UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

RAQUEL LUNARDI BACCETTO

**Efeitos de um modelo de oferta e retirada de dieta de cafeteria sobre o
comportamento alimentar e ansiedade em ratas**

Ribeirão Preto

2016

RAQUEL LUNARDI BACCETTO

Efeitos de um modelo de oferta e retirada de dieta de cafeteria sobre o
comportamento alimentar e ansiedade em ratas

Dissertação apresentada à Faculdade
de Filosofia, Ciências e Letras de
Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Psicobiologia

Orientador: Prof. Dr. Sebastião de
Sousa Almeida

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Baccetto, Raquel Lunardi

Efeitos de um modelo de oferta e retirada de dieta de cafeteria sobre o comportamento alimentar e ansiedade em ratas. Ribeirão Preto, 2016.

55 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Almeida, Sebastião de Sousa.

1. Dieta de cafeteria. 2. Compulsão alimentar.
3. Adicção alimentar. 4. Adolescência. 5. Fêmeas.
6. Ansiedade.

BACCETTO, R. L.

Efeitos de um modelo de oferta e retirada de dieta de cafeteria sobre o comportamento alimentar e ansiedade em ratas.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração: Psicobiologia.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

RESUMO

BACCETTO, R. L. **Efeitos de um modelo de oferta e retirada de dieta de cafeteria sobre o comportamento alimentar e ansiedade em ratas.** 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós Graduação em Psicobiologia. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A incidência global de obesidade tem aumentado nas últimas décadas e o consumo excessivo de alimentos industrializados ricos em açúcar e gordura está entre suas principais causas. Pesquisas recentes têm mostrado que estes alimentos desencadeiam mecanismos neurais e comportamentos semelhantes à adicção a drogas. Sabe-se que hábitos e preferências alimentares de adultos são adquiridos na infância, mas intervenções efetivas para prevenção da obesidade e suas comorbidades em crianças e adolescentes ainda constituem um desafio para a saúde pública. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do consumo de dieta de cafeteria e retirada desta no comportamento alimentar, peso corporal, perfil lipídico, regularidade do ciclo estral, e comportamento de ansiedade e motivação. Ratas *Wistar* tiveram acesso limitado a itens alimentares de consumo humano de alta densidade energética por quatro semanas, ao final das quais foi realizada a retirada da dieta experimental de duas maneiras: para um grupo total e brusca, e para outro gradual durante uma semana. Após essa retirada, que simula dietas humanas de restrição, as ratas foram submetidas a testes comportamentais para avaliar ansiedade (labirinto em cruz elevado), e motivação para restabelecimento do acesso à dieta de cafeteria (modelo de restabelecimento). O grupo submetido à dieta de cafeteria apresentou maior consumo de gorduras totais e saturadas ($p<0,05$), e menor consumo de proteínas totais e fibras ($p<0,05$). Apesar disso, o consumo energético diário entre os grupos não atingiu diferença estatisticamente significativa, assim como o peso corporal das ratas. Após retirada da dieta de cafeteria, o consumo energético foi reduzido significativamente, porém, não acompanhado de perda de peso. Houve diferença significativa no perfil lipídico, sendo que ratas do grupo Cafeteria Sem Retirada tiveram os maiores valores de colesterol total e colesterol LDL ($p<0,05$). As ratas que sofreram retirada da dieta de cafeteria tiveram seus valores de colesterol similares às alimentadas somente com ração. A retirada completa da dieta de cafeteria e consequente diminuição do consumo energético foi responsável por irregularidade no ciclo estral das ratas. Os resultados no labirinto em cruz elevado não atingiram diferença estatisticamente significativa. O grupo Ração passou mais tempo no lado claro ($p<0,05$), conforme mostrado pelo teste de restabelecimento. A oferta limitada, de curto prazo, pós-desmame da dieta de cafeteria foi efetiva no desenvolvimento de compulsão alimentar em ratas adolescentes, porém sem evidências de vício alimentar. É provável que a obesidade seja condição necessária para o vício. Esperamos que os resultados deste estudo contribuam para o conhecimento da relação entre qualidade da dieta e comportamento alimentar e de adicção em ratas adolescentes.

Palavras-chave: Dieta de cafeteria. Compulsão alimentar. Adicção alimentar. Adolescência. Fêmeas. Ansiedade.

ABSTRACT

BACCETTO, R. L. **Effects of a model of cafeteria diet supply and withdrawal on eating patterns and anxiety-like behavior in female rats.** 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós Graduação em Psicobiologia. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The global incidence of obesity has steadily risen in the last decades and the excessive intake of industrialized food rich in sugar and fat is among its main causes. Recent researches have shown that these foods activate neural mechanism and behaviors similar to what is seen with drug addiction. It is known that adults' eating habits and preferences are generally established during childhood, but effective preventive measures against obesity and its comorbidities in children and adolescents are still a current public health challenge. The goal of the present study was to evaluate the effects of a cafeteria diet intake and withdrawal on eating behavior, body weight, lipid profile, estrous cycle regularity, and anxiety-like and motivational behavior. Female *Wistar* rats had limited access to energy-dense food items typically consumed by humans for four weeks, at the end of which, withdrawal from this diet occurred in one of two ways: for a group withdrawal was abrupt and total, and for another group, gradual for one week. After withdrawal, which attempts to mimic human restrictive dieting, we evaluated rats' anxiety-like behavior through the elevated plus maze, and their motivation to reinstate access to the cafeteria diet through a reinstatement model. Daily energy intake between groups did not reach significant difference, as well as their body weight. Cafeteria fed rats did gain weight at a faster pace, and had a significant greater intake of total and saturated fat, and sodium ($p < 0.05$); and a significantly lower intake of proteins and fibers ($p < 0.05$). Groups that underwent withdrawal reduced their caloric intake significantly, but there was no weight loss. Rats with continuous access to cafeteria diet also had higher levels of total and LDL cholesterol ($p < 0.05$), and rats from withdrawal groups had their cholesterol levels similar to chow-only animals. The total withdrawal of the cafeteria diet and resulting lower energy intake were also responsible for estrous cycle irregularities. There was no significant difference in rats' performance in the EPM test. Chow only rats spent significantly more time in an aversive setting in order to gain access to an item from the cafeteria diet ($p < 0.05$). The limited, short term, post-weaning offer of a cafeteria diet was effective in developing compulsive eating disorder, but without signs of food addiction. It is likely that obesity is precedent to the development of addiction. We expect that the results from this project contribute to the ongoing discussion and investigation on eating and addiction behavior in female adolescents rats.

