como febre, anorexia, alterações do sono e redução da interação social (Dantzer,2001; Dantzer e Kelley,2007).

Um agente algogênico frequentemente usado é a Carragenina (Cg), um polissacarídeo extraído de algumas espécies de algas vermelhas, descoberto por um farmacêutico inglês em 1862. Estruturalmente, a Cg é um grupo complexo de polissacarídeos composto por monômeros relacionados a galactose, sendo de três tipos principais: lambda, kappa e iota. A forma lambda dá origem a um gel pouco firme à temperatura ambiente e é capaz de induzir uma resposta inflamatória quando injetado por via subcutânea (Morris, 2003).

Diversos autores confirmam o envolvimento de citocinas e a migração de neutrófilos no processo inflamatório e no desenvolvimento de hipernocicepção mecânica induzida pela aplicação I. Pl. de Cg em camundongos (Cunha et al.,2005) e em ratos (Cunha et al.,2008).

Outros indutores clássicos da produção de citocinas pró-inflamatórias incluem infecções virais, trauma, transplante de órgãos ou tecidos, isquemia e lesão de reperfusão. A produção central de citocinas pode ser desencadeada pelo estresse, exercício físico, isquemia, processos neurovegetativos, auto-imunidade e infecção. É interessante que, enquanto as citocinas periféricas medeiam a resposta inflamatória, as citocinas cerebrais podem ser ativadas na ausência de inflamação local. Portanto, a expressão de citocinas no cérebro não é necessariamente uma indicação de inflamação (Licinio,2003).

Atualmente, é bem aceito que as citocinas constituem uma ligação entre injúria celular ou reconhecimento imunológico e sinais sistêmicos ou locais da inflamação (Blackweel & Christman,1996). A maioria delas apresentam múltiplas funções

biológicas, incluindo diferenciação celular, sobrevivência, crescimento e metabolismo (Aggarwal & Puri, 1995).

1.2.3 Citocinas pró-inflamatórias e dor inflamatória

A dor inflamatória aguda é caracterizada por hipernocicepção devido à sensibilização de neurônios nociceptivos sensoriais primários, referida também como hiperalgesia ou alodinia (Millan,1999). Após injúria tecidual, mediadores específicos são liberados e agem em receptores metabotrópicos na membrana neuronal, disparando a ativação dos segundos mensageiros. As aminas simpáticas e os eucosanóides são os mais importantes mediadores primários responsáveis pela hipernocicepção mecânica em ratos (Khasar et al.,1999). Na última década, foi demonstrado que o estímulo inflamatório não estimula diretamente a liberação de mediadores hipernociceptivos primários, mas que sua liberação é precedida de uma cascata de citocinas (Poole et al.,2009). Experimentos já realizados sugerem que, em ratos, há uma cascata de liberação de citocinas que constitui uma ligação entre a injúria e a liberação de mediadores hipernociceptivos primários. Roedores que receberam carragenina tiveram hipernocicepção mecânica induzida através de uma cascata de citocinas, liberadas por células locais ou migrantes, iniciadas pela liberação de bradicinina (Ferreira et al.,1993). A primeira citocina liberada é TNF- α , a qual dispara a liberação de IL-6, IL-1 β e CINC-1 (citocina indutora de quimioatração em neutrófilo) responsáveis pela estimulação da síntese de prostaglandinas e a liberação de aminas simpáticas (Cunha et al.,1992; Lorenzetti et al.,2002). Estes conceitos permitem-nos compreender a razão de a inibição de uma (IL-1 β ou TNF- α) ou de várias citocinas causarem analgesia (Ferreira et al.,1997; Kanaan et al.,1997; Ribeiro et al.,2000; Sommer & Kress,2004).

Durante a inflamação, são produzidas citocinas pró- e anti-inflamatórias e seu equilíbrio determina a magnitude da resposta inflamatória. A fim de limitar as

consequências deletérias da ação prolongada das citocinas pró-inflamatórias, após a liberação destas, há a liberação de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-10, IL-13 e IL-1ra (antagonista do receptor IL-1). Estas citocinas anti-inflamatórias modulam eventos inflamatórios e imunes, inibindo a produção e a ação de citocinas pró-inflamatórias (Verri et al.,2006).

Entre as principais citocinas envolvidas na dor inflamatória, estão o TNF- α e a IL-1 β . Foi demonstrado que o TNF- α induz hipernocicepção mecânica na pata de ratos, e que este efeito hipernociceptivo foi parcialmente inibido pela indometacina (inibidor COX) e atenolol (receptor β antagonista), e abolido pelo co-tratamento com estas drogas, sugerindo que a hipernocicepção induzida por TNF- α é mediada por prostanóides e aminas simpáticas. Estes dados sugerem que o TNF- α induz hipernocicepção em ratos por duas vias independentes e paralelas: (1) TNF- α – IL-1 β – prostanóides e (2) TNF- α – CINC-1 – aminas simpáticas (Verri et al.,2006).

Foi demonstrado ainda que a IL-1 β está envolvida em várias características da inflamação, como recrutamento de glóbulos brancos, febre, liberação de proteínas de fase aguda e aumento da permeabilidade de vasos sanguíneos (Dinarello,1984). A produção de IL-1 β ocorre em diferentes tipos celulares como macrófagos, monócitos e células da glia, os quais por sua vez induzem a produção de outros mediadores inflamatórios (Dinarello, 1998). A IL-1 β estimula a expressão da COX-2 e a liberação subsequente de seus produtos, prostaglandinas (Zucali et al., 1986; Crofford et al., 1994). Uma vez que as prostaglandinas são capazes de sensibilizar os nociceptores, a IL-1 β pode ser vista como um importante mediador da hipernocicepção inflamatória. De fato, a IL-1 β foi a primeira citocina a demonstrar envolvimento com a nocicepção inflamatória em experimentação animal. Injeções intraplantares de IL-1 β em pequenas doses produzem hipernocicepção mecânica severa e dependente da ação de

prostanóides, já que pode ser bloqueada pelo tratamento prévio com um inibidor da COX (Ferreira et al., 1988). Células dendríticas, macrófagos, linfócitos e mastócitos são componentes teciduais que, após o reconhecimento do estímulo inflamatório, liberam uma cascata de citocinas, as quais exercem função essencial no desenvolvimento da dor inflamatória, bem como em outros eventos inflamatórios. As primeiras citocinas descritas como participantes no desenvolvimento da dor inflamatória e/ou neuropática foram a IL-1 β , TNF- α , IL-6, e as quimiocinas IL-8, CINC-1 e quimiocina derivada de queratinócitos (KC). Recentemente, foi demonstrado que IL-18 e IL-12 também induzem hipernocicepção (Verri et al., 2006).

1.3 Leptina

Uma adipocina que tem chamado atenção em especial é a leptina, um hormônio descoberto em 1994, produto do gene *ob* do camundongo obeso (*ob/ob*) (Zhang et al., 1994). Este camundongo apresenta comportamento e fisiologia de animais em um estado constante de jejum, com níveis séricos de corticosterona elevados, incapazes de se manterem aquecidos, com comprometimento no crescimento, reprodução e alterado limiar de apetite, o que gera a obesidade característica, com distúrbios metabólicos similares àqueles de animais diabéticos resistentes à insulina. Os níveis de leptina circulantes parecem estar diretamente relacionados à massa de tecido adiposo. No sistema imune, a leptina parece ser capaz de aumentar a produção de citocinas em macrófagos, aumentar a adesão e mediar o processo de fagocitose, a partir de uma supra-regulação dos receptores de macrófagos ou pelo aumento da atividade fagocitária. Também exerce efeito direto na proliferação das células T, mostrando uma resposta adaptativa desse hormônio ao aumento da competência imune do organismo contra a imunossupressão associada à falta de energia (Fonseca-Alaniz et al., 2006).

A leptina é um componente importante da resposta imune a patógenos, em parte, através da indução de IL-1 β no cérebro. Foi demonstrado que este hormônio atua sobre a microglia como um modulador e não como “gatilho” para inflamação, ao induzir a liberação de IL-1 β por meio de ações em seus receptores funcionais (Lafrance et al.,2009).

A expressão da leptina é controlada por diversas substâncias, como a insulina, os glicocorticóides e as citocinas pró-inflamatórias. Estados infecciosos e as endotoxinas também podem elevar a concentração plasmática de leptina. Inversamente, a testosterona, a exposição ao frio e as catecolaminas reduzem a síntese de leptina. Situações de estresse impostas ao corpo, como jejum prolongado e exercícios físicos intensos, provocam a diminuição dos níveis circulantes de leptina, comprovando, dessa maneira, a atuação do sistema nervoso central na inibição da liberação desta pelos adipócitos (Sandoval & Davis,2003).

A leptina reduz o apetite a partir da inibição da formação de neuropeptídeos relacionados ao apetite, como o neuropeptídeo Y, e também do aumento da expressão de neuropeptídeos anorexígenos, como o hormônio estimulador de melanócito (α -MSH), hormônio liberador de corticotropina (CRH) e substâncias sintetizadas em resposta à anfetamina e cocaína (Friedmann & Halaas,1998). No entanto, indivíduos obesos apresentam elevados níveis plasmáticos de leptina, cerca de cinco vezes mais que aqueles encontrados em sujeitos magros (Considini et al.,1996). Esses contrastes indicam que os mecanismos que controlam o metabolismo e o peso corporal em humanos são mais complexos do que se imagina, e maiores investigações relacionadas ao gênero e à espécie são necessárias (Vierhapper et al.,2003). A hiperleptinemia, encontrada em pessoas obesas, é atribuída a alterações no receptor de leptina ou a uma deficiência em seu sistema de transporte na barreira hematoencefálica, fenômeno

denominado resistência à leptina, semelhante ao que ocorre no *diabetes mellitus* (Considini et al.,1996).

Foi observado estar a leptina significativamente aumentada em ratos com obesidade induzida por dieta, composta de 32% de lipídeos, 51% de carboidratos e 17% de proteínas, administrada por 12 semanas, comparada aos animais controle e estar a sua expressão diretamente relacionada ao peso corporal. Estes resultados sugerem que 12 semanas de uma dieta hipercalórica poderia induzir anormalidades endócrinas típicas da obesidade, embora não fosse suficiente para causar anormalidades cardíacas significativas (Carroll et al.,2006).

1.4 Grelina

A grelina é um hormônio gastrointestinal identificado no estômago de ratos, em 1999 (Kojima et al.,1999; Hosoda et al.,2000; Rosicka et al.,2003). O hormônio grelina é um potente estimulador da liberação de GH, nas células somatotróficas da hipófise e do hipotálamo, sendo o ligante endógeno para o receptor secretagogo de GH (GHS-R). Estudos em modelos animais indicam que esse hormônio desempenha importante papel na sinalização dos centros hipotalâmicos que regulam a ingestão alimentar e o balanço energético (Nakazato et al.,2001). Recentes estudos com roedores sugerem que a grelina, administrada periféricamente ou centralmente, independentemente do GH, diminui a oxidação das gorduras e aumenta a ingestão alimentar e a adiposidade (Ukkola & Poykoo,2002). Assim, esse hormônio parece estar envolvido no estímulo para iniciar uma refeição. Sabe-se ainda que os níveis de grelina são influenciados por mudanças agudas e crônicas no estado nutricional, encontrando-se elevados em estado de anorexia nervosa e reduzidos na obesidade (Rosicka et al.,2003; Tschop et al.,2000; Leidy et al.,2004).

