

**Efeitos da indução de dislipidemia sobre os parâmetros comportamentais e memória em ratos *wistar* adultos**

**Effects of the induction of dyslipidemia on the behavioral parameters and memory in *wistar* adult rats**

**Efectos de la inducción de dislipidemia en parámetros de comportamiento y memoria en ratas *wistar* adultas**

Recebido: 01/06/2020 | Revisado: 03/06/2020 | Aceito: 04/06/2020 | Publicado: 16/06/2020

**Carolina da Silva Ponciano**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7359-0679>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: [carol2ponciano@gmail.com](mailto:carol2ponciano@gmail.com)

**Mikaelle Albuquerque de Souza**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7884-2652>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: [mikaelleas@gmail.com](mailto:mikaelleas@gmail.com)

**Juliana Késsia Barbosa Soares**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4234-1490>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: [julianakessia2@gmail.com](mailto:julianakessia2@gmail.com)

**Roberta Cristina de França Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6372-7181>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: [robertasaron@gmail.com](mailto:robertasaron@gmail.com)

**Shirleyne Carla Alves de Oliveira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4567-3829>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: [shirleyneoliveira8@gmail.com](mailto:shirleyneoliveira8@gmail.com)

**Jaielson Yandro Pereira da Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9297-654X>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: [jaielson@hotmail.com](mailto:jaielson@hotmail.com)

**Mayara Queiroga Estrela Abrantes Barbosa**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5363-1741>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: [mayara.queirogab@gmail.com](mailto:mayara.queirogab@gmail.com)

## **Resumo**

Transtornos de depressão e ansiedade podem ter efeitos fisiológicos e comportamentais que podem estar ligados à doença cardíaca ou, mais amplamente, às condições metabólicas, como obesidade, síndrome metabólica e dislipidemias. O presente estudo teve como objetivo avaliar a repercussão da dislipidemia induzida por uma emulsão lipídica de alto teor de gordura (EATG) utilizando metodologia modificada sobre os parâmetros comportamentais e memória de ratos *wistar* adultos. Os animais foram distribuídos em dois grupos: Grupo Controle – GC (n =10) e grupo dislipidêmico – GCD (n= 8). O grupo GCD foi tratado com EATG, via gavagem 1mL/100g de peso, durante duas semanas, após indução receberam dieta padrão comercial por mais 4 semanas. GC foi submetido à mesma condição de gavagem, sendo administrada água destilada na mesma proporção. Foram analisados parâmetros bioquímicos, gorduras viscerais, parâmetros de ansiedade e memória a curto prazo. Quanto ao efeito do protocolo indutor da dislipidemia, observou-se que o tratamento com EATG com substituição parcial de colesterol por gema de ovo foi capaz de induzir a dislipidemia. Quanto aos resultados no teste de campo aberto nenhum parâmetro apresentou diferença estatística e no teste de labirinto em cruz elevado apenas o parâmetro rearing apresentou diferença estatística. No reconhecimento de objetos quando comparados os grupos, não houve diferença estatística. Portanto, tais resultados demonstram que a nova metodologia foi capaz de induzir dislipidemia, mas não foi capaz de induzir alterações no comportamento de ansiedade e memória dos animais.

**Palavras-chave:** Ansiedade; Gema de ovo; Colesterol.

## **Abstract**

Depression and anxiety disorders may have physiological and behavioral effects that may be linked to heart disease or, more broadly, to metabolic conditions such as obesity, metabolic syndrome and dyslipidemias. The present study had as objective to evaluate the repercussion of lipid emulsion induced by a high fat lipid emulsion (EATG) using modified methodology on the behavioral parameters and memory of adult *wistar* rats. The animals were divided into two groups: Control Group - GC (n = 10) and dyslipidemic group - GCD (n = 8). The GCD

group was treated with EATG, via gavage 1mL / 100 g of weight, for two weeks, after induction received standard commercial diet for another 4 weeks. The GC was submitted to the same gavage condition, distilled water being administered in the same proportion. We analyzed biochemical parameters, visceral fats, anxiety parameters using the open field test and the Labyrinth in High Cross and for short term memory evaluation; the object recognition test was performed using the open field apparatus. As for the effect of the protocol inducing dyslipidemia, it was observed that treatment with EATG with partial substitution of cholesterol by egg yolk was able to induce dyslipidemia. Regarding the results in the open field test, no parameter presented statistical difference and in the high cross maze test only the rearing parameter presented statistical difference. In the recognition of objects when comparing the groups, there was no statistical difference. Therefore, such results demonstrate that the new methodology was able to induce dyslipidemia but was not able to induce changes in the anxiety and memory behavior of the animals.

**Keywords:** Anxiety; Egg yolk; Cholesterol.

### **Resumen**

Los trastornos de depresión y ansiedad pueden tener efectos fisiológicos y de comportamiento que pueden estar relacionados con enfermedades del corazón o, más ampliamente, con afecciones metabólicas, como la obesidad, el síndrome metabólico y la dislipidemia. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el impacto de la dislipidemia inducida por una emulsión de lípidos con alto contenido de grasa (EATG) utilizando una metodología modificada sobre los parámetros de comportamiento y la memoria de las ratas wistar adultas. Los animales se dividieron en dos grupos: Grupo de control - CG (n = 10) y Grupo dislipidémico - GCD (n = 8). El grupo GCD se trató con EATG, a través de una sonda de 1 ml / 100 g de peso, durante dos semanas, después de la inducción, recibieron una dieta estándar comercial durante otras 4 semanas. GC se sometió a la misma condición de sonda, con agua destilada administrada en la misma proporción. Se analizaron parámetros bioquímicos, grasas viscerales, parámetros de ansiedad y memoria a corto plazo. Con respecto al efecto del protocolo inductor de dislipidemia, se observó que el tratamiento con EATG con reemplazo parcial de colesterol por yema de huevo pudo inducir dislipidemia. En cuanto a los resultados en la prueba de campo abierto, ningún parámetro mostró diferencia estadística y en la prueba de laberinto elevado más solo el parámetro de crianza mostró diferencia estadística. En el reconocimiento de objetos al comparar grupos, no hubo diferencia estadística. Por lo tanto, tales resultados demuestran que la nueva metodología fue capaz de inducir dislipidemia, pero

no fue capaz de inducir cambios en el comportamiento de ansiedad y memoria de los animales.

**Palabras llave:** Ansiedad; Yema; Colesterol.

## 1. Introdução

A dislipidemia é caracterizada por concentrações anormais de lipídios ou lipoproteínas no sangue, as lipoproteínas são estruturas macromoleculares que facilitam o transporte de lipídios na circulação. Tal patologia pode ser classificada como primária, quando de origem genética, causada pela desordem da síntese e degradação de lipídios; e dislipidemia secundária, ocasionada em decorrência de outras patologias ou uso de medicamentos (Pereira, 2017).