Key words: Cafeteria diet. Binge eating disorder. Food addiction. Adolescence. Females. Anxiety.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama esquemático dos grupos experimentais.....	18
Figura 2 – Aceitação dos alimentos salgados e doces ofertados na dieta de cafeteria apresentada em função dos dias de oferta da dieta.....	19
Figura 3 – Foto do aparato labirinto em cruz elevado.....	22
Figura 4 – Foto do aparato utilizado para o teste modelo de restabelecimento	23
Figura 5 – Fotos de amostras vaginais tiradas logo após coleta. 200 x	24
Figura 6 – Evolução do peso corporal das ratas de acordo com o grupo de tratamento dietético	26
Figura 7 – Consumo calórico semanal de acordo com grupo de dieta	27
Figura 8 – Consumo semanal de ração de acordo com grupo de dieta	29
Figura 9 – Consumo de carboidratos semanal de acordo com grupo de dieta	29
Figura 10 – Consumo de proteína semanal de acordo com grupo de dieta	30
Figura 11 – Consumo semanal de gorduras totais de acordo com grupo de dieta	30
Figura 12 – Consumo semanal de gorduras saturadas de acordo com grupo de dieta	31
Figura 13 – Consumo semanal de fibras totais de acordo com grupo de dieta	31
Figura 14 – Consumo semanal de sódio de acordo com grupo de dieta	32
Figura 15 – Porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado em função do total de entradas nos braços abertos e fechados	33
Figura 16 – Porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado em função do tempo total gasto nos braços abertos e fechados	34
Figura 17 – Tempo dispendido no lado claro durante o teste de restabelecimento	35
Figura 18 – Número de entradas no lado claro durante o teste de restabelecimento	36
Figura 19 – Concentração sérica de colesterol total por grupo de dieta	36
Figura 20 – Concentração sérica de colesterol LDL por grupo de tratamento dietético	37
Figura 21 – Concentração sérica de triglicerídeos totais por grupo de dieta	37
Figura 22 – Concentrações séricas de colesterol HDL e VLDL por grupo de dieta	38
Figura 23 – Número de animais por grupo de dieta com ciclo estral regular ou irregular	42
Figura 24 – Padrão do alimentar em excesso: um espectro de compulsão e severidade	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição dos alimentos ofertados na dieta de cafeteria e média de consumo, calculada como quantidade consumida dividida por quantidade ofertada	20
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Obesidade e Alimentação.....	10
1.2 Modelos Animais	11
1.2.1 Dieta de Cafeteria.....	12
1.2.2 Labirinto em Cruz Elevado	12
1.3 Adicção Alimentar	13
1.4 Justificativa	15
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 Animais	17
3.2 Tratamento Dietético – Dieta de Cafeteria.....	17
3.3 Retirada da Dieta de Cafeteria	21
3.4 Testes Comportamentais	21
3.4.1 Labirinto em Cruz Elevado	21
3.4.2 Modelo de Restabelecimento	22
3.5 Análise de perfil lipídico	23
3.6 Citologia Vaginal	24
3.7 Análise Estatística	25
4 RESULTADOS.....	26
4.1 Peso corporal.....	26
4.2 Consumo Alimentar Antes da Retirada – Semanas 1 a 4.....	27
4.3 Consumo Alimentar Após a Retirada – Semanas 5 e 6.....	28
4.4 Labirinto em Cruz Elevado	32
4.5 Modelo de Restabelecimento	34
4.6 Perfil Lipídico	35
4.7 Regularidade do Ciclo Estral	38

5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXOS	55
Anexo A - Certificado de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade e Alimentação

A prevalência mundial de obesidade dobrou entre 1980 e 2014, quando índices da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimavam que mais da metade da população mundial estivesse com sobrepeso ou obesidade – aproximadamente dois bilhões de adultos (WHO, 2016b). Talvez mais preocupante seja o dado de que 41 milhões de crianças com menos de 5 anos de idade sofrem de sobrepeso ou obesidade (WHO, 2016b). A obesidade é definida como acúmulo excessivo ou anormal de tecido adiposo que pode trazer malefícios a saúde (WHO, 2014). Suas causas são multifatoriais, porém, sabe-se que estão envolvidas mudanças no ambiente físico e alimentar, caracterizado hoje por estilo de vida sedentário e consumo excessivo de alimentos industrializados de alta densidade energética, ricos em gordura e açúcar de adição, porém pobres em nutrientes (FREDERICK; SNELLMAN; PUTNAM, 2014; FRENCH; STORY; JEFFERY, 2001). A dieta ocidental moderna é especialmente atraente pois tais alimentos são altamente palatáveis, de fácil acesso, baratos e prontos para consumo (PAES; ONG; LAKSHMAN, 2015).

A grande maioria das crianças com excesso de peso são de países em desenvolvimento, onde o crescimento da taxa de obesidade infantil foi 30% maior que nos países desenvolvidos (WHO, 2014). Segundo dados do Ministério da Saúde (2013), o Brasil segue essa tendência, contando com mais da metade da população com excesso de peso. Uma pesquisa de análise de consumo no Brasil realizada entre 2008 e 2009 relatou inadequações na alimentação, caracterizada por consumo excessivo de açúcar, referido por 61% da população; excesso de gordura saturada, por 82%; insuficiente ingestão de fibras, por 68%; e consumo maior do que o limite tolerável de sódio por mais de 70% da população (IBGE, 2011). Os alimentos associados às maiores médias de ingestão energética incluem biscoitos recheados, refrigerantes, doces, pizza e salgadinhos industrializados, sendo que os adolescentes apresentaram médias de consumo muito superiores aos adultos e idosos (IBGE, 2011). Um dos fatores apontados como responsáveis pelo elevado consumo de alimentos industrializados é a quantidade massiva de propagandas, principalmente aquelas direcionadas a crianças e adolescentes (MATTOS et al., 2010; SADEGHIRAD et al., 2016).

O consumo alimentar inadequado durante a juventude é extremamente preocupante pois está relacionado a diversos fatores de risco para doenças cardiovasculares, como hipertensão, dislipidemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina; além de comorbidades como diabetes mellitus tipo 2, síndrome do ovário policístico, entre outras anormalidades respiratórias, ortopédicas e hepáticas (REILLY et al., 2003). Crianças e adolescentes obesos também apresentam mais frequentemente distúrbios psicológicos (REILLY et al., 2003), baixo rendimento escolar (KIM et al., 2016), e anormalidades no ciclo menstrual (RUPA VANI et al., 2013). Além disso, a prevalência de distúrbios alimentares, como a compulsão alimentar, tem aumentado entre adolescentes (DAVIS, 2013).

Hábitos alimentares adquiridos durante a infância e adolescência têm um profundo impacto nas preferências alimentares da vida adulta (BIRCH, 1999), e na incidência de obesidade entre os adultos (AMBROSINI, 2014). Em face ao consumo excessivo de *junk-food* entre adolescentes e os perigos relacionados a este (FARAJIAN et al., 2016), intervenções dietéticas precoces são necessárias para garantir que estes se tornem adultos mais saudáveis. Há ainda carência de programas de prevenção efetivos, já que desconhecemos muito acerca dos determinantes do comportamento alimentar, inclusive na infância e adolescência (LING; ROBBINS; WEN, 2016; VISSCHER; KREMERS, 2015). Pesquisas têm demonstrado, por exemplo, que a restrição ao acesso à alimentos industrializados em crianças aumenta o comer na ausência de fome (BIRCH; FISHER; DAVISON, 2003), um achado que aponta para a ineficácia dos programas alimentares altamente restritivos. Além disso, a maioria dos estudos com animais utiliza sujeitos machos, porém sabemos que são as meninas que mais sofrem de distúrbios alimentares (DAVIS, 2013). Assim, estudos explorando os mecanismos subjacentes à alimentação em adolescentes, apesar de ainda escassos, são de extrema importância.

1.2 Modelos Animais

O *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar* é o animal mais comumente utilizado em laboratórios para pesquisas nas áreas biomédica e comportamental por sua facilidade de manipulação (KOCH, 2006). Seu uso em pesquisas nutricionais é facilitado por seus hábitos alimentares onívoros. Em pesquisas comportamentais, algumas características devem ser levadas em considerações, como por exemplo, sua sociabilidade e a influência que o ambiente

social têm em alguns comportamentos, como a alimentação e a ansiedade (NIELSEN, 1999). Há evidência de que manter ratos em caixas individuais pode levá-los a ingerir mais alimentos e exibir maior ansiedade, efeito observado principalmente em fêmeas (NIELSEN, 1999; PALANZA, 2001).

1.2.1 Dieta de Cafeteria

A dieta de cafeteria é um modelo animal caracterizado pela oferta de alimentos de consumo humano, ricos em açúcar e gordura (SCLAFANI; SPRINGER, 1976). Tal modelo de dieta foi desenvolvido para estudar os mecanismos fisiológicos e comportamentais associados ao padrão ocidental de consumo alimentar, à obesidade e à doenças relacionadas à obesidade (SAMPEY et al., 2011; SCLAFANI; SPRINGER, 1976). Não há um consenso na literatura do que caracteriza uma dieta de cafeteria, sendo que estudos que utilizam dessa denominação oferecem desde ração misturada a itens alimentares de consumo humano, como leite condensado (EGUCHI et al., 2008), até frutas, legumes e castanhas, como banana, cenoura, amendoim, amêndoas, castanha de caju e castanha-do-pará (CHAVES et al., 2008; ESTEVE et al., 1994; SHAFAT; MURRAY; RUMSEY, 2009; WRIGHT; LANGLEY-EVANS; VOIGT, 2011). Apesar de palatáveis, tais alimentos não caracterizam a dieta moderna ocidental que a dieta de cafeteria objetiva simular, pois são ricos em nutrientes, carboidratos complexos, e gorduras insaturadas. Assim, consideramos dieta de cafeteria a oferta somente de alimentos industrializados com perfil diferente de alimentos *in natura*.