Conhece-se estar a leptina envolvida em efeitos nociceptivos e a grelina, bem como as orexinas A e B, em efeitos antinociceptivos. Alguns estudos admitem a hipótese de que a diminuição da susceptibilidade à dor em animais ou humanos magros possa ser induzida pelo aumento da atividade endógena de grelina, ou que o aumento na susceptibilidade à dor em animais ou humanos obesos possa ser induzido por diminuição da atividade endógena de grelina (Guneli et al.,2010).

A grelina poderia levar a uma inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias induzidas pela leptina, como o TNF- α , a IL-1 β e a IL-6. Estes dados sugerem a existência de uma rede reguladora recíproca pelo qual a grelina e a leptina controlam a ativação de células imunes e a inflamação. Além disso, a grelina também exerce potentes efeitos anti-inflamatórios (Dixit et al.,2004).

Foram avaliados os efeitos da administração central de grelina no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória e no edema induzido pela injeção I.Pl. de Cg em ratos. A grelina central (4 μ g por animal i.c.v.), administrada 5 minutos antes da Cg, reverteu a hiperalgesia mecânica e inibiu o edema de pata induzidos pela Cg. Os efeitos anti-hiperalgésico e antiedematoso da grelina foram revertidos pelo naloxone (10 μ g/rato i.c.v.), indicando que a grelina poderia exercer uma função inibitória na dor inflamatória através da interação com o sistema opióide central (Sibilia et al.,2006).

Entretanto, o papel funcional da grelina na regulação da resposta imune permanece indefinido.

1.5 Opióides endógenos

A interrelação entre opióides endógenos ou endorfinas, resposta à dor, obesidade e comportamento alimentar têm sido descritos na literatura. A resposta à dor, examinada em um modelo de obesidade induzida por dieta palatável, com alto conteúdo de

gorduras insaturadas, mostrou serem os obesos menos sensíveis ao estímulo doloroso, consistente com um aumento de opióides endógenos na obesidade (Ramzan et al.,1993).

Curvas dose/resposta para a analgesia por morfina indicam que esta substância é menos potente em ratos Zucker obesos que em ratos magros, o que sugere um defeito no sistema opióide endógeno destes animais obesos (Roane & Porter,1986).

Os opióides endógenos provavelmente contribuem para a hiperfagia, obesidade e hiporesponsividade dos hormônios esteróides ovarianos em ratas obesas Zucker, testadas com antagonista de receptor opióide, naltrexone (Marin-Bivens & Olster,1999).

As mudanças endócrinas ocasionadas pelo estado inflamatório crônico característico da obesidade parecem abranger aspectos fisiopatológicos que poderiam desencadear mudanças comportamentais e fisiológicas em humanos e animais experimentais, levando a um aumento ou diminuição no limiar de dor. Por esta razão, torna-se importante avaliar as respostas nociceptiva e inflamatória de animais, alimentados com dieta hipercalórica, em relação aos animais alimentados com dieta padrão, frente a estímulos térmicos e químicos, após aplicação intraplantar de Cg, a fim de se verificar as diferenças no perfil nociceptivo e inflamatório destes animais.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar e caracterizar as alterações nociceptivas e inflamatórias agudas, em ratos com obesidade induzida por dieta hipercalórica (grupo HD), comparando-as aos ratos com dieta padrão (grupo CD).

2.2 ESPECÍFICOS

I – Avaliar ansiedade e atividade motora voluntária entre os grupos HD e CD, através de testes de comportamento Labirinto em Cruz Elevado e Campo Aberto;

II – Investigar se há alterações basais de nocicepção do grupo HD em relação ao grupo CD, através do teste de Retirada de Cauda;

III – Investigar as diferenças de nocicepção basal e hiperalgesia térmica, após aplicação I.Pl. de Cg, no teste de Placa Quente;

IV - Avaliar as diferenças na hipernocicepção mecânica entre os grupos HD e CD, submetidos à aplicação I.Pl.de Cg, através do teste Von Frey eletrônico;

V – Investigar as respostas inflamatórias entre os grupos HD e CD, na avaliação do Edema de Pata por Pletismometria;

VI – Analisar parâmetros metabólicos, como Índice de Lee, glicemia de jejum, triglicérides e proteínas séricas;

VII – Avaliar as gorduras perigonadal e retroperitoneal para caracterização da obesidade experimental.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais:

Foram utilizados 80 ratos machos da linhagem *Wistar*, provenientes do biotério da Universidade Federal de Alfenas, com 4 semanas de vida, com pesos variando entre 150-200gr, mantidos em número de 2 animais por caixa, sob ciclo claro/escuro de 12 horas, sob condições de temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$). Os animais da amostra foram alimentados, a partir da quarta semana de vida, por um período de 16 semanas, sendo que quarenta ($n=40$) receberam ração industrial balanceada (NUVITAL,NUVILAB-CR,PR,Brasil) e água *ad libitum*. Os animais que tiveram obesidade induzida ($n=40$) foram tratados como se segue:

3.2 Indução de obesidade:

Os animais receberam, após quatro semanas de vida, alimentação composta por ração industrial moída (51.4%), leite condensado (33%), açúcar (7%) e água (8.6%) durante 16 semanas (Lima et al.,2008). A ração moída foi preparada com a própria ração comercial (NUVITAL – BR), adicionada aos outros ingredientes e confeccionada em peletz no laboratório de Nutrição da Universidade Federal de Alfenas e mantida em freezers apropriados. O ganho de peso corporal, em ambos os grupos, foi medido quinzenalmente, durante o período experimental. O controle da ingestão, tanto no grupo HD quanto CD, foi também analisado por um período de 24 h, quinzenalmente. O Índice de Lee foi usado para confirmação da obesidade, consistindo na raiz cúbica do peso corporal em gramas dividido pela medida do comprimento naso-anal x 10 (Lee, 1929) e realizado ao final da indução de obesidade (idade: 20 semanas). Ainda na caracterização da obesidade experimental, foram excisadas e pesadas as gorduras perigonadal e retroperitoneal em ambos os grupos.

3.3 Labirinto em Cruz Elevado:

O Labirinto em cruz elevado é um modelo animal validado do ponto de vista farmacológico, bioquímico e comportamental como teste de ansiedade no rato (Pellow; Chopin; File & Briley, 1985). Sua funcionalidade como modelo animal de ansiedade baseia-se na atividade exploratória espontânea e na aversão natural do animal pelos braços abertos. O número de entradas e tempo gasto nos braços abertos são usados como indicadores inversamente relacionados à ansiedade (Pellow et al., 1985; Hogg, 1996): quanto mais intensa a exploração dos braços abertos, menor a ansiedade. Várias manipulações são capazes de alterar o comportamento do rato neste teste, observando-se aumentos seletivos da exploração nos braços abertos após administração de anseolíticos, como clordiazepóxido e diazepam (Pellow et al., 1985). O aparato constitui-se de dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm) com um teto aberto, colocados de tal forma que os braços abertos e fechados ficam dispostos perpendicularmente, suspensos a uma altura de 50 cm do assoalho da sala. Ao início do experimento, os animais são colocados, um por vez, no centro do labirinto, com a cabeça voltada para um dos braços fechados e filmados, durante 5 minutos cada um. Após a filmagem, os dados foram analisados, sendo registradas variáveis comportamentais apresentadas pelos animais dos grupos HD e CD, que incluíam a porcentagem de entradas nos BFs, a porcentagem de entradas nos BAs, o número total de entradas e o tempo gasto nos BAs do aparato. Uma entrada era registrada quando o animal colocava todas as quatro patas dentro de um dos braços. É importante ressaltar que os animais deste estudo foram avaliados quanto à ansiedade apresentada em condições basais, sem aplicação de quaisquer patógenos.

3.4 Campo Aberto:

O teste do Campo aberto (do inglês, *Open field*), é um modelo animal que consiste em colocar um animal dentro de uma grande câmara vazia e desconhecida, geralmente circular e dividida em quadrantes. Uma vez dentro do campo, a atividade do animal é registrada, através de linhas dispostas no assoalho da câmara, contando-se o número de vezes que tais linhas são cruzadas durante o teste. Tem por finalidade avaliar a atividade exploratória e a tendência do animal em preferir o centro à periferia do CA e também contar o número de *rearings* (exploração do ambiente pelo animal, que fica sobre as patas traseiras). Quando o animal apresenta baixa atividade motora e grande preferência pela periferia, diz-se que esses animais apresentam níveis elevados de ansiedade. Observa-se que uma baixa atividade motora frequentemente indica uma reação de medo do animal. Ratos com medo apresentam um comportamento tigmotático, ou seja, eles procuram não se aventurar para longe das paredes da câmara, além de evitarem ficar sobre as patas traseiras e explorarem o ambiente ou se limparem. Os ratos apresentam tal comportamento de medo quando introduzidos num campo aberto desconhecido. Este comportamento irá diminuir à medida que o animal se familiarize com a caixa (Archer, 1973). Os animais dos grupos HD e CD foram colocados, um por vez, no centro da arena e filmados por 5 minutos, quanto ao número de *crossings* na periferia e no centro, número total de *crossings*, número de *crossings* no centro/total de *crossings* (efeito antitigmotático) e o número de *rearings*. Também neste estudo, os animais dos dois grupos foram testados em seu estado basal, sem aplicação de quaisquer patógenos.

3.5 Teste de Retirada de cauda (Tail Flick test):

O teste de Retirada de Cauda avalia a nocicepção térmica manifesta por reflexo de retirada da cauda, podendo ser realizado em ratos ou camundongos. Ratos pesando entre

100 e 200 g são colocados no aparelho com os dois terços inferiores da cauda sobre um filamento aquecido, e o tempo que os animais levam para retirar a cauda após a aplicação do estímulo térmico é cronometrado. Foram avaliados os animais do grupo HD e CD e foram feitas três medidas-controle em intervalos de 30 minutos. Por meio dessas medidas se estabeleceu o tempo de “*cut-off*” (máximo de permanência da cauda sobre o filamento), calculado como sendo de aproximadamente 3 vezes o valor médio da 2ª medida-controle. Adotou-se, porém, um *cut-off* de 15s, devido a lesões causadas na cauda quando exposta a um tempo superior a este. A primeira leitura-controle tem o objetivo de adaptação dos animais ao ensaio. A segunda leitura-controle é utilizada para exclusão do ensaio animais que possuem período de latência superior a 7,9s, sendo considerada a resposta-controle do tempo zero. Os animais de ambos os grupos foram avaliados quanto à latência e à temperatura para o reflexo de retirada da cauda (Kuraishi et al.,1983).