Em modelo animal, a indução de dislipidemia pode ser realizada pela oferta por um determinado período, de uma dieta com quantidade maior que o recomendado no valor de lipídios e/ou carboidratos, podendo esta dieta ser administrada via gavagem ou por meio da substituição de componentes da ração animal (Duan, Zhao, Ji, Cao, Chen & Verma, Sharma, 2014, 2015). Além disso, é possível adicionar componentes que facilitem a absorção de lipídios como o uso de ácidos biliares (Xu et al., 2012). A eficácia desse método se relaciona diretamente com a forma e período em que a aplicação é realizada, assim como depende também da fisiologia dos animais utilizados.

As alterações lipídicas sanguíneas contribuem para elevar o risco de se desenvolver doenças cardiovasculares, hiperglicemia, resistência insulínica, esteatose hepática, obesidade, diabetes mellitus, hipertensão e acidente vascular cerebral, todos estes fatores podem contribuir para danos neurológicos e funcionais do indivíduo (Duan et al., & Verma, Sharma, 2014, 2015). Entre as alterações neurológicas destaca-se o transtorno de ansiedade, que é considerado como doença crônica, associado a uma morbidade relativamente alta e que pode comprometer a qualidade de vida e levar a altos custos financeiros. A ansiedade é ocasionada por situações consideradas como ameaçadoras e de acordo com as mudanças ambientais pode ter níveis aumentados ou reduzidos. A mesma se relaciona com o medo e estresse, presente nas reações de defesa dos animais quando se encontram em uma situação de perigo no seu meio ambiente (Margis, Picon, Cosner, & Silveira, 2003).

Os transtornos de depressão e ansiedade podem ter efeitos fisiológicos e comportamentais que podem estar ligados à doença cardíaca ou, mais amplamente, às condições metabólicas. Estudos com humanos encontraram associações entre depressão e

síndrome metabólica, que é um conjunto de fatores de risco, incluindo obesidade, resistência à insulina e colesterol alto, que aumentam o risco cardiovascular (Nishina, Nishina, Ohira, Makino & Iso, 2011). Estudo com humanos demonstrou que a hiperlipidemia foi associada ao aumento do risco de ansiedade / depressão de início recente nos pacientes com câncer de cabeça e pescoço (Chung Huang et al., 2017). Os estudos experimentais em animais também têm demonstrado associação entre síndrome metabólica, obesidade e a ansiedade (Apyratin et al., 2017), porém diferentes protocolos de indução destas patologias são adotados. Além de ser um dos fatores que aumentam os riscos de desenvolvimento de doenças metabólicas, o consumo excessivo de gorduras também compromete as estruturas neurais que possuem a função de formar, armazenar e lembrar memórias.

Existem estudos experimentais demonstrando a relação entre doenças como obesidade e síndrome metabólica com a ansiedade, porém são escassos os estudos que avaliaram a influência da dislipidemia induzida por emulsões lipídicas com alto teor de gordura sobre parâmetros comportamentais e memória em animais adultos. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficácia de um novo protocolo de indução da dislipidemia e seu efeito sobre os parâmetros comportamentais e memória de ratos *wistar* adultos.

## **2. Metodologia**

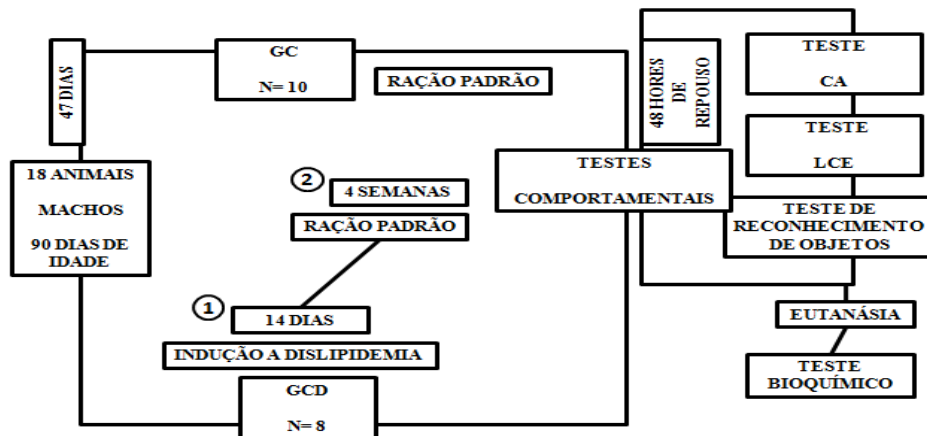
O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX) e no Laboratório de Bromatologia (LABROM) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Cuité-PB.

### **Material**

Os componentes utilizados para elaboração da Emulsão com Alto Teor Lipídico (EATG) foram o ácido biliar, colesterol, glicerol, gema de ovo liofilizada, banha de porco e o fármaco Propilracil®, foram adquiridos no comércio local das cidades de Campina Grande-PB e Cuité-PB. A água destilada utilizada no experimento foi disponibilizada pelo Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Cuité-PB.

### **Animais e dietas experimentais**

**Figura 1-** Delineamento da pesquisa.



**Fonte:** Autores.

Foram utilizados 18 ratos machos adultos da linhagem *wistar* com cerca de 90 dias de idade, provenientes do Biotério de Criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) com peso entre 200-250g. Os animais foram alojados em gaiolas metabólicas individuais, com temperatura ambiente de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , com ciclo claro-escuro constante (12 horas cada), umidade de  $\pm 65\%$ , recebendo ração labina comercial e água *ad libitum* disponível em garrafas de polietileno com bicos de inox, durante 45 dias. Inicialmente foi induzida a dislipidemia nos animais durante duas semanas.

Os animais foram divididos em dois grupos: Grupo Controle (GC) com 10 animais, que receberam ração padrão (labina comercial da marca Presence) e gavagem com água destilada; Grupo Dislipidêmico (GCD) com 8 animais que receberam ração padrão (labina comercial) e emulsão EATG durante 14 dias. Após esse período, os dois grupos receberam ração labina comercial e água destilada via gavagem por mais quatro semanas. A exposição ao método de gavagem permaneceu para que os animais continuassem sob o mesmo estresse durante todo o experimento.

### **Indução de dislipidemia**

A indução da dislipidemia foi realizada pelo tratamento com uma EATG utilizando o protocolo de Xu et al. (2012) com adaptações (Tabela 1) para proporcionar menor custo de utilização, onde foi adicionada a gema de ovo liofilizada para substituição e concentração de colesterol.

A EATG foi administrada via gavagem, uma vez ao dia por volta das 8 horas da manhã, durante 14 dias de experimento. A quantidade de emulsão que os animais receberam

foi calculada de acordo com a média de seus pesos e foi utilizada uma proporção de 1 ml de emulsão por cada 100g de peso do animal.