1.2.2 Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um teste amplamente utilizado e altamente validado para medição de ansiedade em ratos (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; HANDLEY; MITHANI, 1984). O teste se baseia no comportamento espontâneo do animal de exploração de ambientes desconhecidos acoplado ao instinto de defesa que gera aversão aos braços abertos por medo e ansiedade (MONTGOMERY, 1955). Como resultado, o animal tende a passar mais tempo explorando os braços fechados do aparato, sendo que quando nos

braços abertos estes exibem comportamento relacionado à ansiedade como congelamento, imobilidade e defecação, além de níveis mais altos de corticosterona plasmática (PELLOW et al., 1985). Para avaliação da ansiedade, o desempenho do rato durante o teste é avaliado de acordo com a proporção entre número de entradas nos braços abertos e fechados, e tempo despendido nos braços abertos em relação ao tempo total de teste (LISTER, 1987). Também são validados índices comportamentais de avaliação de risco como esticamento, levantamento, mergulho e autolimpeza (BLANCHARD; BLANCHARD; RODGERS, 1991; RODGERS et al., 1997).

Quando testando ratas fêmeas no labirinto em cruz elevado, alguns aspectos de sua fisiologia devem ser considerados. A variação da concentração de hormônios durante o ciclo estral da rata, principalmente a progesterona e o estradiol, podem influenciar seu desempenho no LCE à medida em que interferem no nível de ansiedade do animal (REIS et al., 2014). Há evidência de que diversos hormônios em maior concentração na fase proestro do ciclo estral da rata têm efeitos ansiolíticos (FRYE; PETRALIA; RHODES, 2000; MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). Em contrapartida, a fase de maior ansiedade na rata medida pelo labirinto em cruz elevado parece ser a diestro (FRYE; PETRALIA; RHODES, 2000; MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002; REIS et al., 2014). Por esses motivos, é comum que as ratas sejam testadas no LCE durante a mesma fase do ciclo, ou que o efeito da fase do ciclo seja considerado na avaliação do desempenho no teste.

1.3 Adicção Alimentar

A oferta de alimentos altamente palatáveis e diversificados em sabores e texturas a ratos resulta no comprometimento do funcionamento do sistema homeostático de balanço energético (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005; ONG et al., 2013; SAPER; CHOU; ELMQUIST, 2002). Verificou-se que o acesso ilimitado a estes alimentos resulta em hiperfagia voluntária, com consequente desenvolvimento de síndrome metabólica após rápido ganho de peso; maior adiposidade; aumento dos níveis de glicose, insulina e triglicerídeos; e resistência à insulina (GOULARTE; FERREIRA; SANVITTO, 2012; LALANZA et al., 2014; SAMPEY et al., 2011).

O valor hedônico dos alimentos industrializados ajuda a explicar a dificuldade de reduzir o consumo destes quando necessário, já que prazer e recompensa são fortes

motivadores da alimentação (BERTHOUD; MORRISON, 2008; DE MACEDO; DE FREITAS; DA SILVA TORRES, 2016; KENNY, 2011). Apesar da forte associação entre maus hábitos alimentares e prejuízos à saúde, o tratamento dietético é dificultado em grande parte pela falta de aderência a intervenções de longo-prazo (ANDERSON et al., 2001; GARNER; WOOLEY, 1991; JEFFERY et al., 2000). Os altos níveis de açúcar e gordura encontrados em alimentos ultra processados não ocorrem naturalmente, e foi demonstrado que o consumo destes ativa circuitos neurais e induz déficits nos mecanismos de recompensa do cérebro, semelhante ao que é observado com o consumo de drogas aditivas (GEARHARDT et al., 2011a, 2011b; JOHNSON; KENNY, 2010).

Até o momento, somente a suplementação de açúcar demonstrou alto potencial aditivo (BOCARSLY et al., 2011). Evidências comportamentais de adicção, como sintomas de retirada, *craving*, e sensibilização cruzada, foram observadas em ratos com acesso intermitente e consequente privação ao açúcar (AVENA; LONG; HOEBEL, 2005; AVENA; RADA; HOEBEL, 2008; COLANTUONI et al., 2002). Alguns estudos tentaram reproduzir os resultados comportamentais observados pelo consumo do açúcar substituindo-o pela gordura ou combinações de açúcar e gordura, todavia os resultados obtidos são mistos, sendo que a gordura por vezes parece eliciar alguns sintomas da dependência, mas nem sempre (AVENA; RADA; HOEBEL, 2008, 2009). A maioria destes estudos, entretanto, utilizou esquemas de suplementação de gordura isolada, com adição de óleos vegetais ou rações comerciais ricas em gordura (AVENA; RADA; HOEBEL, 2009). A oferta de ração com composição nutricional manipulada, apesar de obesogênica, não reflete a situação humana. Sabemos que pessoas não consomem nutrientes isolados, mas alimentos que contêm uma combinação de açúcares e gorduras de diferentes tipos, além do excesso de alguns micronutrientes, como o sódio, e falta de outros, como as vitaminas (WARNEKE et al., 2014). Enquanto que sintomas de ansiedade resultantes da retirada de dietas com alto teor de açúcar ou gordura já foram demonstrados, a evidência quanto ao que acontece após a retirada de alimentos de consumo humano ainda não é clara (PARYLAK; KOOB; ZORRILLA, 2011).

O conceito de adicção a alimentos tem sido controverso há um tempo. Alguns autores argumentam que o termo correto deveria ser adicção à alimentação, já que não há uma substância, alimento ou nutriente específico, que pareça estar associada a sintomas de vício (HEBE BRAND et al., 2014). Ao invés disso, o comportamento de se alimentar em excesso teria potencial aditivo, semelhante ao vício a jogos de azar ou sexo (HEBE BRAND et al., 2014). Porém, pesquisas com humanos têm relacionado comportamento alimentar semelhante

à adicção específico a alimentos altamente processados com alta carga glicêmica e conteúdo de gordura (SCHULTE; AVENA; GEARHARDT, 2015). Devido à complexidade do ato de se alimentar, ainda há um longo caminho até que um modelo de adicção alimentar seja amplamente aceito e incluso no manual DSM (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), junto com distúrbios alimentares como anorexia e bulimia nervosa (CORWIN; HAYES, 2014; ZIAUDDEEN; FAROOQI; FLETCHER, 2012). Além disso, como os distúrbios alimentares reconhecidos são encontrados tanto em pessoas com peso dentro da faixa da normalidade, quanto em obesos (BOGGIANO et al., 2007; GEARHARDT; CORBIN; BROWNELL, 2009), têm sido questionado se a adicção alimentar pode ser considerada causa, comorbidade, ou ainda consequência da obesidade (ZIAUDDEEN; FAROOQI; FLETCHER, 2012).