3.6 Teste da Placa Quente:

O modelo da Placa Quente (PQ) é um dos testes termo-algesimétricos comumente utilizados para investigação de nocicepção e analgesia em roedores. Este método foi originariamente descrito por Woolfe e MacDonald (1944) e sofreu modificações para aumento da reprodutibilidade e adequação (Eddy e Leimback,1953; Handwerker,1983; Hunskaar et al.,1986). A técnica consiste na colocação individual do animal em caixa acrílica transparente, com piso de alumínio de espessura constante (2 mm). Após período de ambientação (± 1 min), suficiente para que o animal cesse a exploração do ambiente, o fundo de alumínio da caixa é aquecido à temperatura de 50°C. Neste momento, é disparado um cronômetro digital para contagem do tempo de latência (em décimos de segundos). Decorridos alguns segundos, o estímulo térmico torna-se aversivo e os animais reagem com um padrão consistente de comportamento. A

observação destas respostas determina o final do teste. Parte da confiabilidade deste teste reside no fato de que estes comportamentos raramente são manifestados pelo animal na ausência do estímulo térmico (Eddy et al., 1950). O limiar nociceptivo foi avaliado pelo tempo de permanência na PQ até o aparecimento de uma das seguintes respostas características do animal: troca de apoio dos pés como um “sapateio”, o animal "agita" ou lambe a pata injetada. O limiar nociceptivo (valor basal) é considerado como 1º episódio de resposta ao calor e é obtido antes de qualquer procedimento ou da injeção de Cg. Lavich e cols. (2005) descreveram em seu estudo que doses baixas de agentes nociceptivos como a Cg são capazes de reduzir o tempo para a retirada da pata, permitindo avaliação reprodutível da hiperalgesia inflamatória. Também foram obtidos os valores na 1ª e 3ª horas após injeção I.Pl. de Cg ou veículo, tanto nos animais com obesidade induzida quanto nos animais não obesos. Reduções no tempo de permanência basal, observadas nos diferentes tempos após a injeção de Cg foram tomadas como indicativo do desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória. A medida da hipernocicepção pode ser definida como a redução no tempo de latência para o aparecimento de uma resposta motora após a exposição da região inflamada ao estímulo térmico. Alterações no perfil temporal destas reduções foram interpretadas como um efeito pró ou antinociceptivo (redução ou aumento do tempo de permanência, respectivamente). O tempo de 180 minutos foi escolhido por ser suficiente para a indução de respostas próximas à resposta máxima, conforme dados obtidos em experimentos anteriores (Savernini, 2006).

3.7 Teste de Nocicepção mecânica de *Von Frey* eletrônico:

Avalia a sensibilidade cutânea ao estímulo mecânico, usando-se uma série de filamentos calibrados de diferentes diâmetros e capazes de fornecer pressões variadas, sendo que o de maior diâmetro e resistência promove maior pressão sobre a superfície cutânea

aplicada (Asfaha et al.,2002). No método eletrônico, um transdutor de pressão acoplado a uma ponteira de calibre fixo possibilita o registro da força necessária para a resposta comportamental (Vivancos et al.,2004). No teste, cada rato é alocado individualmente em uma câmara acrílica com fundo composto de uma grade metálica onde foram habituados por 15 minutos antes do teste. A ponta do transdutor é pressionada de encontro à região subplantar da pata posterior do animal, de modo que a pressão exercida seja lentamente aumentada e se registre a força necessária para a reação de retirada ou *flinching* do membro estimulado. Foi empregada carragenina (100 mg) dissolvida em salina estéril (10ml) na dose de 50 µl na região subplantar da pata direita, para indução de hipernocicepção mecânica. O cálculo da intensidade de hipernocicepção (variação limiar nociceptivo) é obtido pela diferença entre o valor da hora basal, sem aplicação de qualquer substância e os valores na 1ª e 3ª horas após aplicação I. Pl. Cg ou salina. As medidas foram realizadas pelo mesmo examinador, aumentando a confiabilidade da avaliação.

3.8 Método de avaliação do edema inflamatório através da Pletismometria:

A injeção intraplantar de Cg na pata de ratos ou camundongos induz aumento progressivo de volume da pata injetada. Este edema é proporcional à intensidade da resposta inflamatória. A resposta inflamatória induzida pela Cg atinge um pico em torno da 5ª hora pós-injeção e é modulado por inibidores específicos da cascata inflamatória, entre os quais as drogas anti-inflamatórias não esteroidais (DAINEs), como a indometacina (Morris, 2003). A fim de se verificar o aumento do volume da pata provocado pela injeção de Cg, nos grupos HD e CD foi usado um Hidropletismômetro, aparelho que consiste de duas câmaras transparentes, ligadas em um sistema de vasos comunicantes. A pata do animal é submersa até a articulação tíbio-társica, em uma cubeta (primeira câmara) preenchida com uma solução salina contendo Extran 1% para

reduzir a tensão superficial. O deslocamento de volume causado pela imersão da pata é registrado por eletrodos de fluxo iônico localizados em um compartimento anexo e comunicante com a cubeta (segunda câmara). Este registro é convertido para volume (unidade=0,1ml) e lido no monitor digital do aparelho. O cálculo do edema de pata é obtido pela diferença entre o volume da hora basal, sem Cg e o volume da pata inflamada 1, 2, 3 e 4 h após aplicação I. Pl. de Cg. As medidas foram realizadas pelo mesmo examinador, aumentando a confiabilidade da avaliação.

3.9 Dosagem glicemia de jejum, triglicerídeos e proteínas no plasma:

Os animais de ambos os grupos foram decapitados e tiveram seu sangue colhido em tubetes com anticoagulante heparina (50 a 100 μ l), centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos e congelados (-20°C), até o momento das análises. A glicemia e os triglicerídeos foram dosados pelo método enzimático-colorimétrico e a proteína sérica pelo método colorimétrico.

3.10 Excisão e pesagem tecido adiposo branco:

Após a decapitação e coleta sanguínea, as gorduras perigonadal e retroperitoneal dos animais dos grupos HD e CD foram excisadas, lavadas em solução salina (0.9%) e imediatamente pesadas, para caracterização da obesidade experimental.

3.11 Drogas utilizadas:

Foram usadas Carragenina (100 mg) dissolvida em salina estéril apirogênica (10ml), na dose de 50 μ l na região subplantar da pata direita e solução salina estéril como veículo, nos animais controle, também na dose de 50 μ l, na região subplantar.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram apresentados como média e erro padrão da média e analisados considerando-se, dentro de cada protocolo, sempre a coerente relação entre os grupos experimentais e seus respectivos controles. Os dados foram confrontados através dos testes estatísticos indicados para cada protocolo, como a Análise de Variância (ANOVA) seguida de pós-teste de *Tukey* para 3 ou mais médias e o teste de *t-Student* ou *Mann-Whitney* para 2 médias, quando indicado. Sempre que necessário, foi adotada ferramenta estatística adequada ao processo de análise. Foram considerados estatisticamente diferentes grupos analisados em que $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Valores nutricionais da dieta hipercalórica e da dieta padrão

A quantidade de calorias (Kcal/100g) e a composição centesimal, tanto da ração comercial NUVITAL (NUVILAB-CR,PR, BRASIL), quanto da ração hipercalórica é mostrada abaixo, no Quadro 1. A ração hipercalórica preparada foi efetiva em induzir obesidade em 37 dos 40 animais submetidos a ela, ou seja, 92.5% dos animais que tiveram indução de obesidade conseguiram um ganho de peso até 20% superior aos animais que não tiveram obesidade induzida.

Valores nutricionais	CD	HD
Calorias (Kcal/100g)	332	350,86
Carboidratos	57.5%	62.03%
Proteínas	22%	16.93%
Lipídeos	4%	3.86%
Água	12%	11.23%
Matéria mineral	10%	5.74%

Quadro 1 – Quantidade de calorias (Kcal/100g) e composição centesimal da dieta padrão (CD) e da dieta hipercalórica (HD), administrada a partir da quarta semana de vida, por 16 semanas.

5.2 Peso corporal e ingestão

O ganho de peso corporal foi maior no grupo que recebeu dieta hipercalórica, em relação à dieta padrão, sendo esta diferença significativamente maior a partir da 8^a

semana de vida, intensificando-se nas semanas seguintes, como mostrado na figura 1.

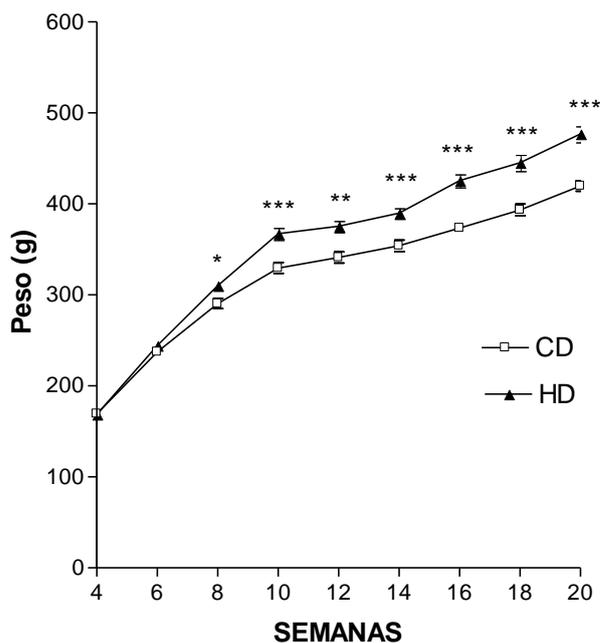


Figura 1 – Ganho de peso corporal em gramas, nos grupos CD (n=10) e HD (n=10), iniciando-se na 4ª até a 20ª semana de vida. (*) Representa diferença estatística quando comparado ao valor correspondente do grupo controle $*p<0.05$ $p<0.01$ $***p<0.001$ Unpaired t-test**

A ingestão alimentar dos animais foi avaliada por um período de 24 h, quinzenalmente, durante as 20 semanas de vida, a partir da 4ª semana. A ingestão da ração hipercalórica foi maior do que a ração padrão, a partir da 8ª semana, tornando-se ainda maior da décima à décima oitava semanas de vida, decaindo na vigésima semana, como mostra a Figura 2.