**Tabela 1-** Composição da emulsão de alto teor de gordura (100 mL).

<b>Componentes</b>	<b>Xu et al., 2012</b>	<b>Adaptação</b>
Colesterol puro	5 g	1,25
Glicerol	10 g	10 g
Propilracil ®	1 g	1 g
Ácido biliar	2 g	2 g
Banha de porco	40 g	40 g
Gema de ovo liofilizada	-	3,75
Água destilada	Até completar os 100 mL	Até completar os 100 mL

**Fonte:** Adaptado de Xu et al. (2012)

### **Análises bioquímicas de frações lipídicas plasmáticas e pesos das gorduras**

Ao final dos testes de comportamento os animais foram anestesiados com cloridrato de Ketamina + cloridrato de Xilasina (1mL/kg de peso). Em seguida o sangue coletado foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante utilizado para dosagem dos níveis séricos de glicose, colesterol total, HDL-colesterol, triglicerídeos, uréia, creatinina, transaminase pirúvica (TGP) e transaminase oxalacética (TGO), todos utilizando método enzimático, por meio do conjunto de diagnósticos da marca Labtest®. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Spectrophotômetro SP 1102) operando na faixa específica indicado pelo fabricante do kit. A concentração de colesterol da LDL foi calculada utilizando-se a fórmula de Friedewald, Levy, & Fredrickson (1972).

Após a eutanásia a gordura mesentérica, a gordura retroperitoneal e a gordura epididimal dos animais foram retiradas e aferidas, para posterior análise.

### **Testes comportamentais e memória**

Ao final dos 45 dias de experimento, logo após um período de repouso de 48 horas, todos os animais foram submetidos ao Teste de Campo Aberto, e no dia seguinte ao Teste de Labirinto em Cruz Elevado (Pellow, Chopin, File & Briley, 1985).

### **Teste do campo aberto**

O campo aberto é um teste utilizado para avaliar o comportamento de ansiedade e atividade exploratória (Pellow et al., 1985). Logo após o período de 48 horas de repouso, os animais foram colocados no Campo Aberto, o qual compreende uma arena circular metálica (pintada de branco) delimitada por paredes brancas com a parte superior aberta. O piso da arena, dividido em 17 campos (com linhas pintadas de preto), com 1 metro de diâmetro, subdividido em um total de 16 segmentos e um círculo central.

Cada animal foi colocado no centro do campo aberto e observado durante 10 minutos. Ocorrendo durante este período, a avaliação dos parâmetros de ambulação (número de cruzamentos dos segmentos pelo animal com as quatro patas), número do comportamento de levantar (*rearing*), e o número do comportamento de autolimpeza (*grooming*). Todas as sessões foram filmadas com câmera de vídeo instalada no teto para posterior análise dos vídeos quanto aos parâmetros de comportamento, sendo estes identificados e registrados.

### **Teste de labirinto em cruz elevado (LCE)**

O LCE é utilizado como modelo não-condicionado de ansiedade em roedores (Pellow et al., 1985). O teste consiste em colocar o animal em um LCE, elevado do solo, formado por dois braços fechados por paredes e dois abertos perpendiculares aos braços fechados.

O referido teste ocorreu 24 após o teste de Campo Aberto com os grupos experimentais. O teste ocorreu da seguinte forma: o animal foi colocado no centro do aparelho cuidadosamente com o focinho voltado para um dos braços fechados, onde foi permitido a livre exploração durante cinco minutos. Posteriormente, foram analisadas as seguintes categorias comportamentais: número de entradas nos braços fechados e abertos, tempo gasto nos braços fechados e abertos, tempo gasto na área central, número de mergulho de cabeça.

### **Teste de reconhecimento de objetos**

O Teste de reconhecimento de objetos avalia a memória declarativa, a curto e longo prazo, na qual é definida como a memória consciente de fatos e eventos, uma tarefa que reflete a memória de trabalho não espacial (Rachetti et al., 2012).

Tal teste foi realizado na área do campo aberto, descrito acima. Antes de iniciar, todos os animais foram habituados à área experimental, na ausência de qualquer estímulo comportamental específico. Em seguida ocorreu o treino, onde os animais foram colocados na arena contendo dois objetos diferentes, um definido como objeto familiar “A1” e outro como objeto novo “A2”, puderam então explorar livremente durante 10 minutos. O teste de



memória a curto prazo ocorreu 180 minutos depois, o objeto A2 foi substituído por outro “A3” e o familiar permaneceu no campo aberto, o animal foi introduzido na arena por mais 5 minutos, com o objetivo de avaliar a memória a curto prazo. As posições dos objetos (familiar e novo) foram permutadas aleatoriamente para cada animal experimental e a arena foi higienizada entre os ensaios, com álcool a 10%, respeitando um intervalo de 5 minutos (Rachetti, 2012).

A exploração foi definida como cheirar ou tocar o objeto com o focinho e/ou patas dianteiras. Sentar-se ou girar em torno do objeto não foi considerado comportamento exploratório. Os objetos e os aparelhos foram higienizados com álcool a 10% depois de cada sessão comportamental. Posteriormente, os vídeos foram analisados e os parâmetros comportamentais identificados e registrados.

### **Aspectos éticos**

A pesquisa teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Saúde e Tecnologia Rural, da Universidade Federal de Campina Grande, *campus* da cidade de Patos, na Paraíba, Protocolo CEP nº057-2016.

O protocolo experimental seguiu as recomendações éticas do *National Institute of Health Bethesda*, com relação aos cuidados com animais, sendo levado em consideração o bem-estar dos animais no laboratório, de modo que o sofrimento e o estresse dos animais experimentais foram minimizados ao máximo. Todos os procedimentos realizados com os animais estavam de acordo com as normas de vivisseção do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

### **Análises estatísticas**

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do programa estatístico *GraphPad Prism*, versão 7.0. Utilizou-se o teste *T- student*, para comparação entre os grupos. Os valores obtidos foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$ .

## **3. Resultados e discussão**

### **Análises bioquímicas**

A avaliação bioquímica foi realizada para comprovar a indução da dislipidemia nos grupos que foram tratados com emulsão com alto teor de gordura (EATG). No que diz

respeito às variáveis bioquímicas analisadas, os parâmetros Colesterol Total, Triglicerídeos, Colesterol LDL, Índice Aterogênico foram significativamente elevados no grupo GCD, comparado ao GC ( $p < 0,05$ ). Os valores de Colesterol HDL foram significativamente menores no grupo GCD, quando comparado ao grupo GC ( $p < 0,05$ ). Tais resultados comprovam que o tratamento com emulsão com alto teor de gordura (EATG) contendo gema de ovo foi eficaz para indução da dislipidemia. Além disso, observou-se que as enzimas hepáticas TGO e TGP também apresentaram valores significativamente elevados no grupo GCD, comparado ao GC ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2** –Parâmetros bioquímicos de ratos adultos tratados com EATG contendo gema de ovo liofilizada.