1.4 Justificativa

Com base no aumento da incidência da obesidade mundial, e de maus hábitos alimentares, justifica-se estudar mecanismos adjacentes à alimentação que possam influenciar no advento da obesidade. Este trabalho visa esclarecer os mecanismos envolvidos no consumo alimentar e no estado emocional após a restrição ao acesso à dieta preferencial, podendo auxiliar no desenvolvimento de intervenções efetivas de mudanças persistentes de hábitos alimentares.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar em ratas o efeito do consumo limitado de uma dieta de cafeteria e subsequente retirada desta no comportamento alimentar, peso corporal, perfil lipídico, regularidade do ciclo estral, comportamento de ansiedade, e motivação.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar a ingestão de variedade de itens alimentares de consumo humano, observando manifestação de preferências alimentares, e diferentes padrões de alimentação;

2.2.2 Avaliar a evolução do peso corporal das ratas alimentadas com ração e dieta de cafeteria;

2.2.3 Avaliar o perfil lipídico das ratas, incluindo triglicérides totais, colesterol total e suas frações, durante a oferta da dieta de cafeteria e após sua retirada;

2.2.4 Avaliar o ciclo estral das ratas para comparação da regularidade dos ciclos entre os grupos de tratamento;

2.2.5 Após retirada da oferta de dieta de cafeteria, avaliar comportamento de ansiedade através do teste do labirinto em cruz elevado;

2.2.6 Avaliar comportamento de motivação e tomada de risco frente a possibilidade de consumo da dieta de cafeteria, após retirada;

2.2.7 Comparar modelos de retirada de dieta brusca e gradual em relação ao peso corporal, perfil lipídico, consumo alimentar, comportamento de ansiedade e de motivação para restabelecimento.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratas fêmeas da linhagem *Wistar* (n=48) foram obtidas do Biotério Central da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto, e levadas ao biotério do Laboratório de Nutrição e Comportamento localizado na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. As ratas foram alojadas desde o nascimento com as mães em proporção de 8 filhotes para 1 rata mãe por caixa, até o desmame aos 21 dias de vida. Após o desmame, as ratas foram aleatoriamente divididas em quatro grupos de acordo com o tratamento dietético (ver seção 3.2) e alojadas em grupos de quatro ratas pertencentes ao mesmo tratamento dietético. As ratas foram mantidas em caixas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm), com tampa gradeada de aço inoxidável, onde se encaixava um bebedouro de plástico. As caixas eram forradas com raspas de madeira (maravalha), trocadas em dias intercalados. O biotério era controlado para temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$) e umidade (45%-50%), e contava com iluminação artificial programada para ciclos de claro/escuro com duração de 12 horas cada (acendimento das luzes às 7h00 da manhã).

Diariamente, todas as ratas foram pesadas e tiveram suas dietas manipuladas. A água era trocada a cada dois dias, ou conforme necessário. A ração era ofertada em todas as caixas na tampa gradeada. Além disso, em todas as caixas foram instalados dois comedouros de aço inoxidável. Nas caixas dos ratos pertencentes ao grupo Ração, os comedouros ficavam vazios e nas caixas restantes era ofertado ali os alimentos da dieta de cafeteria.

O projeto foi considerado de acordo com preceitos da lei e normas legislativas e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (CEUA FFCLRP), processo nº 15.1.1680.59.1.

3.2 Tratamento Dietético – Dieta de Cafeteria

As ratas foram divididas em quatro grupos (12 ratas por grupo) de acordo com o esquema de dieta. Foram compostos os seguintes grupos: Ração (C), Cafeteria Sem Retirada

(CAF SR), Cafeteria Retirada Brusca (CAF RB), e Cafeteria Retirada Gradual (CAF RG) (Figura 1). Todos os animais tiveram acesso *ad libitum* à água filtrada e ração comercial para laboratório fabricada pela Nuvital Nutrientes Ltda. – Colombo, PR, conforme recomendações do Instituto *Research Council e National Institute of Health* – USA (NUVILAB CR-1 para camundongos e ratos: 3,1 kcal/g, 13,5% kcal de gorduras, 62,9% kcal de carboidratos, 23,5% kcal de proteína). Além da ração, aos animais dos grupos “Cafeteria” ofertamos alimentos de alta densidade energética, ricos em açúcares simples, gorduras saturadas e *trans*, com excesso de sódio, e pobres na maioria dos micronutrientes (composição nutricional média de 4,2 kcal/g, sendo 33% das calorias proveniente de gorduras, 57% de carboidratos, e 10% de proteína). As informações nutricionais da dieta de cafeteria foram obtidas nos rótulos dos alimentos. Foi aplicado um protocolo para correção do viés de evaporação antes do cálculo do consumo calórico, conforme descrito por Shafat, Murray e Rumsey (2009).

Figura 1 – Diagrama esquemático dos grupos experimentais. 100% de cafeteria corresponde à oferta de uma porção da dieta de cafeteria; 50% ou 25% correspondem à oferta de proporção da porção ofertada ao grupo sem retirada.

Os alimentos selecionados para oferta aos grupos Cafeteria são resultado de extensa busca bibliográfica de estudos que utilizaram esse tipo de dieta (PINI et al., 2016; SAMPEY et al., 2011), levando em consideração a disponibilidade local dos itens. Inicialmente foram ofertados duas porções de alimentos (uma salgada e uma doce), que eram variadas diariamente. A definição dos alimentos a serem ofertados foi feita de forma aleatória, por sorteio de uma lista de 20 alimentos (Tabela 1). Após todos os alimentos terem sido ofertados uma vez, preferências alimentares foram estabelecidas de acordo com a média de consumo –

quantidade consumida por quantidade ofertada (Figura 2). Os 10 itens alimentares preferidos foram identificados (cinco doces, e cinco salgados) e estes continuaram a ser ofertados até o final do estudo. Os alimentos eram sempre colocados ao início do ciclo claro, entre 8:00 e 9:00 da manhã. Os grupos com dieta de cafeteria (CAF SR, CAF RB, CAF RG) tiveram acesso limitado pela quantidade, que correspondia a aproximadamente 85% do consumo calórico do grupo Ração.

Figura 2 – Aceitação dos alimentos salgados e doces ofertados na dieta de cafeteria apresentada em função dos dias de oferta da dieta.

Tabela 1 – Composição dos alimentos ofertados na dieta de cafeteria e média de consumo, calculada como quantidade consumida dividida por quantidade ofertada.

Alimentos (Valores por 1g de alimento)	Média de Consumo	Kcal	Gord. totais (g)	Carboidratos (g)	Proteína (g)	Fibras totais (g)	Gord. saturadas (g)	Sódio (mg)
Ração		3.01	0.05	0.47	0.18	0.13	0.00	2.70
SALGADOS								
Salgadinho de milho sabor queijo (Fofura®)	100%	4.44	0.21	0.60	0.06	0.00	0.03	7.92
Torrada Magic Toast (Marilan®)	100%	3.64	0.00	0.76	0.10	0.03	0.00	5.12
Macarrão instantâneo (Maggi®)	100%	4.74	0.20	0.64	0.10	0.03	0.09	17.66
Pão branco (Nutripan®)	100%	2.54	0.00	0.52	0.07	0.02	0.00	2.70
Torrada (Adria®)	100%	4.00	0.06	0.73	0.13	0.03	0.03	6.80
Batata Palha (Amavita®)	80%	6.20	0.40	0.43	0.06	0.03	0.10	2.24
Salsinha (Copacol®)	67%	2.10	0.16	0.04	0.12	0.00	0.06	10.80
Bolacha Água e Sal (Festiva®)	62%	4.37	0.17	0.53	0.16	0.02	0.08	15.40
Mortadela (Copacol®)	62%	2.28	0.18	0.05	0.12	0.00	0.07	12.50
Queijo prato (Goiabal®)	46%	4.23	0.37	0.00	0.23	0.00	0.23	5.33
DOCES								
Cereal de chocolate (Nutrif®)	100%	3.93	0.00	0.93	0.03	0.00	0.00	4.00
Stick Wafer de chocolate (Itamaraty®)	100%	4.73	0.17	0.77	0.04	0.02	0.04	1.77
Bolacha Wafer (Parmalat®)	88%	5.13	0.26	0.67	0.04	0.02	0.06	1.57
Bolacha recheada (Festiva®)	77%	4.63	0.17	0.68	0.08	0.01	0.09	3.71
Bolo de chocolate (Parmalat®)	73%	4.10	0.18	0.60	0.04	0.02	0.10	1.75
Marshmallow (Fini®)	60%	3.25	0.00	0.75	0.05	0.00	0.00	0.80
Paçoquinha (Yoki®)	58%	5.10	0.27	0.50	0.17	0.05	0.04	3.45
Bolacha Maisena (Festiva®)	45%	3.97	0.07	0.70	0.12	0.01	0.03	3.60
Chocolate ao leite (Neugebauer®)	39%	5.16	0.31	0.54	0.07	0.00	0.19	1.14
Goiabada (Xavante®)	9%	3.10	0.00	0.78	0.00	0.03	0.00	0.00