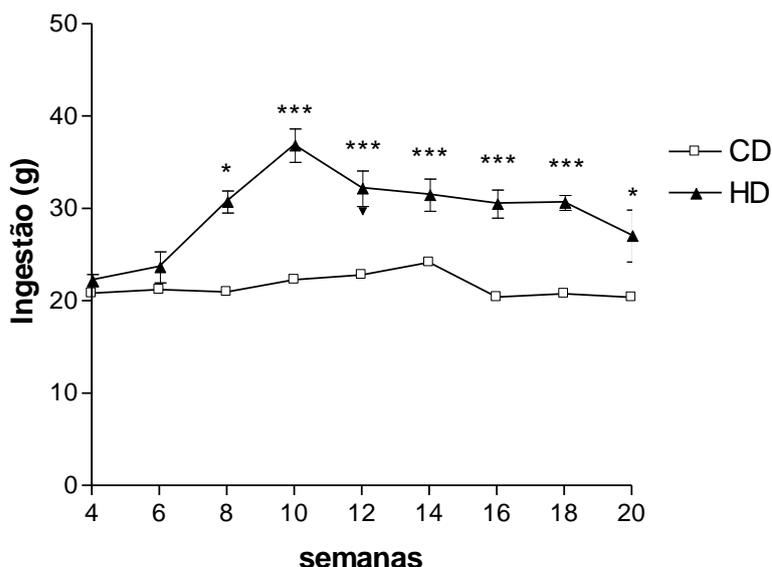


Figura 2 – Ingestão alimentar em gramas no grupo HD (n=10) comparada ao grupo CD (n=10). Dados da ingestão foram avaliados por 24 hs, quinzenalmente, iniciando-se na 4ª até a 20ª semana de vida. (*) Representa diferença estatística quando comparado ao valor correspondente do grupo controle $*p<0.05$ $*p<0.001$ *Unpaired t-test***

5.3 Índice de Lee e parâmetros metabólicos

Os parâmetros metabólicos analisados, como glicemia de jejum (mg/dL), triglicerídeos (mg/dL) e proteínas plasmáticas (g/dL), juntamente com o Índice de Lee são mostrados no Quadro 2. Todos os parâmetros foram significativamente diferentes no grupo HD em comparação ao grupo CD, exceto a dosagem de proteína plasmática, que foi semelhante entre os grupos.

	grupo controle	grupo hipercalórico
Índice Lee	3.230 ± 0.0307	3.377 ± 0.0361***
Glicose (mg/dL)	101.00 ± 3.41	132.00 ± 10.80**
Triglicerídeos (mg/dL)	75.15 ± 8.49	180.60 ± 25.36**
Proteína (g/dL)	6.56 ± 0.17	6.26 ± 0.25

Quadro 2 – Parâmetros metabólicos, representados pelo Índice de Lee, glicose, triglicerídeos e proteínas, nos grupos CD e HD, analisados após 16 semanas de dieta. (*) Representa diferença estatística quando comparado ao valor correspondente do grupo controle $p<0.01$ $***p<0.001$ Unpaired t-test**

Na figura 3, é mostrada a diferença no Índice de Lee, entre o grupo CD (n=10) e o grupo HD (n=10), após 16 semanas de dieta.

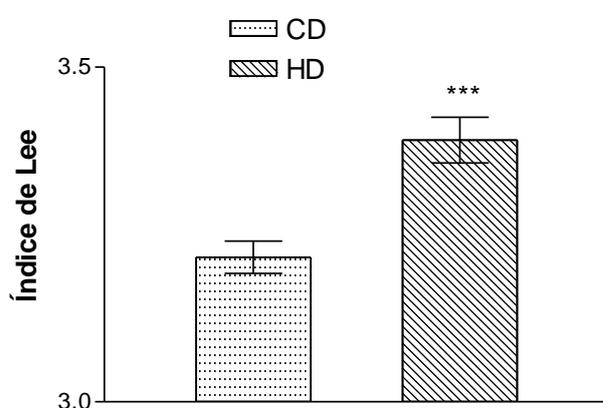


Figura 3 – Índice de Lee, após 16 semanas de dieta, nos animais dos grupos HD e CD. (*) Representa diferença estatística quando comparado ao valor correspondente do grupo controle $*p<0.001$ Unpaired t-test**

5.4 Peso das gorduras perigonadal e retroperitoneal

Com 20 semanas de idade, os animais de ambos os grupos foram decapitados e o TAB, representados pela gordura perigonadal e retroperitoneal, foram excisados, lavados em solução salina a 0.9% e pesados. Conforme Figura 4, os ratos que tiveram obesidade induzida (n=7) apresentaram maior peso, tanto da gordura perigonadal quanto retroperitoneal, em relação ao grupo sem indução de obesidade (n=8).

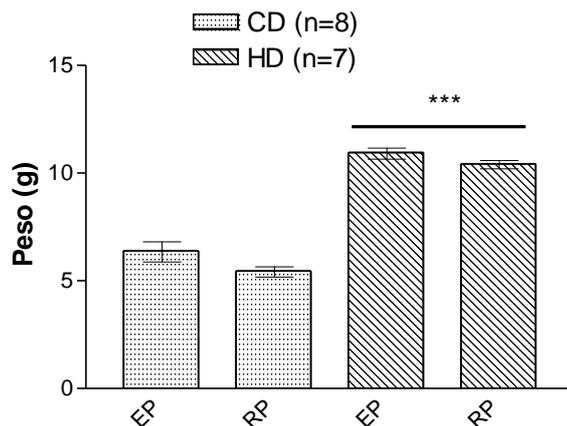


Figura 4 – Peso em gramas do tecido adiposo branco, nos grupos HD e CD, após 16 semanas de dieta. (*) Representa diferença estatística quando comparado ao valor correspondente do grupo controle * $p < 0.001$ Unpaired t-test**

5.5 Teste Labirinto em Cruz Elevado

O teste LCE não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os animais foram avaliados quanto ao % de entradas nos BFs (Fig 5a), % de entradas nos BAs (Fig 5b), número total de entradas nos braços fechados e abertos (Fig 5c) e tempo de permanência nos braços abertos do aparato (Fig 5d).

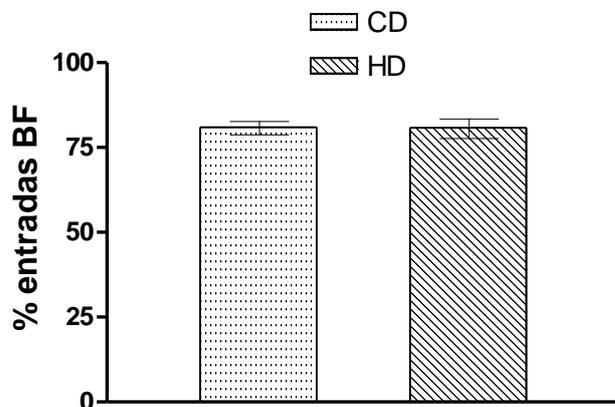


Figura 5a – Porcentagem de entrada nos BFs do LCE nos grupos HD e CD (n=6 cada). *Mann Whitney test*

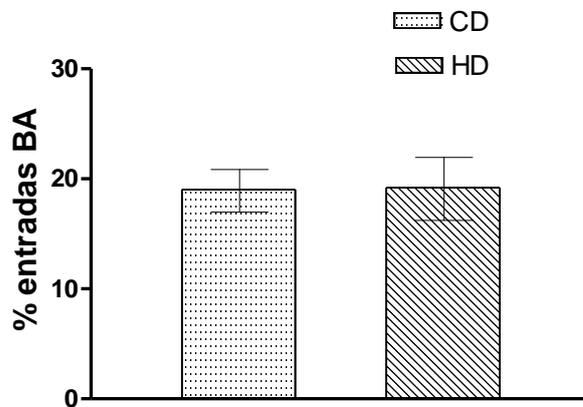


Figura 5b – Porcentagem de entrada nos BAs do LCE nos grupos HD e CD (n=6 cada). *Mann Whitney test*

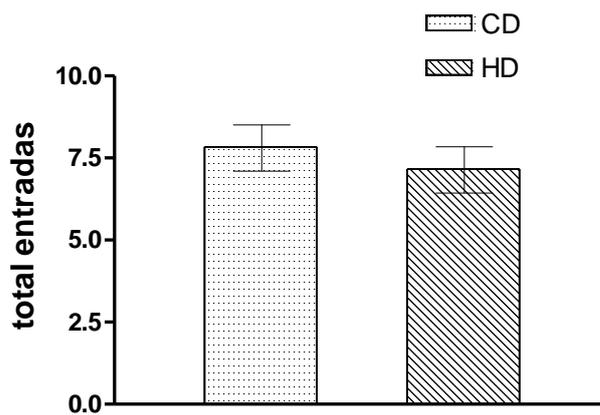


Figura 5c – Número total de entrada nos BFs e BAs do LCE nos grupos HD e CD (n=6 cada). *Mann Whitney test*

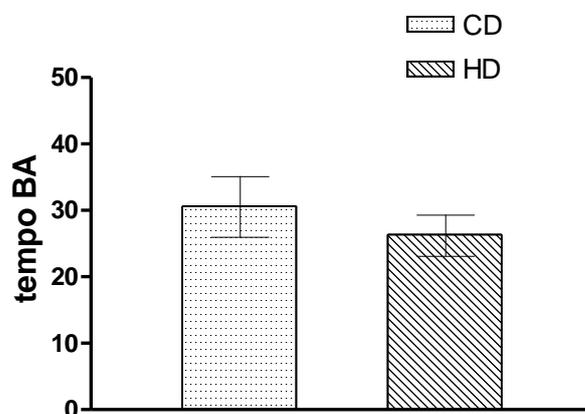


Figura 5d – Tempo nos BAs do LCE nos grupos HD e CD (n=6 cada). *Mann Whitney test*

5.6 – Teste do Campo Aberto

O teste CA foi realizado nos grupos HD e CD (n=6 cada). Os animais foram analisados quanto ao número de *crossings* na periferia (Fig 6a), *crossings* no centro (Fig 6b) e o número total de *crossings* no aparato (Fig 6c). Foi também analisado o efeito antitigmotático (*crossings* no centro/total de *crossings*) (Fig 6d) e o número total de *rearings* (Fig 6e).

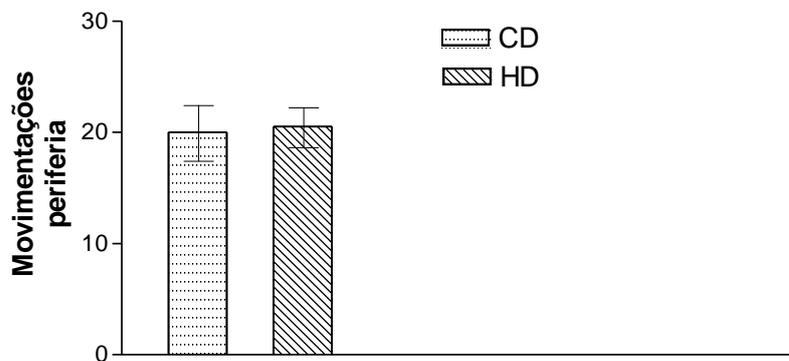


Figura 6a – Número de *crossings* na periferia do CA dos animais dos grupos HD e CD. *Mann Whitney test*

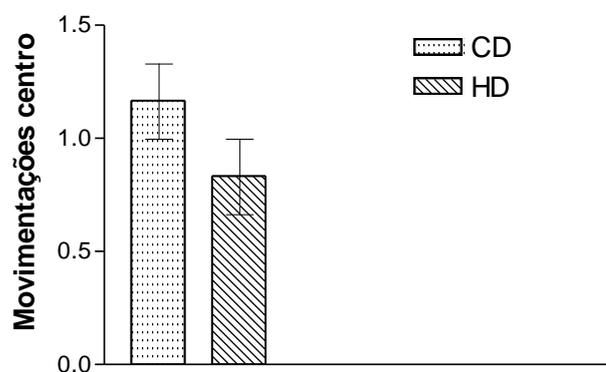


Figura 6b – Número de *crossings* no centro do CA dos animais do grupo HD e CD *Mann Whitney test*