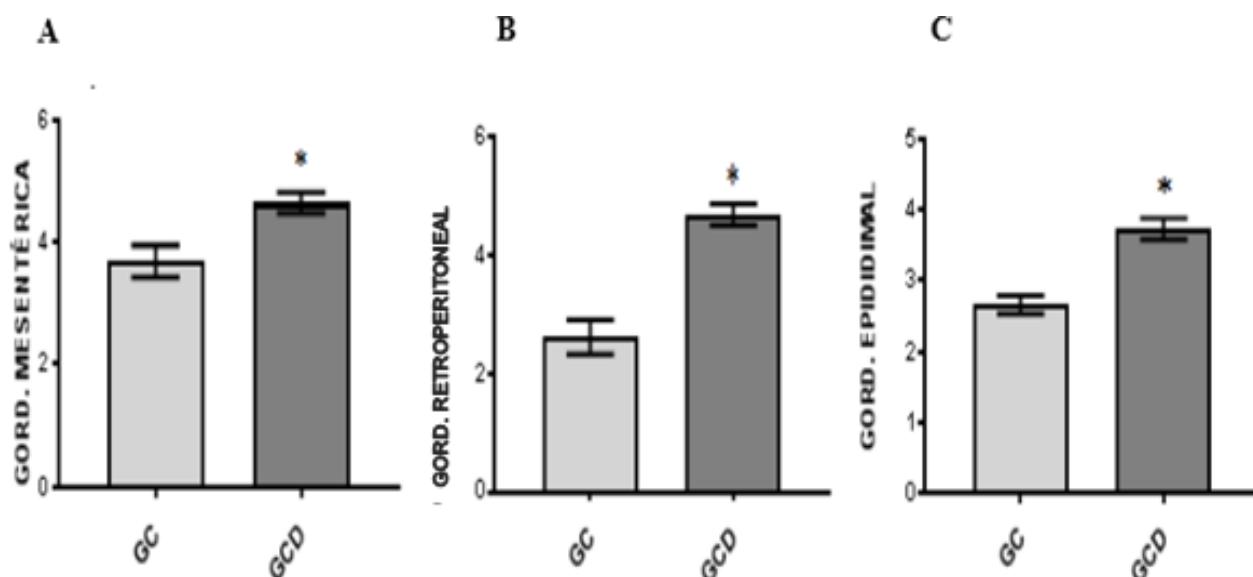
Parâmetros Bioquímicos	Grupos	
	GC	GCD
Glicose (mg/dL)	309,3 ± 2,12	323 ± 11,84, n=6
Colesterol Total (mg/dL)	50,44 ± 1,41	62,44 ± 1,45*
Triglicerídeos (mg/dL)	54,14 ± 2,59	63,38 ± 2,11*
HDL (mg/dL)	27,33 ± 1,24	18,71 ± 0,78*
LDL (mg/dL)	14,69 ± 1,41	31,51 ± 2,47*
Índice Aterogênico	0,97 ± 0,092	2,76 ± 0,14*
TGO (mg/dL)	167,6 ± 5,94	186,2 ± 2,51*
TGP (mg/dL)	46,44 ± 1,13	63 ± 1,55*
Creatinina (mg/dL)	0,69 ± 0,02	0,72 ± 0,01
Uréia (mg/dL)	45,75 ± 1,66	40,33 ± 2,28

Os valores estão expressos em média ± E.P.M. Teste t-Student, diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $*p < 0,05$ . **Fonte:** Autores.

#### **Avaliação do acúmulo de gorduras viscerais**

O peso das gorduras mesentérica, retroperitoneal e epididimal (Figura 2) do grupo GCD ( $4,64 \pm 0,17$ ), ( $4,68 \pm 0,18$ ), ( $3,74 \pm 0,15$ ), foi significativamente maior quando comparadas com o grupo GC ( $3,68 \pm 0,26$ ), ( $2,62 \pm 0,29$ ), ( $2,67 \pm 0,13$ ), respectivamente ( $p > 0,05$ ). Tais resultados indicam que, além da indução da dislipidemia observou-se acúmulo de gordura visceral.

**Figura 2-** Efeito da indução de dislipidemia sobre peso das gorduras viscerais de ratos *wistar* adultos. Os valores estão expressos em média  $\pm$  E.P.M. (n= 6/ n=7), (n= 6/ n=6), (n= 6/ n=8). Teste t-Student, diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $*p<0,05$ .



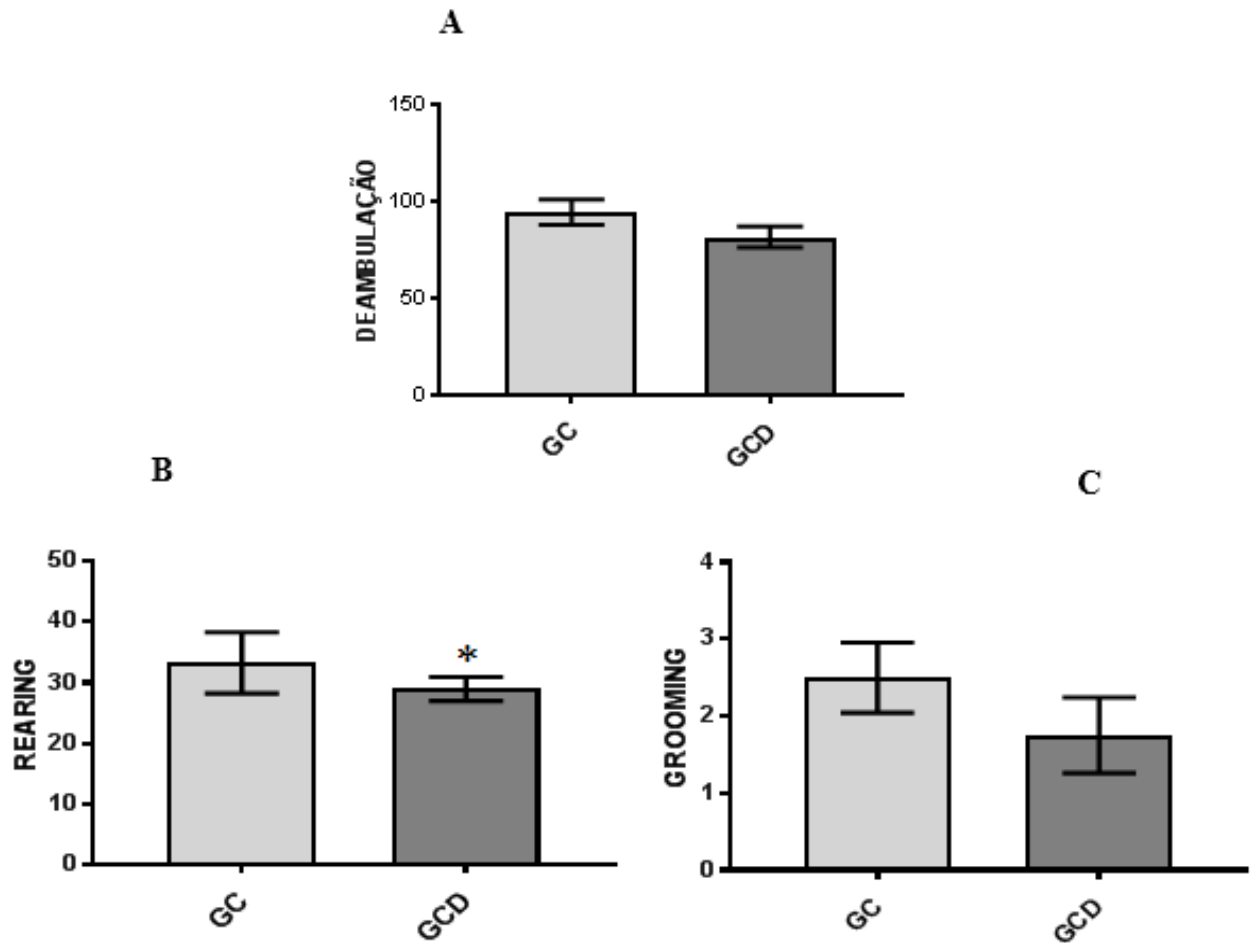
**Fonte:** Autores.