3.3 Retirada da Dieta de Cafeteria

Após quatro semanas de dieta (28 dias), foi iniciada a retirada da dieta de cafeteria dos animais pertencentes aos grupos CAF RB e CAF RG. Para o grupo de retirada brusca, a dieta de cafeteria deixou de ser ofertada completamente a partir do 29º dia de dieta. A retirada gradual do grupo CAF RG ocorreu durante a quinta semana, quando foi ofertado por quatro dias 50% do total ofertado ao grupo sem retirada, seguido de 25% por três dias. A partir do 36º dia de dieta, os animais do grupo CAF RG não receberam mais dieta de cafeteria.

3.4 Testes Comportamentais

3.4.1 Labirinto em Cruz Elevado

O aparato para realização do teste consiste em dois braços abertos de 50 x 10 cm, e dois braços fechados com paredes, medindo 50 x 10 x 40 cm, todos perpendiculares entre si formando uma cruz. O labirinto é construído em madeira e elevado do solo em 50 cm. Os braços abertos contam com borda de acrílico de 1 cm de altura e 2 mm de espessura para prover segurança adicional ao animal.

O teste foi realizado 24 horas após a retirada da dieta de cafeteria, para os grupos que sofreram retirada, e no dia seguinte para os animais controles dos grupos Sem Retirada e Ração. Os testes se iniciaram com a colocação de um animal no centro do labirinto, voltado sempre para o mesmo braço fechado. Após cinco minutos de teste, a rata era retirada e o labirinto totalmente limpo com álcool etílico hidratado à concentração de 50%. Acima do labirinto estava fixado uma câmera de vídeo (Sony®, modelo CCD-TRV66, 8mm) conectada a um computador localizado em sala adjacente. Todas as sessões foram gravadas e os vídeos foram posteriormente analisados utilizando o software X-Plot Rat 2005.

Figura 3 – Foto do aparato labirinto em cruz elevado utilizado.

Para avaliação da ansiedade, foram registrados índices espaço-temporais clássicos – número de entradas nos braços abertos e fechados e proporção entre estes, e porcentagem de tempo despendido nos braços abertos em relação ao tempo total de teste. Também foram avaliados índices comportamentais de avaliação de risco como esticamento, levantamento, auto limpeza, e número de bolos fecais.

3.4.2 Modelo de Restabelecimento

Conforme desenvolvido e descrito por Teegarden e Bale (2007), o modelo de restabelecimento objetiva avaliar o impulso comportamental dos ratos para restabelecer o consumo do alimento preferido após retirada deste. Neste modelo, os ratos devem tolerar um ambiente aberto e iluminado (155 lux) para ter acesso ao alimento preferido, apesar da disponibilidade de ração em um ambiente menos aversivo (20 lux). O aparato utilizado é uma caixa claro-escuro, e os dois lados são conectados por uma passagem que permite movimento livre entre eles. No lado claro é posicionado uma porção do alimento preferido da dieta de cafeteria e no lado escuro, *pellets* de ração.

Figura 4 – Foto do aparato utilizado para o teste modelo de restabelecimento.

O teste foi aplicado 5 dias após retirada da dieta de cafeteria. Para os grupos Cafeteria Sem Retirada e Ração, as ratas foram submetidas ao teste no próximo dia. No dia do teste, os animais permaneceram em jejum por 6 horas antes de seu início. A privação de alimento acontece durante o ciclo claro do animal para minimizar o impacto no metabolismo e consumo alimentar normal, mas para instigar motivação para se alimentar durante o teste. O teste foi iniciado com a colocação do animal no lado claro da caixa, o qual eles poderiam explorar livremente por 10 minutos. Acima da caixa, uma câmera de vídeo estava afixada e conectada a um computador localizado em sala adjacente. Todas as sessões foram gravadas para posterior análise utilizando o software X-Plot Rat 2005. Foram avaliados tempo despendido em cada lado, número de entradas em cada lado, e quantidade de alimento consumido.

3.5 Análise de perfil lipídico

Após seis semanas de experimento, os animais passaram 12 horas em jejum e foram sacrificados por anestésico injetável em sobredose. Foi utilizado Pentobarbital em concentração de 30 mg/ml, injetado por via intravenosa em dose de 1,0 ml/g de peso corporal do animal, suficiente para garantir efeito rápido e evitar sofrimento ao animal. O método foi selecionado e realizado de acordo com a Resolução Normativa Nº 13 do CONCEA. Após a eutanásia, foram

coletados 3 ml de sangue por rata a partir da cavidade torácica. O sangue foi centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C, e o soro sobrenadante foi retirado e colocado em tubos de 1 ml, que foram congeladas a -80°C até análise. Quando no momento da análise, foram utilizados kits enzimáticos colorimétricos (Labtest, Brasil) para determinação de triglicerídeos totais (TG), colesterol total (COL) e colesterol HDL (cHDL). A determinação das frações de colesterol VLDL e LDL foram calculadas a partir da equação de Friedewald (1972):

$$[\text{VLDL} = \text{TG}/5; \text{LDL} = \text{COL} - (\text{HDL} + \text{VLDL})].$$

3.6 Citologia Vaginal

Diariamente por três semanas antes do fim dos experimentos (a partir do 22º dia de tratamento), foram coletadas amostras vaginais para determinação da fase do ciclo estral. A coleta foi feita por lavagem vaginal conforme descrito por Marcondes, Bianchi e Tanno (2002), sempre no mesmo horário, entre 8:00 e 9:00 da manhã. A classificação da amostra em fases é feita imediatamente seguida a coleta pela observação da proporção do tipo de células da amostra (Figura 5). O ciclo regular é definido por uma sequência de quatro a cinco dias dos ciclos, proestro, estro, metaestro e diestro.

Figura 5 – Fotos de amostras vaginais tiradas logo após coleta. 200 x. Figura retirada de Hubscher, Brooks e Johnson (2005).

3.7 Análise Estatística

Todos os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. A normalidade da distribuição dos dados foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk antes da análise de dados. Para análise do peso e consumo de energia e de nutrientes, foi utilizado o teste ANOVA para medidas repetidas, com os fatores dias de tratamento dietético e grupo. Os resultados dos testes comportamentais e perfil lipídico foram analisados por ANOVA de um fator para cada variável, com grupo de tratamento dietético como fator. Foi realizada análise estatística ANOVA com o fator 'fase do ciclo estral' e os escores dos testes comportamentais, para avaliar se houve interferência do ciclo estral no comportamento das ratas durante os testes. Correção para comparações múltiplas foi feita pelo teste post-hoc de Tukey. A análise da regularidade do ciclo estral de acordo com grupo de dieta foi realizada pelo teste qui-quadrado. Significância estatística foi considerada com $\alpha < 0,05$. Todas as análises foram conduzidas utilizando o software GraphPad Prism versão 7.0a para Mac (GraphPad Software, La Jolla California USA).