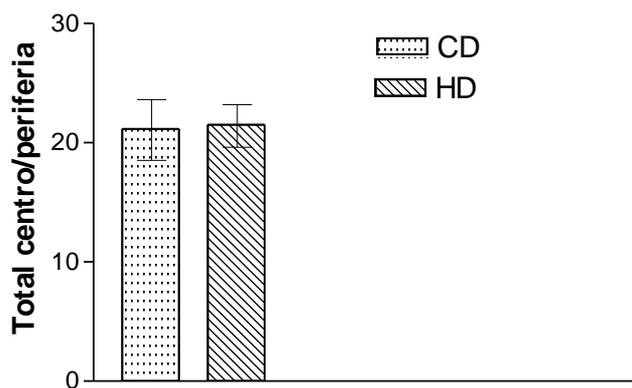


Figura 6c – Número total de *crossings* no centro e periferia do CA dos animais dos grupos HD e CD. *Mann Whitney test*

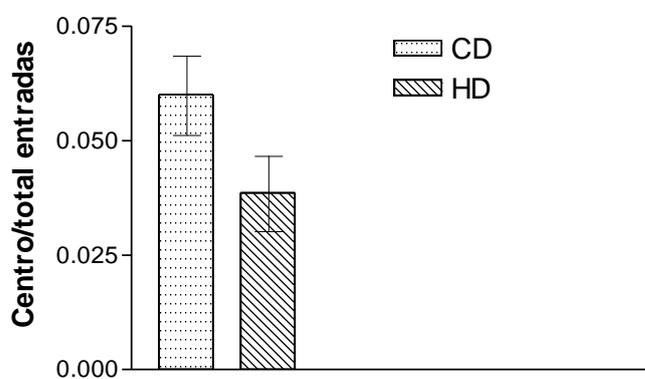


Figura 6d – Efeito antitigmotático no CA dos animais do grupo HD e CD. *Mann Whitney test*

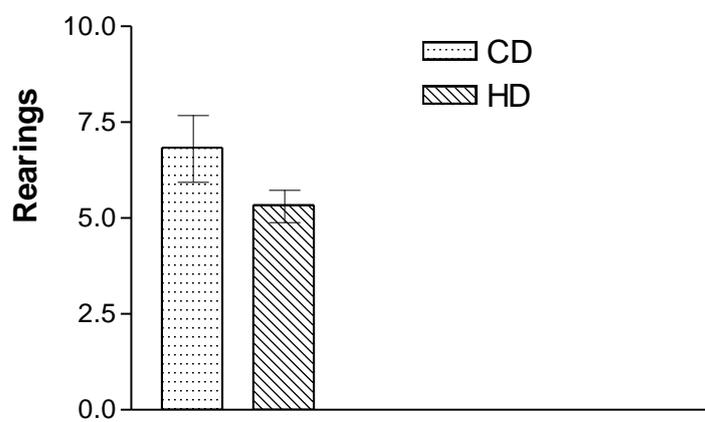


Figura 6e – Número total de *rearings* no CA dos animais dos grupos HD e CD.

Mann Whitney test

5.7 Teste Retirada de cauda

O teste de Retirada de cauda não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, tanto em latência (Figura 7a) quanto em limiar térmico (Figura 7b) para retirada da cauda do filamento aquecido do aparato.

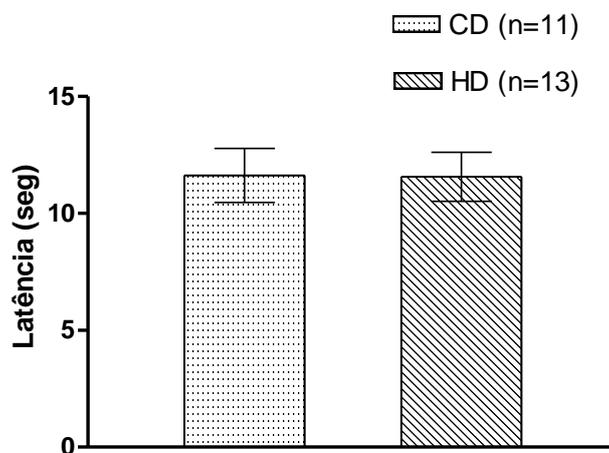


Figura 7a– Latência em segundos para retirada de cauda nos grupos HD e CD, após 16 semanas de dieta. *Unpaired t-test*

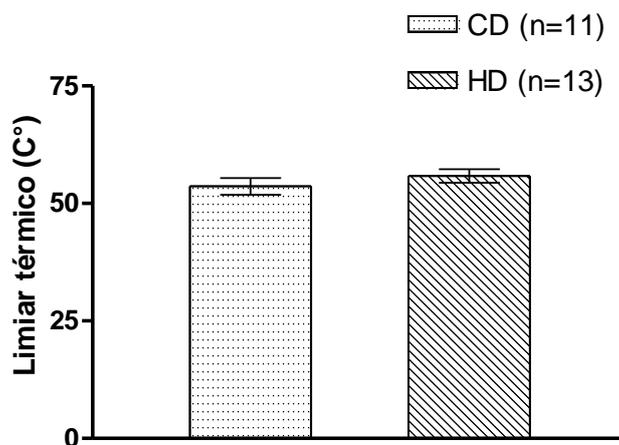


Figura 7b – Limiar térmico em C° para retirada de cauda nos grupos HD e CD, após 16 semanas de dieta. *Unpaired t-test*

5.8 Teste Placa quente

A nociceção basal e a hiperalgesia térmica, 1h e 3hs após aplicação I.Pl. de salina ou Cg, foram avaliadas pelo método da PQ, em ambos os grupos. Conforme pode ser visto na Figura 8, tanto o grupo HD quanto o grupo CD apresentaram latência para retirada semelhante na avaliação da nociceção basal. Na avaliação da hiperalgesia térmica, o grupo com obesidade induzida por dieta mostrou menor período de latência, em segundos, para reação ao aquecimento da placa que o grupo com dieta padrão, na 1ª hora pós-Cg (9.902 ± 0.6921 e 12.69 ± 0.6596 , respectivamente), enquanto que na 3ª hora pós-Cg, a latência para reação foi ainda menor no grupo HD quando comparado ao grupo CD (8.317 ± 0.5436 e 11.70 ± 0.8769 , respectivamente).

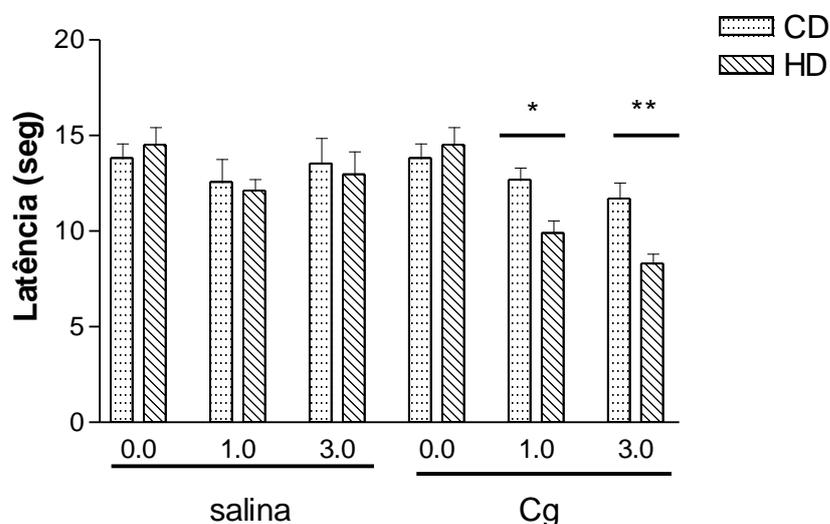


Fig 8 – Avaliação da nociceção basal (hora zero) e da hiperalgesia térmica, 1h e 3hs após aplicação I.Pl. de salina ou carragenina, nos grupos HD e CD (n=6 cada).

(*) Representa diferença estatística quando comparado ao valor correspondente do grupo controle $*p < 0.05$ $**p < 0.01$ *Unpaired t-test*

5.9 Teste *Von Frey*

O teste *Von frey* foi realizado para avaliação da hipernocicepção mecânica, em ambos os grupos, avaliados na hora basal (zero hora), sem aplicação de Cg e após 1 e 3 horas da aplicação I.Pl. de Cg ou salina, na pata posterior direita, para indução da hipernocicepção e inflamação. O cálculo da intensidade de hipernocicepção (variação limiar nociceptivo) é obtido pela diferença entre o valor da hora basal, sem Cg e os valores na 1ª e 3ª horas após aplicação I. Pl. Cg. ou salina. Os quatro grupos avaliados foram: grupos CD e HD com salina e grupos HD e CD com Cg. A figura 9a mostra as diferenças na intensidade de hipernocicepção entre os grupos, sendo que na 1ª e 3ª horas, o grupo HD com Cg mostrou maior intensidade de hipernocicepção, em relação ao grupo CD com carragenina. As figuras 9b e 9c mostram a intensidade de hipernocicepção, medida pelo aparato, separadamente na 1ª e 3ª hs, respectivamente, após aplicação Cg I.Pl. ou salina, na pata posterior direita dos animais.

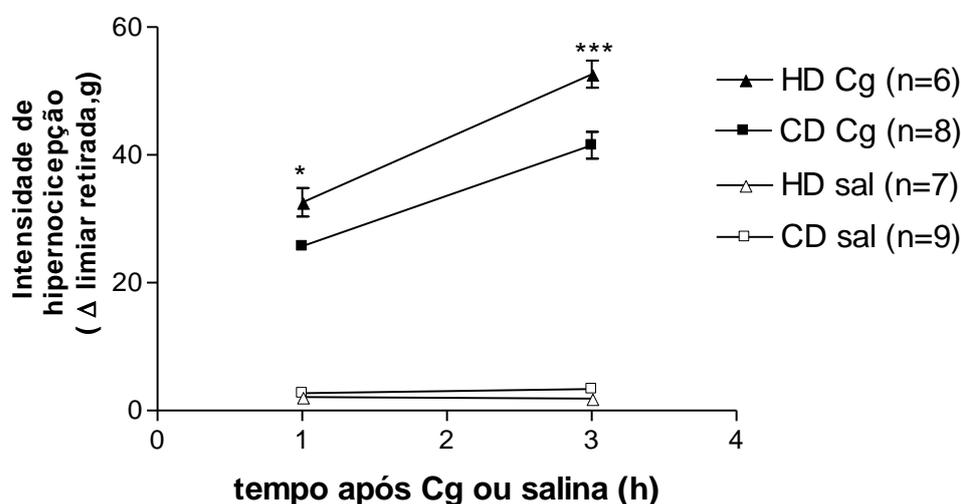


Figura 9a – Avaliação mecânica da intensidade de hipernocicepção (Δ limiar retirada, em gramas) nos animais dos grupos HD e CD após 1 e 3 hs da aplicação I.Pl de Cg ou salina. (*) Representa diferença estatística quando comparado ao valor correspondente do grupo controle $*p < 0.05$ $*p < 0.001$ Mann Whitney test**

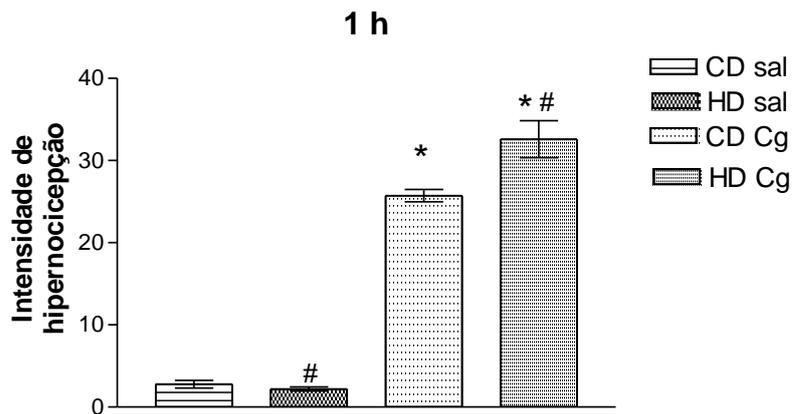


Figura 9b – Avaliação mecânica da intensidade de hipernociceção 1 h após aplicação I.Pl. de Cg ou salina, nos animais dos grupos HD e CD. (*) Representa diferença estatística quando comparado ao valor correspondente do grupo controle.