### Teste de Campo Aberto

No campo aberto, foram analisados parâmetros de deambulação, número do *rearing* (levantar), e o número de *grooming* (autolimpeza).

As análises obtidas para o parâmetro de deambulação entre o grupo controle ( $94,57 \pm 6,5$ ), e o grupo experimental ( $81,57 \pm 5,42$ ), não indicaram diferença estatística (Figura 3 A). Quando analisado o parâmetro de *rearing* (3 B), o grupo dislipidêmico ( $29 \pm 1,98$ ) apresentou um menor número no comportamento de *rearing* quando comparado ao grupo controle ( $33,3 \pm 5,02$ ). As análises obtidas para o parâmetro de *grooming* entre o grupo controle ( $2,5 \pm 0,45$ ), e o grupo experimental ( $1,75 \pm 0,49$ ), não indicaram diferença estatística (Figura 3 C).

**Figura 3-**Teste de campo aberto. Efeito da indução de dislipidemia sobre os parâmetros de deambulação (A), *rearing* (B) e *grooming* (C). Os valores estão expressos em média  $\pm$  E.P.M. Teste t-Student, diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $*p<0,05$ .

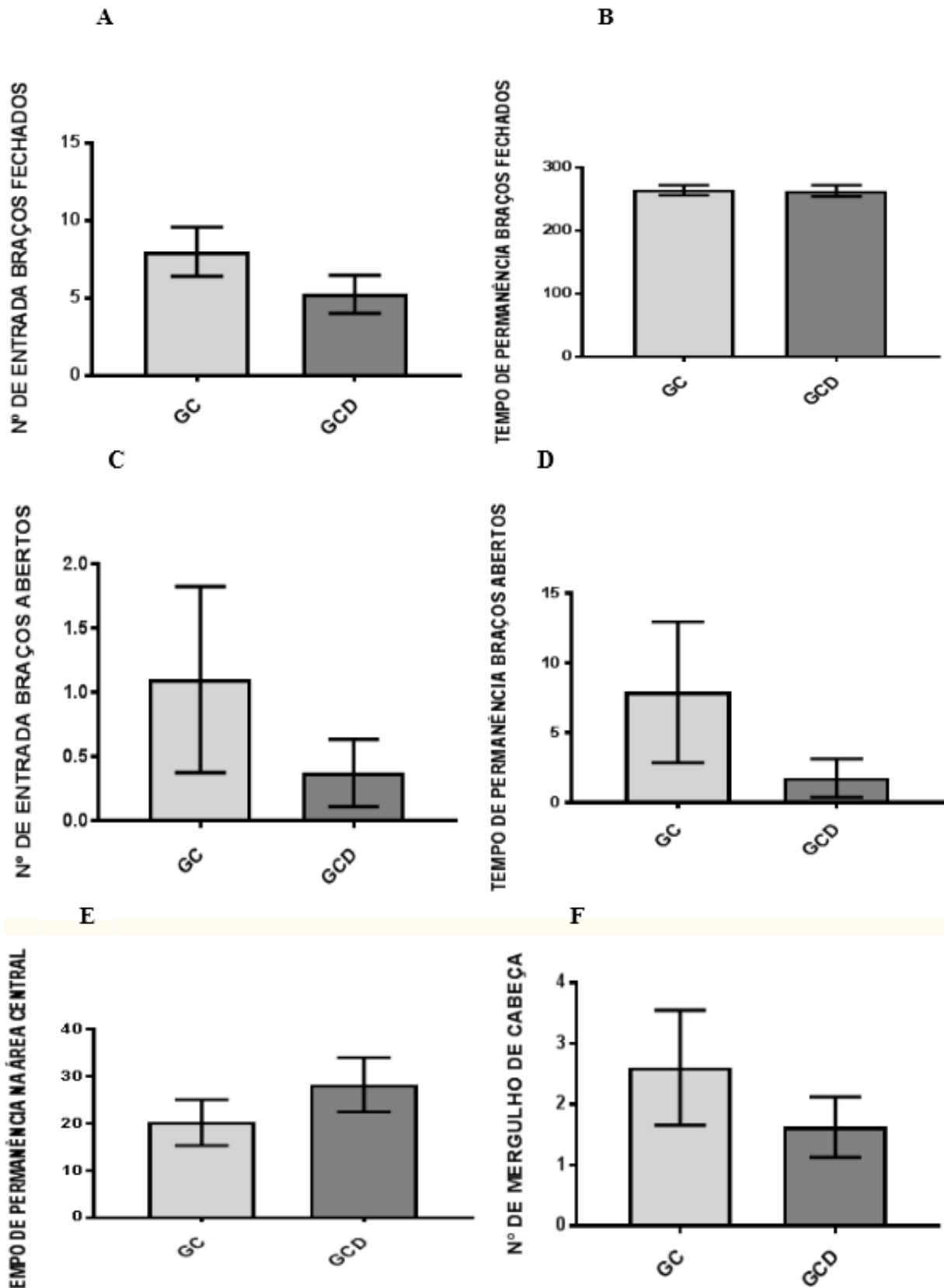


Fonte: Autores.

#### Teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

No teste do LCE, foram observados os seguintes parâmetros: número de entrada nos braços fechados, tempo de permanência nos braços fechados, número de entrada nos braços abertos, tempo de permanência nos braços abertos, tempo de permanência na área central e mergulhos de cabeça. Para todos os parâmetros avaliados não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) (Figura 4).