4 RESULTADOS

4.1 Peso corporal

Ao desmame e início do tratamento dietético, não houve diferenças significativas no peso corporal das ratas. De acordo com a ANOVA, houve efeito significativo do fator tempo [F (41, 1084) = 4221, $p < 0,0001$], e efeito extremamente significativo para a interação grupo x tempo [F (123, 1084) = 3,457, $p < 0,0001$], o que indica que os grupos aos quais foram ofertados a dieta de cafeteria ganharam peso a um ritmo mais rápido do que o grupo Ração. O fator grupo não demonstrou efeito significativo no peso corporal das ratas, sendo que em nenhum dia houve diferença significativa entre os grupos para o peso corporal total, mesmo após a retirada da dieta de cafeteria e queda significativa no consumo energético (Figura 6).

Figura 6 - Evolução do peso corporal das ratas de acordo com o grupo de tratamento dietético. Não houveram diferenças significativas entre os grupos em nenhum momento do estudo ($p > 0,05$).

4.2 Consumo Alimentar Antes da Retirada – Semanas 1 a 4

Durante as primeiras quatro semanas, não houveram diferenças significativas entre os grupos em termos de consumo energético (Figura 7). Houve efeito significativo do tempo no consumo calórico [$F(5, 144) = 74,03$, $p < 0,0001$]. O grupo C consumiu significativamente mais ração do que todos os outros grupos com acesso à dieta de cafeteria ($p < 0,0001$) (Figura 8). O consumo de carboidratos permaneceu similar entre os grupos (Figura 9). A energia obtida dos alimentos consumidos da dieta de cafeteria correspondeu a $62\% \pm 14\%$ das calorias totais consumidas pelas ratas dos grupos CAF. Entretanto, estes grupos consumiram significativamente mais gorduras totais durante as semanas 2 e 3 ($p < 0,0001$) (Figura 11); mais gorduras saturadas durante as quatro semanas ($p < 0,0001$) (Figura 12); mais sódio durante as semanas 1 a 3 ($p < 0,0001$) (Figura 14); e menos proteína (Figura 10) e fibras totais (Figura 13) durante todo o período ($p < 0,0001$).

Figura 7 – Consumo calórico semanal de acordo com grupo de dieta. Durante a quarta semana os grupos Ração e CAF SR consumiram mais do que os grupos CAF RB e RB ($p < 0,01$); durante a quinta semana, somente o grupo CAF RG ainda consumiu menos do que o grupo Ração ($p < 0,05$).

4.3 Consumo Alimentar Após a Retirada – Semanas 5 e 6

Após retirada total da dieta de cafeteria, as ratas dos grupos CAF RB e CAF RG aumentaram apenas discretamente seu consumo de ração, permanecendo muito abaixo do consumo do grupo C ($p<0,0001$), porém acima do grupo CAF SR ($p<0,0001$) (Figura 8). Durante a quinta semana, houveram diferenças significativas no consumo de ração entre todos os grupos ($p<0,0001$), sendo que o grupo CAF RG consumiu menos do que o grupo CAF RB porque o primeiro ainda tinha uma proporção da dieta de cafeteria disponível durante a semana. Já na sexta semana, o consumo de ração foi similar entre os grupos de retirada, e ambos foram significativamente menor do que o consumo do grupo C ($p<0,0001$), e maior do que o grupo CAF SR ($p<0,0001$).

Durante a quinta semana, o consumo de carboidratos, gorduras totais, gorduras saturadas e sódio dos grupos que sofreram retirada diminuiu significativamente, abaixo do consumo do grupo CAF SR ($p<0,05$), permanecendo similar entre eles (Figuras 9, 11, 12 e 14). O consumo de proteína dos grupos CAF RB e RG permaneceu significativamente mais baixo que o consumo do grupo C ($p<0,005$), mas se tornou significativamente maior do que o grupo CAF SR durante a sexta semana ($p<0,0001$) (Figura 10). O mesmo padrão foi observado para o consumo de fibras totais, que aumentou e foi maior que o consumo do grupo Sem Retirada ($p<0,0001$), porém menor do que o grupo Ração ($p<0,0001$) durante a sexta semana (Figura 13). Durante a sexta semana, o consumo de sódio, gorduras totais e saturadas foi similar entre todos os grupos (Figuras 11, 12 e 14).

Houveram algumas diferenças significativas no consumo alimentar após a retirada entre os grupos RB e RG. As ratas do grupo CAF RB tiveram uma redução de aproximadamente 27% do consumo calórico na primeira semana de retirada, seguido de 19% durante a segunda semana; já o grupo CAF RG, sofreu redução de 23% durante a primeira semana de retirada gradual, seguido de maior redução, de 25% durante a segunda semana. O grupo CAF RB recuperou seu consumo energético e, portanto, de ração, mais rapidamente do que o grupo que passou por retirada gradual (Figura 8). Durante a sexta semana de experimentos, CAF RG foi o único grupo cujo consumo energético permaneceu significativamente abaixo do grupo C ($p<0,05$) (Figura 7).

Figura 8 – Consumo semanal de ração de acordo com grupo de dieta. O grupo C consumiu mais ração do que os outros grupos durante as seis semanas ($p < 0,0001$). Durante a quinta semana, o consumo de todos os grupos foi diferente entre si ($p < 0,0001$). Durante a sexta semana, somente não houveram diferenças entre os grupos CAF RB e CAF RG.

Figura 9 – Consumo de carboidratos semanal de acordo com grupo de dieta. Durante as primeiras quatro semanas não houveram diferenças significativas entre os grupos. Durante a quinta semana, os grupos Ração e CAF SR consumiram mais carboidratos do que os grupos CAF RB e CAF RG ($p < 0,01$). Para a sexta semana, somente houve diferença entre os grupos CAF SR e CAF RG ($p < 0,05$).

Figura 10 – Consumo de proteína semanal de acordo com grupo de dieta. Durante todo o período o consumo proteico do grupo C foi maior do que todos os grupos ($p < 0,0001$). Para a semana 5, somente o consumo entre os grupos CAF SR e CAF RG foi similar. Durante a sexta semana, não houve diferença apenas entre o consumo de CAF RB e RG, que foi maior que CAF SR (0,001), e menor que C ($p < 0,005$).

Figura 11 – Consumo semanal de gorduras totais de acordo com grupo de dieta. O consumo foi similar entre os grupos CAF para todas as semanas, com exceção da 5, e superior ao consumo do grupo C nas semanas 2 e 3. Na semana 5 o consumo do grupo CAF SR foi superior a todos os outros grupos ($p < 0,05$) e na semana 6 não houveram diferenças entre os grupos.

Figura 12 – Consumo semanal de gorduras saturadas de acordo com grupo de dieta. Os grupos CAF SR, RB e RG consumiram mais durante as quatro primeiras semanas ($p < 0,0001$). Durante a quinta semana, somente não houve diferença entre os grupos C e CAF RB. Na semana 6, o consumo de todos os grupos foi similar.

Figura 13 – Consumo semanal de fibras totais de acordo com grupo de dieta. O consumo pelo grupo Ração foi superior durante as seis semanas ($p < 0,0001$). Para a semana 5, o consumo de todos os grupos foi diferente entre si ($p < 0,005$), e para a semana 6 somente o consumo entre CAF RB e RG foi similar.

Figura 14 – Consumo semanal de sódio de acordo com grupo de dieta. Para as três primeiras semanas, o consumo foi similar entre os grupos CAF e superior ao grupo C ($p < 0,01$). Durante a quarta e sexta semanas, o consumo foi similar entre todos os grupos. Durante a quinta semana, somente não houve diferença entre os grupos Ração e CAF RG, que consumiram menos que o grupo CAF SR ($p < 0,0001$), e mais que o grupo CAF RB ($p < 0,05$).

4.4 Labirinto em Cruz Elevado

Não houveram diferenças significativas entre os grupos em todos os parâmetros analisados no labirinto em cruz elevado (Figuras 15 e 16). O grupo CAF Retirada Brusca mostrou tendência a maior número de entradas e tempo despendido nos braços abertos, porém sem atingir diferenças significativas ($p > 0,05$), mesmo entre os grupos C e CAF RB ($p = 0,45$ para o número de entradas, e $p = 0,69$ para o tempo).