**p <0.05 comparado ao grupo salina*

#p <0.05 comparado ao grupo CD Mann-Whitney test

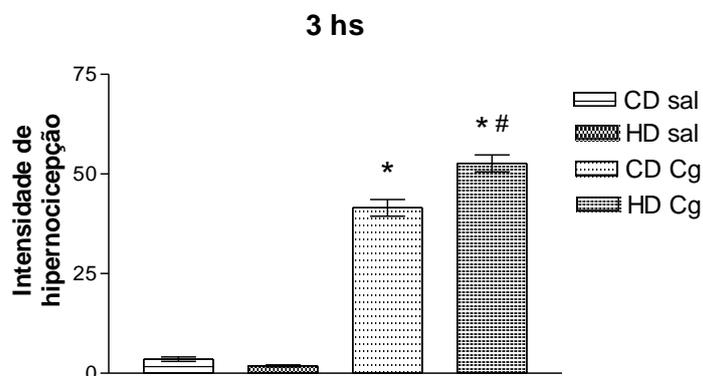


Figura 9c – Avaliação mecânica da intensidade de hipernociceção 3 hs após aplicação I.Pl. de Cg ou salina, nos animais dos grupos HD e CD. (*) Representa diferença estatística quando comparado ao valor correspondente do grupo controle.

**p <0.05 comparado ao grupo salina*

#p <0.05 comparado ao grupo CD

Mann-Whitney test

5.10 Teste do Edema de Pata

O teste do Edema de Pata, medido através de um Pletismômetro, avaliou a magnitude do edema induzido pela aplicação I.Pl. de Cg, na pata posterior direita do grupo com dieta hipercalórica (HD) e no grupo com dieta padrão (CD), através do deslocamento de volume da pata submersa. Foram medidos os volumes deslocados na hora basal (zero hora) e nas 1^a, 2^a, 3^a e 4^a horas após Cg. O cálculo do edema de pata foi obtido pela diferença entre o volume da hora basal, sem carragenina e o volume da pata inflamada 1, 3 e 4 hs após aplicação I. Pl. de Cg. O grupo HD mostrou a partir da 1^a hora maior magnitude de edema inflamatório comparado ao grupo CD, com esta diferença acentuando-se a partir da 2^a e 3^a horas e tornando-se ainda maior na 4^a hora, como pode ser visto na Figura 10a.

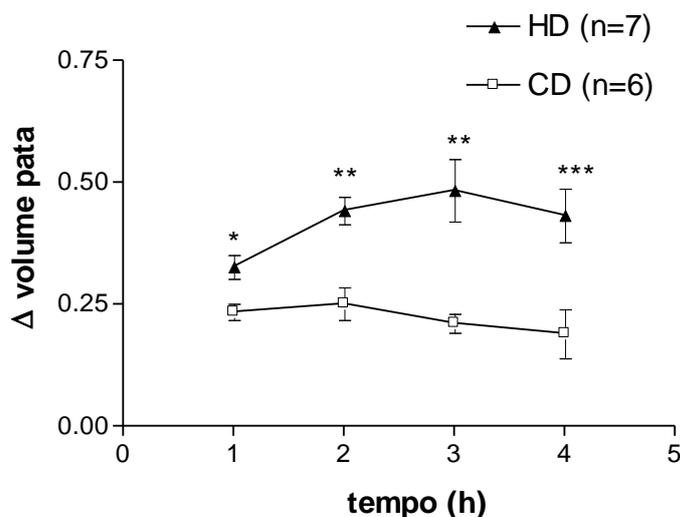


Figura 10a – Variação do volume da pata 1, 2, 3 e 4 horas após aplicação I. Pl. de Cg nos animais dos grupos HD e CD. (*) Representa diferença estatística quando comparado ao valor correspondente do grupo controle. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ * $p < 0.001$ Unpaired t-test**

6 DISCUSSÃO

A dieta hipercalórica utilizada neste experimento foi efetiva em promover a obesidade em ratos. Esta conclusão baseia-se na maior ingestão e ganho de peso corporal em animais com dieta hipercalórica comparado aos animais com dieta padrão. A maior ingestão e o conseqüente ganho de peso foram provavelmente decorrentes da maior palatabilidade e da quantidade de calorias da dieta preparada comparada à dieta padrão. Estas diferenças foram também comprovadas pela avaliação do Índice de Lee, o qual se apresentou maior no grupo HD. O ganho de peso induzido por dieta está de acordo com alguns estudos que utilizaram dietas hipercalóricas (Relling et al., 2006; Woods et al., 2003) e de cafeteria (Esteve et al., 1994; Sclafani & Springer, 1976). Além disso, os parâmetros metabólicos avaliados, como glicemia e triglicerídeos, mostraram-se maiores no grupo HD comparados ao grupo CD, resultados compatíveis com outros autores, onde os níveis de ácidos graxos livres e triglicerídeos no plasma de animais obesos foram significativamente maiores (124% e 424%, respectivamente) (Lima et al.,2008). O aumento do peso corporal está associado à co-morbidades conhecidas, como desequilíbrios na tolerância à glicose e resistência à insulina, na qual maiores concentrações de insulina são requeridas para manter a normoglicemia (Eckel et al., 2005; Wang et al., 2004). O ganho de peso corporal em razão da dieta hipercalórica está associado a várias co-morbidades, levando a um aumento da pressão arterial sistólica devido a fatores como ativação do sistema nervoso autônomo simpático (Barnes et al.,2003; Pausova,2006), maior atividade do sistema renina-angiotensina (Okere et al.,2006; Boustany-Kari et al.,2006; Fitzgerald et al.,2001), stress oxidativo (Pausova,2006), aumento dos ácidos graxos livres (Tripathy et al.,2003), insulina (Defronzo et al.,1975) e leptina (Ren,2004), todos sendo observados na obesidade.

Em razão das alterações metabólicas advindas do ganho de peso corporal, as quais poderiam levar a alterações nos níveis plasmáticos de diversas substâncias bioativas, decidiu-se avaliar o nível de ansiedade nos animais do grupo HD comparando-os aos animais do grupo CD. Para isto, utilizou-se o teste de Labirinto em Cruz Elevado, sem aplicação de qualquer patógeno, nos grupos HD e CD, com o propósito de se avaliar a ansiedade nestes animais. Pelos resultados obtidos, não observamos quaisquer diferenças basais entre o grupo HD e o grupo CD, ou seja, a obesidade induzida pela dieta hipercalórica não produziu nestes animais alterações de comportamento significativas em relação aos animais com dieta padrão. Nossos resultados apresentaram-se diferentes de outros autores, em que ratos DIO (obesidade induzida por dieta) Fischer 344 mostraram maiores níveis de ansiedade e comportamento agressivo, devido aos níveis basais de corticosterona mais elevados que os animais magros em testes comportamentais (Buchenauer et al., 2009).

No teste de CA, realizado após o teste do LCE, os animais dos grupos HD e CD não apresentaram diferenças significativas entre eles, apresentando-se em condições semelhantes quanto à atividade exploratória e à capacidade motora. É importante lembrar que os animais testados não sofreram aplicação de quaisquer patógenos, sendo nosso objetivo a avaliação do comportamento dos animais em estado saudável, para que se verificassem as possíveis diferenças motoras entre os grupos. Embora não tenham sido encontradas diferenças basais importantes entre os grupos quanto à atividade motora exploratória, os animais obesos que sofrem indução de inflamação pela administração intraperitoneal de LPS poderiam apresentar comportamentos diferenciados dos animais controle, pois evidências recentes sugerem que a inflamação pode ser uma causa comum de muitas condições associadas à obesidade. A obesidade seria capaz de induzir mudanças na resposta inflamatória, levando os ratos machos com

obesidade induzida por dieta a exibirem febre maior e mais prolongada em resposta ao LPS (100 μ g/Kg), administrado intraperitoneal, em relação aos animais sem indução de obesidade (Pohl et al., 2009).

Embora a obesidade possa causar alterações na resposta inflamatória e no limiar nociceptivo, o mecanismo pelo qual isto ocorre não é bem conhecido. Mudanças endócrinas causadas pela obesidade podem ser responsáveis pelo aumento ou diminuição no limiar de dor. Ratos *Zucker* obesos (*fa/fa*) e magros (*Fa/Fa*) têm respostas diferenciadas à atuação de citocinas como a IL-1 β e a IL-6, o que pode ser causado por mecanismos diferenciados de absorção e degradação destas substâncias entre os animais obesos e não obesos (Plata-Salamán et al.,1998).

Em nossos resultados, observamos que no teste de Placa Quente, na avaliação da nocicepção basal, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Alguns autores observaram uma diminuição no limiar de dor na PQ em animais com indução de obesidade por dieta, na avaliação da nocicepção basal, diferentemente de nossos resultados (Buchenauer et al.,2009). Outros autores também relatam que o consumo de dietas altamente palatáveis aumenta a ingestão calórica e atenua a resposta de roedores à dor aguda e que, a infusão intra-oral de sacarose dobrou a latência de retirada ao calor (Blass et al., 1987). A resposta à dor, examinada em um modelo de obesidade induzida por dieta palatável, com alto conteúdo de gorduras insaturadas, mostrou serem os obesos menos sensíveis ao estímulo doloroso, consistente com um aumento de opióides endógenos na obesidade (Ramzan et al.,1993).