**Figura 4-**Teste de Labirinto em Cruz Elevado. Efeito da indução de dislipidemia sobre os parâmetros de entradas nos braços fechados (A), tempo de permanência nos braços fechados (B), número de entradas dos braços fechados (C), tempo de permanência nos braços fechados (D), tempo de permanência na área central (E) e número de mergulho de cabeça (F). Os valores estão expressos em média  $\pm$  E.P.M. Teste t-Student, diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $*p < 0,05$ .

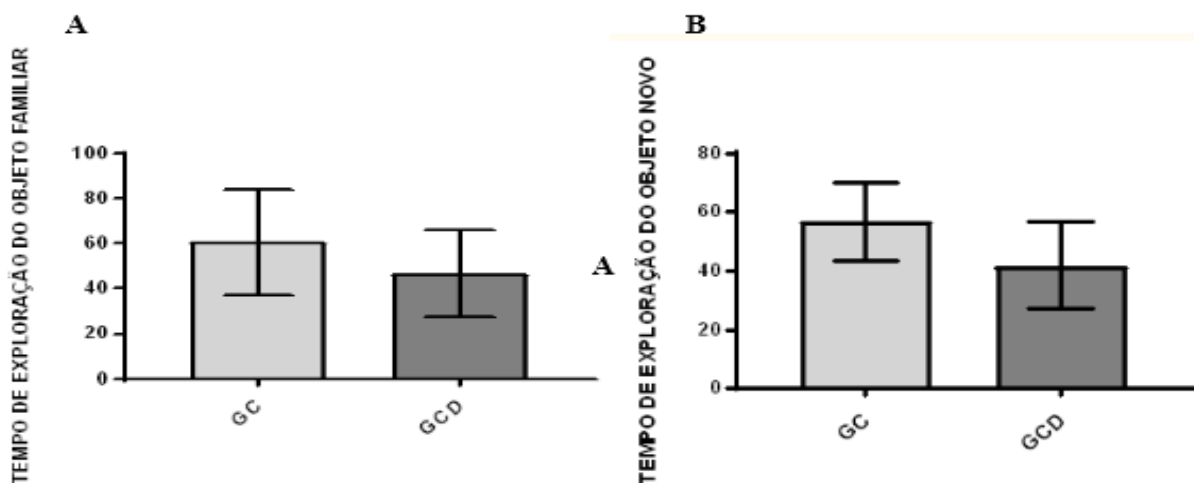


Fonte: Autores.

### Teste de Reconhecimento de Objetos

Os animais foram submetidos ao teste de reconhecimento de objetos, onde foi avaliada a memória declarativa a curto prazo, utilizando o aparelho do campo aberto. Na avaliação do tempo de exploração do objeto familiar, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos GC ( $60,8 \pm 23,41$ ) e GCD ( $46,83 \pm 19,16$ ). Também não foi observada diferença significativa ao analisar o tempo de exploração do objeto novo, GC ( $56,8 \pm 13,26$ ) GCD ( $41,83 \pm 14,68$ ) (Figura 5).

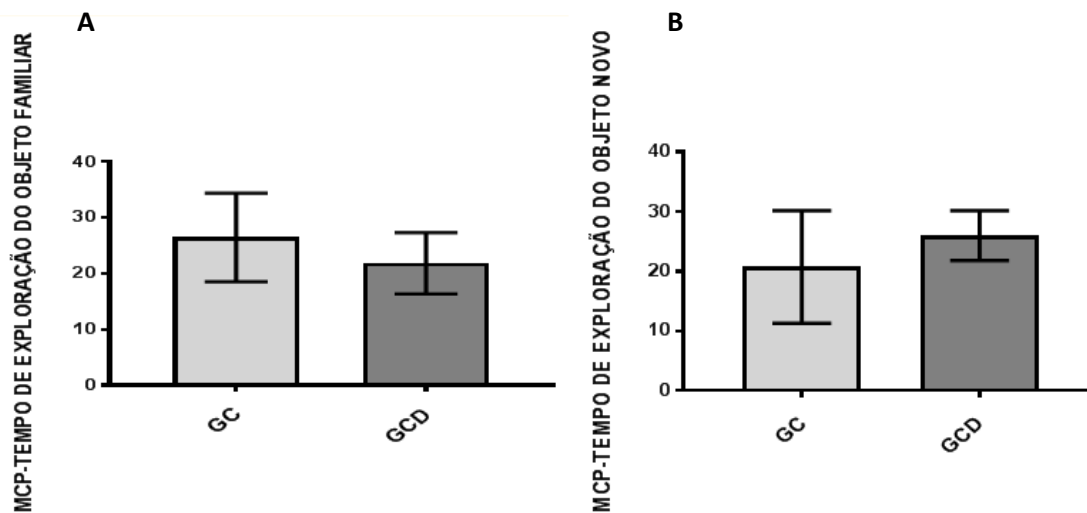
**Figura 5-**Tempo de exploração do objeto *familiar* A1 (A) e tempo de exploração *novo* A2 (B) no teste de reconhecimento de objetos em ratos *wistar* adultos. Os valores estão expressos em média  $\pm$  E.P.M. Teste t-Student, diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $*p < 0,05$ .



**Fonte:** Autores.

Na sessão de reteste, realizada 3 horas após o teste anterior, representa a memória a curto prazo dos animais, o parâmetro de reconhecimento de objeto denominado como “familiar” não apresentou diferença estatística entre os GC ( $26,5 \pm 7,96$ ) e GCD ( $21,83 \pm 5,47$ ). A avaliação do reteste de reconhecimento do objeto denominado como “novo”, também não apresentou diferença estatística GC ( $20,75 \pm 9,43$ ) GCD ( $26 \pm 4,18$ ) (Figura 6).

**Figura 6-** Reteste de reconhecimento de objeto *familiar* A1 (A) e reteste de reconhecimento de objeto *novo* A3 (B) em ratos *wistar* adultos. Os valores estão expressos em média  $\pm$  E.P.M. Teste t-Student, diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $*p < 0,05$ .



**Fonte:** Autores.

As dislipidemias são caracterizadas por alterações do metabolismo lipídico, com consequências sobre os níveis de lipoproteínas (LP) na circulação sanguínea, que levam ao surgimento de doenças crônicas cardiovasculares (DCV) e cerebrovasculares, como a aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, doença isquêmica e acidente vascular encefálico (Santos, 2016). Nas últimas décadas, a incidência de dislipidemias tem sofrido um aumento preocupante, no qual os altos níveis de lipídios no sangue têm sido diretamente associados, essa incidência se relaciona principalmente ao consumo excessivo de gorduras saturadas, que além de ser um contribuinte para o desenvolvimento de dislipidemias e doenças cardiovasculares, a longo prazo, pode afetar toda função fisiológica do corpo incluindo a saúde do cérebro (Maia, 2013).