A análise ANOVA dos escores do LCE com o fator ‘fase do ciclo estral’ demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos, o que demonstra que o ciclo estral das ratas não interferiu no desempenho destas durante o teste.

Figura 15 – Porcentagem de entradas no braço aberto do labirinto em cruz elevado, em função do total de entradas nos braços abertos e fechados. Não houveram diferenças significativas entre os grupos de tratamento dietético ($p>0,05$).

Figura 16 – Porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, em função do tempo total gastos nos braços abertos e fechados. Não houveram diferenças significativas entre os grupos de tratamento dietético ($p>0,05$).

4.5 Modelo de Restabelecimento

Houveram diferenças significativas no tempo gasto no lado claro da caixa, sendo que o grupo Ração permaneceu significativamente mais tempo neste lado do que os outros três grupos [$F(3, 44) = 10,85, p < 0,0001$] (Figura 17). Para o número de entradas no lado claro, o grupo C entrou significativamente mais do que o grupo CAF SR ($p < 0,05$) (Figura 18); não encontramos diferenças significativas no número de entradas entre os outros grupos, porém o grupo CAF RB mostrou tendência a entrar no lado claro com frequência semelhante ao grupo C, e portanto mais do que o grupo Sem Retirada.

Figura 17 – Tempo dispendido no lado claro durante o teste de restabelecimento. O grupo ração passou significativamente mais tempo no lado claro do que todos os outros grupos ($p < 0,0001$)

Figura 18 – Número de entradas no lado claro durante o teste de restabelecimento. O grupo ração entrou significativamente mais no lado claro do que o grupo Cafeteria Sem Retirada ($p < 0,05$).

4.6 Perfil Lipídico

Foi encontrado efeito significativo da dieta nos valores de colesterol total (COL) e colesterol LDL (cLDL) ($p < 0,05$), sendo que as ratas do grupo Cafeteria Sem Retirada apresentaram níveis significativamente maiores do que o grupo Cafeteria Retirada Gradual (Figuras 19 e 20). Não houveram diferenças significativas nos níveis de TG (Figura 21), cHDL ou VLDL (Figura 22). Apesar do grupo CAF SR mostrar valores maiores de TG e VLDL, e menores de cHDL, a diferença para os níveis dos outros grupos não atingiu níveis convencionais de significância ($p > 0,05$). Entre os grupos que passaram por retirada da dieta de cafeteria, as ratas do grupo CAF RG tiveram os menores valores de COL e cLDL, abaixo dos níveis do grupo Ração, mas sem diferenças significativas entre eles.

Figura 19 – Concentração sérica de colesterol total por grupo de dieta. O grupo Cafeteria Sem Retirada apresentou nível de colesterol significativamente maior do que o grupo Cafeteria Retirada Gradual ($p<0,01$).

Figura 20 – Concentração sérica de colesterol LDL por grupo de tratamento dietético. O grupo Cafeteria Sem Retirada apresentou nível de colesterol significativamente maior do que o grupo Cafeteria Retirada Gradual ($p<0,05$).

Figura 21 – Concentração sérica de triglicérideos totais por grupo de dieta. Não houveram diferenças significativas entre os grupos de tratamento dietético ($p>0,05$).

Figura 22 – Concentrações séricas de colesterol HDL (esquerda) e VLDL (direita) por grupo de dieta. Não houveram diferenças significativas entre os grupos de tratamento dietético ($p>0,05$).

4.7 Regularidade do Ciclo Estral

O teste qui-quadrado de independência mostrou relação significativa entre tratamento dietético e regularidade do ciclo estral ($p < 0,05$) (Figura 23). Os grupos que passaram por retirada da dieta de cafeteria, CAF RB e CAF RG, tiveram significativamente mais ratas ciclando irregularmente do que os grupos CAF SR e C – 75% das ratas do grupo CAF RB tinham ciclos irregulares, e apenas 2 ratas do grupo CAF RG ciclaram regularmente (16,6%). A maioria dos ciclos irregulares ocorreram devido a períodos extensos de diestro.

Figura 23 – Número de animais por grupo de dieta com ciclo estral regular ou irregular.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar em ratas adolescentes os efeitos da oferta e retirada de um modelo de dieta obesogênica, a dieta de cafeteria, no comportamento alimentar, peso corporal, perfil lipídico, ciclo estral, comportamento de ansiedade e motivação. Há estimativas de que todo ano pelo menos 2,8 milhões de pessoas morrem como consequência do sobrepeso e obesidade (WHO, 2016a). Mesmo com tamanha carga, a incidência de obesidade no Brasil e no mundo continua a crescer (WHO 2016b), um dos motivos sendo a falta de aderência a mudanças de hábitos alimentares (ANDERSON et al., 2001). Neste contexto, estudos como o aqui descrito são importantes na medida em que buscam melhor compreender a dificuldade de mudança no comportamento alimentar, de modo que intervenções mais efetivas possam ser desenvolvidas.

Recentemente, a dificuldade de cessar o consumo de certos tipos de alimentos considerados obesogênicos, como os industrializados, tem sido relacionado à hipótese de adicção alimentar (BARRY; CLARKE; PETRY, 2009). Existem mecanismos cerebrais do vício a substâncias já bem conhecidas, como drogas entorpecentes, que estão relacionados a mecanismos envolvidos na alimentação (JOHNSON; KENNY, 2010; ONG et al., 2013). Uma das dificuldades encontradas é a de estabelecer relações de causalidade entre hábitos alimentares, obesidade e vício alimentar (ZIAUDDEEN; FAROOQI; FLETCHER, 2012). Assim, no presente estudo tentamos distinguir entre consequências do consumo de alimentos industrializados, sem advento da obesidade, em ratas que tinham peso corporal similar às ratas alimentadas somente com ração. Foi possível obter um grupo de animais alimentados com dieta de cafeteria, mas de peso similar aos animais alimentados com ração, porque utilizamos de um modelo de oferta limitada por quantidade em ratas na adolescência. Sabe-se que em modelos de compulsão alimentar limitado por tempo, ratos apresentam hiperfagia durante o tempo de oferta da dieta preferida, levando ao excesso de peso (BERNER; AVENA; HOEBEL, 2008). O protocolo de acesso limitado foi utilizado para incitar comportamento de compulsão alimentar, já que há evidência de que as consequências comportamentais e neuronais do consumo da dieta de cafeteria de modo compulsivo (*binge-eating*) resultante do acesso limitado, são diferentes do consumo ilimitado, sem compulsão (CORWIN; AVENA; BOGGIANO, 2011). Há estudos demonstrando que a restrição por tempo ou quantidade têm efeitos similares no comportamento de compulsão (WOJNICKI; JOHNSON; CORWIN, 2008), porém a restrição por quantidade foi utilizada para evitar o ganho de peso excessivo

que é descrito quando os animais têm acesso irrestrito à dieta em um período limitado de tempo; e por se assemelhar à condição humana, já que indivíduos costumam consumir alimentos em porções (BERNER; AVENA; HOEBEL, 2008).

Apesar de não resultar no excesso de peso, o consumo da dieta de cafeteria originou um quadro de compulsão alimentar. Assim que os alimentos da dieta de cafeteria eram ofertados ao início do ciclo claro, as ratas consumiam tudo no mesmo momento. Considerando-se que o ciclo claro caracteriza o período de descanso do roedor, esta mudança na estrutura do alimentar ajuda a compor o diagnóstico de compulsão alimentar (HEYNE et al., 2009). Estudos com humanos observam que indivíduos com diagnóstico de distúrbio de compulsão alimentar tendem a comer menos durante a manhã, e mais lanches de alta densidade calórica durante a noite (DAVIS, 2013). Além disso, os animais desenvolveram um padrão alimentar de compulsão-compensação, marcado pelo consumo da dieta de cafeteria quando disponível, seguido de menor consumo de ração quando a cafeteria não estava disponível. Tal comportamento compensatório, já observado em outros estudos (BERNER; AVENA; HOEBEL, 2008; MARTIRE; WESTBROOK; MORRIS, 2015), resulta no consumo isocalórico em relação a animais de grupos controles, que só tem acesso a ração. O consumo excessivo de um tipo de alimento em um curto período de tempo, especialmente após um período de abstinência, voluntária ou forçada, corresponde a um episódio de compulsão, ou *bingeing* – característica também observada na adicção a drogas (AVENA; RADA; HOEBEL, 2008).