São também conhecidos que fatores como espessura da pele e densidade de inervação podem afetar a sensibilidade à dor (Shir et al., 2001), o que pode explicar o menor limiar de dor encontrado por estes autores em animais obesos, os quais teriam

maior proteção pelo isolamento térmico, advindo da maior quantidade de tecido adiposo na pata destes animais.

Na avaliação da hiperalgesia térmica, o grupo HD apresentou menor latência em segundos para reação que o grupo CD após aplicação intraplantar de Carragenina, quando comparado ao grupo CD com Cg, sendo que na 1ª hora a latência para reação no grupo HD foi significativamente menor ($p < 0.05$) e na 3ª hora o período de latência foi ainda menor ($p < 0.01$). Estes resultados validam a hipótese de que o estado inflamatório crônico característico da obesidade pode levar a uma resposta nociceptiva e inflamatória mais exacerbada, após a aplicação local de Cg, em decorrência das diversas mudanças endócrinas e metabólicas em animais com indução de obesidade. Há alterações nos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias e hormônios endócrinos, os quais estariam atuando de maneira diferenciada na obesidade e perda de peso (Broberger, 2002; Cowley et al., 2003). Além da atuação das citocinas, hormônios endócrinos relacionados à obesidade, como a leptina e a grelina, têm importantes funções na regulação do equilíbrio energético e de ingestão alimentar (Guneli et al., 2010).

Por outro lado, nossos resultados no teste de RC não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, tanto em latência (seg) quanto em limiar térmico (C°). Outros autores encontraram que ratos obesos apresentaram latência significativamente maior para retirada da cauda quando comparados aos animais controle e que esta menor sensibilidade ao estímulo térmico poderia estar relacionada à liberação de opióides endógenos na obesidade (Ramzan et al., 1993). Também em ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) e ratos Wistar-Kyoto (WKYs), durante a ingestão de dietas palatáveis, houve aumento da latência para retirada da cauda. Aqui também foi sugerido que este tipo de dieta aumentaria os níveis de opióides em ambos SHRs e WKYs (Zhang et al., 1994). Divergências nas respostas ao estímulo térmico de retirada

de cauda podem ocorrer, uma vez que este reflexo não é puramente espinhal, envolvendo estruturas neurais em centros superiores e os mecanismos envolvidos nesta resposta não são ainda bem compreendidos (Le Bars et al., 2004).

Quanto à sensibilidade à estimulação mecânica no teste *Von Frey* eletrônico, observamos que o grupo HD apresentou maior intensidade de hipernocicepção que o grupo CD, após injeção intraplantar de carragenina. A maior sensibilidade ao estímulo mecânico em animais com indução de obesidade comparados aos animais com dieta padrão, após aplicação de Cg, poderia ser decorrente das alterações nos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias e outras substâncias bio-ativas, além da ativação simpática e dos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico envolvidos na ativação da resposta nociceptiva. Foi demonstrado em um modelo de hiperalgesia mecânica que a Cg induziu uma resposta derivada da liberação combinada de produtos da ciclooxigenase e aminas simpaticomiméticas (Nakamura & Ferreira, 1987). Também observamos que na avaliação do Edema de Pata após Cg, o grupo que recebeu ração hipercalórica mostrou maior magnitude de edema e inflamação, comparado ao grupo sem indução de obesidade. Este quadro inflamatório mais agudo nos animais obesos acompanha evidentemente o quadro de hipernocicepção mecânica mais exacerbada nestes animais.

As respostas nociceptivas e inflamatórias mais intensas e a maior hiperalgesia térmica, após a aplicação de Cg, em animais que tiveram obesidade induzida comparadas aos animais sem indução de obesidade, reforçam a hipótese de que as alterações imunológicas e endócrinas provavelmente são diferenciadas nos animais que ganharam peso em decorrência do consumo de dieta hipercalórica, comparados aos animais não obesos, alimentados com dieta padrão, em razão da presença de fatores liberados pelo tecido adiposo, envolvidos nestas respostas. A inibição da produção e da

ação central e periférica de neurotransmissores e neuromoduladores parece constituir-se em alvo importante para o controle da dor inflamatória em humanos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Podemos concluir que, as possíveis diferenças endócrinas e metabólicas ocasionadas pela obesidade induzida por dieta, levou os animais do grupo HD a sofrerem alterações nos perfis nociceptivo e inflamatório, tornando-os mais responsivos aos efeitos de agentes algogênicos, como a carragenina, nos testes de avaliação da nocicepção aguda e edema inflamatório.

São ainda necessárias novas investigações que comprovem a relação entre o estado inflamatório crônico, proveniente da sobrecarga de tecido adiposo pelo consumo de dieta hipercalórica e as possíveis alterações nos quadros nociceptivo e inflamatório nestes animais e em humanos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas KA, Pober JS (2000). Effectors mechanisms of immune responses. In: Abbas KA, Pober JS, editors. *Cellular and molecular immunology*. 4th ed. Philadelphia: Saunders; Vol.1, p. 553.

Aggarwal, BB & Puri, RK (1995). Common and uncommon features of cytokines and cytokines receptors: an overview. In B. B. Aggarwal, & R. K. Puri (Eds.), *Human cytokines their role in disease and therapy* vol. 1. (pp. 3–24). Ann Arbour: Blackwell Science.

Albright, AL & Steen, JS (1998) Adipose tissue. *Encyclopedia of Sport Medicine and Science*, May.

Archer, J (1973). Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Animal Behavior* 21, 205–235.

Asfaha S, Brussee V, Chapman K, Zochodne DW, Vergnolle N (2002). Proteinase-activated receptor-1 agonists attenuate nociception in response to noxious stimuli. *Br J Pharmacol* 135(5):1101-6

Baggiolini, M (2001). Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 250(2), 91–104.

Banks WA, Jumbe NL, Farrell CL, Niehoff ML, Heatherington AC (2004). Passage of erythropoietic agents across the blood-brain barrier: a comparison of human and murine erythropoietin and the analog darbepoetin alpha. *Eur J Pharmacol*.505(1-3):93-101.

Barnes MJ, Lapanowski K, Conley A, Rafols JA, Jen KLC, Dunbar JC (2003). High fat feeding is associated with increased blood pressure, sympathetic nerve activity and hypothalamic opioid receptors. *Brain Res Bull*. 61:511-9.

Bélanger-Ducharme F, Tremblay A (2005). Prevalence of obesity in Canada. *Obes Ver* 6:183-186.

Björntorp P (1997). Body fat distribution, insulin resistance, and metabolic diseases. *Nutrition* 13(9):795–803.

Blackwell, TS & Christman, JW (1996). Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth* 77(1), 110–117.

Blass E, Fitzgerald E, Kehoe P (1987). Interactions between sucrose, pain and isolation distress. *Pharmacol Biochem Behav* 26: 483–9.

Borst SE, Conover CF (2005). High-fat diet induces increased tissue expression of TNF- α . *Life Sciences* 77:2156-2165.

Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA (2004). Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Com Physiol* 287(4):R943-R949.

Boustany-Kari CM, Gong M, Akers WS, Guo Z, Cassis LA (2006). Enhanced vascular contractility and diminished coronary artery flow in rats made hypertensive from diet-induced obesity. *Int J Obes.* 14:778-86.

Broberger C (2002). Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. *J Int Med* 258:301-327.

Buchenauer T, Behrendt P, Bode FJ, Horn R, Brabant G, Stephan M, Nave H (2009). Diet induced obesity alters behavior as well as serum levels of corticosterone in F344 rats. *Physiol Behav.* Dec 7;98(5):563-9. Epub 2009 Sep 12.

Bunag RD, Meyer M, Vansell N, Kerecsen L (1996). Conscious obese rats have impaired reflex bradycardia and enhanced norepinephrine sensitivity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 271: R654-R660.

Cannow B & Nedergaard J (2004) Brown adipose tissue: Function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 84:272 – 359.

Carroll JF, Zenebe WJ, Strange TB (2006) Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension* 48(1):65-72.

Castro, J. M. & Plunket, S (2002) A general model of intake regulation. *Neuroscience and behavior Reviews* 26: 581 – 595.

Cizza G, Ravn P, Chrousos GP, Gold PW (2001). Depression: a major, unrecognized risk factor for osteoporosis? *Trends Endocrinol Metab* 12(5):198-203.

Considini RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR (1996). Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 334(5):292-5.

Couillard C, Bergeron N, Prud'homme D (1999). Gender difference in postprandial lipemia: importance of visceral adipose tissue accumulation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 19(10):2448–2455.

Cowley MA., Smith RG., Diano MS (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis, *Neuron* 37:649-661.

Crofford LJ, Wilder RL, Ristimaki AP, Sano H, Remmers EF, Epps HR, Hla T (1994) Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest* 93(3):1095-101.

Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH (1992). The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 107(3):660-4.

Cunha TM, Verri WA, Schivo I, Napimoga MH, Parada CA, Poole S, Teixeira MM, Ferreira SH, Cunha FQ. (2008). Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J Leukocyte Biology* 83:824-832.

Cunha TM, Verri WA, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH (2005). A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Br J Pharmacol* 102(5):1755-1760.

Dantzer R (2001) Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Ann NY Acad Sci* 933, 222-34.

Dantzer R, Kelley KW (2007). Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav Immun* 21(2):153-60.

Defronzo RA, Cooke CR, Andres R, Faloona GR, Davis PJ (1975). The effects of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium, and phosphate in man. *J Clin Invest.*55:845-55.

Dinarello CA (1984). Interleukin 1 as mediator of the acute-phase response. *Surv Immunol Res* 3(1), 29–33.

Dinarello CA (1998). Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol* 16(5-6):457-99.

Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS (2004). Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest* 114:57-66

Dunn AJ, Swiergiel AH, De Beaupaire R (2005). Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? *Neurosci Biobehav Rev.* 29(4-5):891-909.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ (2005). The metabolic syndrome. *Lancet.* 365:1415-28.

Eddy NB, Touchberry CF, Lieberman JE (1950). Synthetic analgesics I Methadone isomers and derivatives. *Pharmacol Exp Ther.* 98,p.121-137.

Eddy NB, Leimbach D (1953). Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exp Ther.* 107, p.385-393.

Esteve M, Immaculada R, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M (1994). Effects of a cafeteria diet on energy intake and balance in Wistar rats. *Physiol Behav.* 56:65-71.

Fantuzzi G (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* May;115(5):911-9; quiz 920. Review.PMID: 15867843.

Ferreira SH, Cunha FQ, Lorenzetti BB., Michelin MA, Perretti M, Flower RJ & Poole S. (1997) *Br. J. Pharmacol.* 121 , 883–888. pmid:9222544.

Ferreira SH, Lorenzetti BB, Bristow AF, Poole S (1988). Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature* 334(6184):698-700.

Ferreira SH, Lorenzetti BB, Poole S (1993). Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*. Nov;110(3), p.1227-1231.

Fliers E, Kreier F, Voshell P J (2003). White adipose tissue: getting nervous. *J of Neuro Endocrinol* 15: 1005 – 1010.

Fitzgerald SM, Henegar JR, Brands MW, Henegar LK, Hall JE (2001). Cardiovascular and renal responses to a high-fat diet in Osborne-Mendel rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281:H547-52.

Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MC, Lima FB (2006). The Adipose Tissue as a Regulatory Center of the Metabolism. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol 50 n° 2 Abril.

Friedmann J M, Halaas JL (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 395(22):763-70.

Guneli E, Gumustekin M, Ates M (2010). Possible involvement of ghrelin on pain threshold in obesity. *Med Hypotheses*. Mar;74(3):452-4.

Handwerker HO (1983). Assessment of experimentally induced pain. Old and new methods. *Am J Med*. Nov. 75(5A), p.15-18.

Himms-Hagen J (1984). Nonshivering thermogenesis. *Brain Res Bull*12:151-160.

Himms-Hagen J, Triandafillou J, William GC (1981). Brown adipose tissue of cafeteria-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 241:E116-E120.

Hogg S (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54 (1), 21-30.

Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K (2000). Purification and characterization of rat des-Gln 14- Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem* 275(29):910-13.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Scienc*; Jan 1;259(5091):87-91.

Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP (1983). Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation*. May;67(5):968-77.

Hunnskaar S, Berge OG, Hole K (1986). A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. *Behav Brain Res*. 21(2), p.101-108.

Isaacs A & Lindenmann J (1957). Virus interference: I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147(927), 258–267.

Jones AP, Webb LM, Anderson AO, Leonard EJ, Rot A. Normal human sweat contains interleukin-8. *J Leukoc Biol*. 1995;57(3):434-7.

Kanaan SA., Safieh-Garabedian B. Haddad JJ, Atweh SF, Abdelnoor AM, Jabbur SJ & Saade NE (1997) *Pharmacology* 54 , 285–297. pmid:9286812.

Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G (2001). Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *American Journal of Physiology* 280(5):E745–E751.

Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB (1995). The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *Journal of Clinical Investigation*. 95(5):2111–2119.

Kershaw E & Flier JS (2004). Adipose tissue as an endocrine organ *J Clin Endoc Metab* 89: 2548– 2556.

Khasar SG, McCarter G & Levine JD (1999) *J. Neurophysiol.* 81 , 1104–1112. pmid:10085337.

Kluger MJ (1991). Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol Ver* 71(1):93-127.

Kobayasi R., Akamine EH., Davel AP, Rodrigues MA, Carvalho CO, Rossoni LV (2010). Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. *Journal of Hypertension* 28:2111-2119.

Kojima M, Hosoda H, Date Y (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 402:656-60.

Kuraishi Y. et al. (1983). Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. *Brain Research*, 273: 245-252.

Lafrance V, Inoue W, Kan B, Luheshi GN (2010). Leptin modulates cell morphology and cytokine release in microglia. *Brain Behav Immun*. Mar;24(3):358-65. Epub 2009 Nov 14.

Lavich TR, Cordeiro RS, Silva PM, Martins MA (2005). A novel hot-plate test sensitive to hyperalgesic stimuli and non-opioid analgesics. *Braz J Med Biol Res*, marc, 38(3),p.445-451.

Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW (2004). *Animal Models of Nociception* INSERM U-161, Paris, France (D.L.B.); Laboratoires UPSA Bristol-Myers-Squibb, La Grande Arche Nord, Paris La De´fense, France 355:45–8.

Lee S, Kuk JL, Katzmarzyk PT, Blair SN, Church TS, Ross R (2005). Cardiorespiratory fitness attenuates metabolic risk independent of abdominal subcutaneous and visceral fat in men. *Diabetes Care*, Apr;28(4):895-901.

Leidy HJ, Gardner JK, Frye BR, Snook ML, Schuchert MK, Richard EL (2004). Circulating ghrelin is sensitive to changes in body weight during a diet and exercise program in normal weight young women. *J Clin Endocrinol Metabol*, 89(6):2659-64.

Le Lay S, Krief S, Farnier C, Lefrère I, Le Liepvre X, Bazin R, Ferré P, Dugail I (2001). Cholesterol, a cell size-dependent signal that regulates glucose metabolism and gene expression in adipocytes. *J Biol Chem* 276:16904-16910.

Levin BE (1994). Diet cycling age alters weight gain and insulin levels in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 267(2 pt 2):R527-R532.

Levin BE, Dunn-Meeynell AA, Balkan B, Keeseey RE (1997). Selective breeding for diet induced obesity and resistance in Sprague Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273(2 pt 2):R725-R730.

Licinio JW (2003). Cytokines pathways in the brain. In: Kronfol Z, editor. *Cytokines and mental health*. Boston: Kluwer: Vol.1, 426p

Lima DC, Silveira SA, Haibara AS, Coimbra CC (2008). The enhanced hyperglycemic response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex. *Metab. Brain Dis* 23:361-373.

Lorenzetti BB, Veiga FH, Canetti CA, Poole S, Cunha FQ & Ferreira SH (2002). Citokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. *Eur. Cytokine Network* 13(4), 456–461.

Marin Bivens CL, Olster DH (1999). Opioid receptor blockade promotes weight loss and improves the display of sexual behaviors in obese Zucker female rats. *Pharmacol Biochem Behav* (3):515-520.

Messerli FH, Ventura HO, Reisin E, Dreslinski GR, Dunn FG, MacPhee AA, Frohlich ED (1982). Borderline hypertension and obesity: two prehypertensive states with elevated cardiac output. *Circulation*. Jul;66(1):55-60.

Millan MJ (1999) *Prog. Neurobiol.* 57 , 1–164. pmid:9987804.

Miller AW, Sims JJ, Canavan A, Hsu T, Ujhelyi MR (1999). Impaired vagal reflex activity in insulin-resistant rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 33(5):698-702.

Morris, CJ (2003). Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse in: Winyard, pg and Willoughby, da. *Methods in Molecular Biology, Inflammation Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, vol. 225, p.115-121.

Nakamura M, Ferreira SH (1987). A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharm.* 135, p.145-153.

Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, 409(6817):194-8.

Okere IC, Chandler MP, McElfresh TA, Rennison JH, Sharov V, Sabbah HN (2006). Differential effects of saturated and unsaturated fatty acid diets on cardiomyocyte apoptosis, adipose distribution, and serum leptin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 291:39-44.

- Park SY, Lee YJ, Kim HJ, Doh KO, Lee SK (2000). Change in activity of the sympathetic nervous system in diet induced obese rats. *J Korean Med Sci* 15(6):635-640.
- Pausova Z (2006). From big fat cells to high blood pressure: a pathway to obesity-associated hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*; 15:173-8.
- Plata-Salamán CR., Peloso E, Santinoff E (1998). Cytokine-induced fever in obese (*fa/fa*) and lean (*Fa/Fa*) Zucker rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 275:1353-1357.
- Pellow S, Chopin P, File SE & Briley M (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neuroscienc. Methods*, 14, 149-167.
- Pohl J, Woodside B, Luheshi GN (2009). Changes in hypothalamically mediated acute-phase inflammatory response to lipopolisaccharide in diet-induced obese rats. *Endocrinology*; Nov 150(11):4901-10.
- Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, Eckel RH (2006). Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. May;26(5):968-76. Review.
- Poole S, Cunha FQ & Ferreira SH (1999). *Cytokines and Pain*, eds. Watkins, L. R. & Maier, S. F. (Springer, Berlin), pp. 59–87.
- Prado WL, Lofrano MC, Oyama LM, Damaso AR (2009). Obesidade e Adipocinas Inflamatórias: Implicações Práticas para a Prescrição de Exercício. *Rev Bras Med Esporte*, 15(5):378-383.
- Ramzan I, Wong BK, Corcoran GB (1993). Pain sensitivity in dietary-induced obese rats. *Physiol Behav*; Sep;54(3):433-5.
- Relling DP, Esberg LB, Fang CX, Johnson WT, Murphy EJ, Carlson E (2006). High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. *J Hypertens*; 24:549-61.

Ren J (2004). Leptin and hyperleptinaemia – from friend to foe for cardiovascular function. *J Endocrinol*; 181:1-10.

Ribeiro RA, Vale ML, Ferreira SH & Cunha FQ (2000). *Eur. J. Pharmacol.* 391 , 97–103. pmid:10720640.

Roane DS, Porter JR (1986). Nociception and opioid-induced analgesia in lean (Fa/Fa) and obese (fa/fa) Zucker rats. *Physiol Behav* 38:215-218.

Rosicka M, Krsek M, Matoulek Z, Jarkovska Z, Marek J, Justova V (2003). Serum ghrelin levels in obese patients: the relationship to serum leptin levels and soluble leptin receptors levels. *Physiol Res.* 52(1):61-6.

Sandoval DA, Davis SN (2003). Leptin: metabolic control and regulation. *J Diab Compl.* 17(2): 108-13.

Savernini N (2006). Eficácia Antinociceptiva e Antiedematogênica do Ultra-som Terapêutico(Modo Pulsado) na resposta inflamatória aguda, em ratos. Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação.

Sclafani A, Springer D (1976). Dietary obesity in adults rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol Behav.* 17:461-71.

Sibilia V, Lattuada N, Rapetti D (2006). Ghrelin inhibits inflammatory pain in rats:involvement of the opioid system. *Neuropharmacology* 51(3):497-505.

Shir Y, Zeltser R,Vatine JJ, Carmi G, Belfer I, Zangen A (2001). Correlation of intact sensibility and neuropatic pain-related behaviors at eight inbred and outbred rat strains and selection lines. *Pain*; 90(1-2):75-82.

Silverman MN, Pearce BD, Biron CA, Miller AH (2005). Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. *Viral Immunol*; 18(1):41-78.

Sommer C & Kress M (2004). Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci. Lett.* 361 , 184–187. pmid:15135924.

Sternberg EM, Young WS 3rd, Bernardini R, Calogero AE, Chrousos GP, Gold PW, Wilder RL (1986). A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 86(12):4771-5

Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A (2003). Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes.* 52:2882-7.

Tschop M, Smiley DL, Heiman ML (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*; 407(6806): 908-13.

Ukkola O, Poykoo S (2002). Ghrelin, growth and obesity. *Ann Med*; 34(2):102-8.

Verri WA, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira S (2006). Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *Pharmacology & Therapeutics* 112; 116–138

Vierhapper H, Heinze G, Nowotny P, Bieglmayer C (2003). Leptin and the control of obesity *Metabolism*; 52(3):379-81.

Vilcek J (2003). The cytokines: an overview. In: Thompson MT, editor. *The cytokines handbook*. 4th ed. Amsterdam: Elsevier; Vol.1, p. 3.

Vivancos GG, Verri Jr. WA, Cunha TM, Schivo IRS, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH (2004). An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz J Med Biol Res* 37(3).

Wang CC, Goalstone ML, Draznin B (2004). Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes*; 53:2735-40.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* Dec;112(12):1796-808.

Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P (2003). A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr*; 133:1081-7.

Zhang T, Reid K, Acuff CG (1994). Cardiovascular and analgesic effects of a highly palatable diet in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Pharmacol Biochem Behav*; 48: 57–61.

Zucali JR, Dinarello CA, Oblon DJ, Gross MA, Anderson L, Weiner RS (1986). Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E2. *J Clin Invest* 77(6):1857-63.