Sabe-se que existe uma relação entre as concentrações lipídicas sanguíneas e surgimento de alterações comportamentais, tais informações são observadas em estudos experimentais com animais (Noronha, 2015). O presente estudo buscou utilizar uma nova metodologia desenvolvida a partir da substituição parcial do colesterol comercial pela gema de ovo na composição de uma Emulsão de Alto Teor de Gordura (EATG), visando propor um método indutor de dislipidemia de baixo custo. Com isso buscou-se também analisar a eficácia dessa nova metodologia através de análises bioquímicas. Constatado a dislipidemia foram avaliados os efeitos sobre os parâmetros de ansiedade e memória de ratos machos adultos da linhagem *wistar*, por meio dos testes de Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado e Reconhecimento de objetos, que são modelos de ansiedade e memória utilizados para avaliar os traços comportamentais de roedores.

As análises bioquímicas demonstraram que o colesterol total (mg/dl), triglicérides (mg/dl), LDL e índice aterogênico estavam elevados enquanto que o HDL estava baixo no grupo GCD, indicativo de instalação da dislipidemia. Os resultados obtidos comprovam que a emulsão de alto teor de gordura com gema de ovo além de promover dislipidemia, alterou os níveis de enzimas hepáticas e causou o acúmulo de gordura visceral, confirmado pelos níveis elevados de TGO e TGP, e acúmulo de gorduras mesentéricas, retroperitoneal e epididimal.

Pesquisa realizada por Nascimento (2006) observou aumento da gordura corporal, glicemia, triglicérido, VLDL e redução do HDL, com uma dieta hipercalórica contendo banha de porco como base de gordura, durante 14 semanas em animais experimentais. Vê-se então que o uso do colesterol da gema de ovo induziu a dislipidemia em um menor intervalo de tempo. Os dados corroboram também com estudo realizado por Duarte et al. (2006) que obteve aumento significativo dos tecidos adiposos de ratos *wistar* submetidos a uma dieta hiperlipídica composta por ração padrão adicionada de amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito maisena, por um período de 15 dias. A glicemia desses roedores também não demonstrou diferença. Pode-se considerar que a glicemia não obteve alteração devido ao tempo de experimento.

O aumento nos parâmetros TGO e TGP, pode ser justificado pela administração de gordura saturada que é ligada diretamente ao aumento dos níveis séricos de colesterol sanguíneo e acúmulo de gordura no fígado, devido às alterações que a gordura saturada causa no RNA mensageiro de receptores hepáticos de LDL, o que leva a redução de sua expressão, e isto ocorre devido à modificação na fluidez da membrana (Hazarika, Kalita, Kalita & Devi, 2017).

O acúmulo de gorduras viscerais pode ser desencadeado a partir da síntese de gorduras fornecidas por excesso de carboidratos e/ou gorduras saturadas na alimentação, dessa forma o aumento dessa gordura associada ou não ao aumento do peso corporal, pode aumentar a prevalência de doenças cardiovasculares. No que diz respeito ao aumento de gordura visceral, resultados semelhantes ao presente trabalho foram obtidos por Nogueira et al. (2016), que suplementou óleo de palma em ratos adultos saudáveis com o objetivo de avaliar as alterações bioquímicas, sendo observado aumento na gordura abdominal, no peso corporal, resistência à insulina, hiperglicemia, alterações da função hepática, hipertensão, estresse oxidativo e dislipidemia. Assim como o estudo realizado por Hazarika et al. (2017), que ao administrarem uma dieta com alto teor de carboidrato e de gordura saturada durante 12 semanas, a ratos saudáveis, resultou no aumento de gordura no fígado e no tecido adiposo, bem como redução da expressão do receptor de LDL. O balanço energético positivo



ocasionado pelo alto consumo de gorduras saturadas promove a lipogênese, ou seja, acúmulo de gordura no tecido adiposo, o que ocorreu no presente estudo com emulsão com gema de ovo e nos estudos citados.

Devido à semelhança entre a gênese e as respostas metabólicas e comportamentais decorrentes da obesidade e dislipidemias em humanos, o uso de dietas hiperlipídicas, hipercalóricas ou hiperglicídicas tem sido utilizado em um grande número de estudos que visam à indução das patologias citadas, dentre outras que se assemelhem fisiologicamente (Santos, 2016).

O consumo excessivo de gorduras além de contribuir para o desenvolvimento da dislipidemia, em longo prazo, pode resultar no acúmulo de lipídeos no cérebro, causando redução no volume do hipocampo, e conseqüentemente prejudicando a função cognitiva. Essas alterações podem induzir o comportamento de ansiedade, a eficiência psicomotora, causando deficiências emocionais e de resposta ao estresse, além de alterações na memória (Dutheil, Ota, Wohleb, Rasmussen, & Duman, 2016).

Os parâmetros comportamentais avaliados no teste do campo aberto não demonstraram diferença estatística, com exceção do parâmetro *rearing* que foi apresentado em menor número no grupo experimental, essa diferença pode ser vista como um efeito ansiolítico da emulsão hiperlipídica, no entanto, considera-se como um resultado isolado já que não houve diferença encontrada nos outros parâmetros do referido teste. Diferente do estudo de Noronha (2015) que ao analisar os parâmetros em conjunto, observou comportamento do tipo ansiedade no teste de campo aberto ao induzir obesidade com uma dieta hiperlipídica, que utilizou o óleo de soja e banha como base de gordura, durante 9 semanas.

No teste de Labirinto em Cruz Elevado não foram observadas alterações comportamentais para os parâmetros avaliados, sugerindo que a emulsão lipídica não induz o comportamento de ansiedade dos roedores. Os resultados obtidos no referido teste contradizem o estudo realizado por Apyratin et al. (2017), que observou o aumento do nível de ansiedade em camundongos utilizando o LCE, como resultado do consumo de uma dieta rica em gorduras, com cerca de 30% a mais que no grupo controle, que consumiu ração AIN-93. A ausência de alteração no comportamento dos animais do dito teste pode ser justificada pelo curto prazo de indução da dislipidemia. Apesar de o protocolo ter promovido significativas alterações bioquímicas e metabólicas no fígado e deposição de gorduras viscerais, quatorze dias de tratamento não induziu alterações comportamentais nestes animais.

Os resultados obtidos também podem ser justificados pela dieta normolípida a qual os animais foram submetidos pós indução da dislipidemia.

A partir do teste de memória foi observado que a EATG não alterou os parâmetros de memória a curto prazo. Pesquisa realizada por Pinto (2014) verificou que filhotes de ratas obesas que consumiam dieta hiperlípida não apresentaram diferença estatística entre a procura pelo objeto conhecido e objeto desconhecido, o qual após uma semana realizou o reteste onde foi demonstrado que o tempo de exploração dos objetos conhecido e desconhecido foram semelhantes, sugerindo que não houve diferença estatística para os parâmetros avaliados da memória, ou seja, a memória dos animais não foi influenciada pela EATG administrada.

Os resultados do presente estudo sugerem que a nova metodologia utilizada para indução de dislipidemia com EATG com substituição parcial do colesterol por gema de ovo, eleva os níveis de lipoproteínas no sangue o que caracteriza a dislipidemia, porém essa indução não levou a alterações na ansiedade e memória dos animais, provavelmente pelo curto período de indução do tratamento. É eficaz para induzir dislipidemia em animais, em um curto período, mostrando ser um método viável em estudos experimentais.

#### **4. Considerações Finais**

Diante do exposto, considerando os resultados obtidos podemos concluir que a gema de ovo em pó demonstrou ser um bom substituto parcial do colesterol em emulsão dislipidêmica e um eficaz indutor de dislipidemia em ratos *wistar* adultos, em um curto período de tempo.

Apesar de não causar efeitos significativos no comportamento e memória dos animais, a dieta experimental fornecida causou o aumento nas gorduras viscerais e alterações nas enzimas hepáticas. Neste sentido, sugerimos uma avaliação da aplicação deste protocolo na indução de modelo de síndrome metabólica para futuros estudos. Vê-se então a viabilidade de baratear pesquisas na área experimental, utilizando matérias-primas de baixo custo no desenvolvimento de pesquisas. Portanto, a metodologia utilizada é considerada como eficaz e pode vir a ser utilizada em pesquisas que busquem protocolo de dislipidemia.

## Referências

- Apryatin, S. A., Sidorova, Y. S., Shipelin, V. A., Balakina, A., Trusov, N.V., & Mazo, V. K. (2017). Atividade neuromotora, ansiedade e função cognitiva no modelo in vivo de hiperlipidemia alimentar e obesidade. *Boletim de biologia experimental e medicina*, 163 (1), 37- 41.
- Chung huang, I., Lin, L. C., Tien, H. C., Que, J., Ting, W. C., Chen, P. C., & Yang, C. C. (2017). Hyperlipidemia and statins use for ther is kof new-onset anxiety/depression in patients with head and neck cancer: A population-basedstudy. *PloSone*, 12 (3).
- Duan, L., Zhao, G., Ji, B., Cao, Y., & Chen, X. (2014). Effect of crude-herb moxibustion on blood lipids in rats with dyslipidemia. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*, 1(2), 140-147.
- Duarte, A. C. G. O., Fonseca, D. F., Manzoni, M. S. J., Soave, C. F., Sene-fiorese, M., Dâmaso, A. R., ...& Cheik, N. C. (2006). High fat diet and secretory capacity of insulin in rat. *Revista de Nutrição*, 19 (3), 341-8.
- Dutheil, D., Ota, K. T., Wohleb, E. S., Rasmussen, K., & Duman, R. S. (2016). High-fat diet induced anxiety and anhedonia: impact on brain homeostasis and inflammation. *Neuropsychopharmacology*, 41(7), 1874-1887.
- Friedewald, W.T., Levy, R.I, & Fredrickson, D.S. (1972). Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative umtra centrifuge. *Clinical Chemistry*, 18 (6), 499-502.
- Hazarika, A., Kalita, H., Kalita, M. C., & Devi, R. (2017). Withdrawal from high-carbohydrate, high-saturated-fat diet changes saturated fat distribution and improves hepatic low-density-lipoprotein receptor expression to ameliorate metabolic syndrome in rats. *Nutrition*, 38, 95-101.

Maia, G. C.H. M. (2013). Resposta à ingestão do tucumã (*Astrocaryum Aculeatum* Meyer) no tratamento da dislipidemia induzida por dieta em ratos Wistar sedentários e exercitados (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Amazonas, Manaus – AM.

Margis, R., Picon, P., Cosner, A. F., & Silveira, R. D. O. (2003). Relação entre estressores, estresse e ansiedade. *Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul*, 25 (1), 65-74.

Nascimento, A. F. (2006). Influência das dietas padrão e hipercalórica sobre o comportamento corporal e bioquímico de ratos *wistar* (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu -SP.

Ngueguim, F. T., Esse, E. C., Dzeufiet, P. D. D., Gounoue, R. K., Bilanda, D. C., Kamtchouing, P., ... & Dimo, T. (2016). Oxidised palm oil and sucrose induced hyperglycemia in normal rats: effects of *Sclerocarya Birrea* Stem barks aqueous extract. *Complementary and Alternative Medicine*, 16 (47), 1-11.

Nishina, M., Nishina, K., Ohira, T., Makino, K., & Iso, H. (2011). Associations OF PSYCHOLOGICALDISTRESS WITH metabolic syndrome among Japanese urban residents. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 18 (5), 396-402.

Noronha, S. I. S. R. (2015). Relação entre a obesidade induzida por dieta hiperlipídica e o desenvolvimento de transtornos de ansiedade em ratos Wistar (Dissertação de Pós-graduação). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto- MG.

Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14, 149-167.

Pereira, R. (2017). A relação entre Dislipidemia e Diabetes Mellitus tipo 2. *Cadernos UniFOA*, 6 (17), 89-94.

Pinto, F. R. (2014). Expressão da desidase3 no hipocampo de filhotes de ratas obesas (Dissertação de Mestrado). Universidade Presbiteriana Mackenzie, Recife-PE.

Rachetti, A. L. F., Arida, R. M., Patti, C. L., Zanin, K. A., Fernandes-Santos, L., Frussa-Filho, R., ... & Cysneiros, R. M. (2013). Fish oil supplementation and physical exercise program: distinct effects on different memory tasks. *Behavioural brain research*, 237, 283-289.

Santos, J. H. D. (2016). *Dieta de cafeteria e seu impacto em parâmetros bioquímicos preditivos da síndrome metabólica em modelo experimental* (Tese de Bacharelado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal -RN.

Verma, A. & Sharma, S. (2015). Beneficial effect of protein tyrosine phosphatase inhibitor and phytoestrogen in Dyslipidemia- Induced Vascular Dementia in Ovariectomized Rata. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 24 (11), 1-13.

Xu, D., Xu, M., Lin, L., Rao, S., Wang, J., & Davey, A. K. (2012). The effect of isosteviol on hyperglycemia and dyslipidemia induced by lipotoxicity in rats fed with high-fat emulsion. *Life Sciences*, 90 (1), 30–38.

#### **Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Carolina da Silva Ponciano – 48 %

Mikaelle Albuquerque de Souza – 12 %

Juliana Késsia Barbosa Soares – 7,5 %

Roberta Cristina de França Silva – 7,5 %

Shirleyne Carla Alves de Oliveira – 7,5 %

Jaielison Yandro Pereira da Silva – 7,5 %

Mayara Queiroga Estrela Abrantes Barbosa – 10 %