Outro componente característico da compulsão alimentar, diz respeito à inflexibilidade do comportamento; quando as ratas estão acostumadas a receber uma dieta preferida, como a dieta de cafeteria, e esta oferta cessa, o esperado é que a rata passe a consumir a ração disponível – o contrário é indicativo de inflexibilidade (HEYNE et al., 2009; SEGNI et al., 2014). No presente estudo, foi observado que quando ocorreu a retirada da dieta de cafeteria, tanto brusca como gradual, as ratas diminuíram significativamente seu consumo energético, demonstrando certa rejeição à opção disponível. No decorrer das duas semanas em que a dieta de cafeteria não estava disponível, apesar do consumo de ração aumentar, este permaneceu significativamente abaixo do consumo do grupo Ração tanto para o grupo CAF RB, quanto para CAF RG. Tal observação pode ser explicada pelo contraste negativo, caracterizado por uma mudança no comportamento alimentar quando há uma menor qualidade ou quantidade da recompensa esperada; no caso do presente estudo, ao invés da esperada dieta de cafeteria, as ratas passaram a receber ração, alimento de menor palatabilidade (CHEN et al., 2014; ROGERS, 1985).

Apesar da compulsão alimentar compartilhar mecanismos com o vício alimentar, estudos com humanos observam uma associação forte, mas não plena, entre as duas condições (GEARHARDT et al., 2012). Um importante aspecto que parece ser único à adicção é o aparecimento de sintomas fisiológicos e psicológicos de retirada quando a substância aditiva não está mais disponível, como por exemplo maior ansiedade e motivação para recuperar o acesso (SCHULTE; GRILO; GEARHARDT, 2016). A hipótese de que o consumo intermitente de dieta de cafeteria criaria certa dependência a este tipo de alimentação, não foi confirmada pelo nosso estudo, conforme os resultados do LCE e do teste de restabelecimento. Diferentemente de outros estudos em que os animais demonstraram maior ansiedade medida pelo LCE na abstinência da dieta preferida (COTTONE et al., 2009; LALANZA et al., 2014; PICKERING et al., 2009; TEEGARDEN; BALE, 2007), e maior motivação para restabelecer o acesso à dieta preferida após sua retirada (TEEGARDEN; BALE, 2007), aqui o desempenho dos animais que passaram pela retirada da dieta de cafeteria foi similar ao desempenho das ratas que não sofreram retirada. Nossos resultados se assemelham, ao invés, aos de Bocarsly et al. (2011) que demonstraram que ratos que desenvolveram compulsão alimentar a uma dieta rica em açúcar e gordura não demonstraram sinais de retirada, conforme medido pelo LCE.

A comparação entre resultados publicados é dificultada porque a maioria dos estudos que investigaram sintomas de retirada de alimentos não utilizaram dieta de cafeteria, mas combinações de ração suplementadas com açúcar e gordura. A única exceção encontrada é o estudo de Lanza et al. (2014), em que os ratos alimentados com dieta de cafeteria *ad libitum* por sete semanas, apresentaram sintomas de retirada, como maior ansiedade. O esquema de oferta ilimitada e subsequente desenvolvimento de obesidade, entretanto, são diferenças importantes em relação ao presente estudo. É provável que o excesso de peso seja um fator determinante para o aparecimento de sintomas de retirada, já que em estudo por Pickering et al. (2009), somente ratos propensos à obesidade demonstraram sinais de retirada e *craving*, como maior ansiedade e motivação pela dieta. Nossos resultados corroboram com a hipótese de que deve haver ganho de peso excessivo para que um quadro além da compulsão alimentar, mais similar ao vício, seja manifesto em modelos animais.

O acesso ilimitado à dieta de cafeteria resultando em obesidade, mas não o acesso limitado em ratos de peso normal, parece estar relacionado à deficiência na função cerebral de recompensa, sendo que o efeito se mostrou progressivamente pior conforme os ratos ganhavam mais peso (JOHNSON; KENNY, 2010). É provável que o déficit na função recompensadora induzido pela dieta obesogênica contribua para o desenvolvimento da

obesidade, na medida em que aumenta a motivação para o consumo da dieta para evitar ou aliviar o estado negativo de recompensa (BOCARSLY et al., 2011; JOHNSON; KENNY, 2010). Pode ser inferido que o consumo da dieta hiperpalatável nessa situação tem efeito reforçador negativo, sintoma característico do vício, em que o uso da substância ocorre para acabar com os sintomas negativos da abstinência da mesma, e não mais pelo valor intrínseco recompensador da substância, que descreveria o reforço positivo (PARYLAK; KOOB; ZORRILLA, 2011). Podemos dizer que no presente estudo a dieta de cafeteria não adquiriu efeito reforçador negativo para os animais por dois motivos; primeiramente, pois a abstinência da dieta não resultou em estado alterado de ansiedade; e em segundo lugar, porque conforme medido pelo modelo de restabelecimento, ratas que sofreram retirada não apresentaram motivação elevada para restabelecer acesso à dieta de cafeteria. Ao contrário, a compulsão alimentar observada deveu-se somente ao efeito reforçador positivo dos alimentos da dieta de cafeteria. Assim, enquanto o acesso à dieta palatável ativa sistemas cerebrais de recompensa, como observado neste estudo, o acesso crônico prolongado, supostamente acompanhado de obesidade, levaria a menor expressão de receptores relacionados à recompensa, em um mecanismo de regulação decrescente (*down-regulation*), levando ao maior consumo da substância para compensar esse déficit (MARTIRE et al., 2014).

Estudos com humanos estão em sua fase inicial, porém foi encontrado que diagnósticos de vícios alimentares são mais comuns em populações obesas e que já apresentam distúrbio de compulsão alimentar (GEARHARDT et al., 2012). Alguns estudos observaram que a minoria de indivíduos com compulsão alimentar são eutróficos, sendo que estes costumam ser mais jovens e ter menos episódios de compulsão (DINGEMANS; VAN FURTH, 2012). Entretanto, não surpreende os dados de que pessoas com diagnóstico de distúrbio de compulsão alimentar tendem a ganhar peso com o tempo (FIELD et al., 2012). Ao avaliar estudos sobre vício alimentar, Davis (2013) conclui que a alimentação em excesso pode ser vista como um contínuo com diferentes graus de compulsão e severidade (Figura 24).

Figura 24 – Padrão do alimentar em excesso: um espectro de compulsão e severidade (retirado de DAVIS, 2013, tradução nossa).

A hipótese de progressão do quadro de compulsão alimentar para o mais severo vício alimentar estaria de acordo com a suposição de que os animais do presente estudo não apresentaram sintomas de vício alimentar devido a curta duração de exposição à dieta. Martire et al. (2014) encontraram que os efeitos em mecanismos do estresse resultantes da retirada da dieta de cafeteria só apareceram após 15 semanas de dieta, e não após 6 semanas, apontando também para a importância do fator tempo de consumo da dieta na alteração de mecanismos neurais. A exposição de curto prazo – quatro semanas neste trabalho – pode representar um limite não ultrapassado entre compulsão e vício alimentar. É importante considerarmos a possível aplicabilidade clínica destes achados, que demonstram a necessidade de diagnósticos e intervenções precoces de distúrbio de compulsão alimentar em crianças e adolescentes, para impedir a possível progressão a um quadro mais severo.

Conforme medido pelo modelo de restabelecimento, a motivação elevada para obter acesso à dieta de cafeteria observada nos animais com acesso prévio somente à ração é um achado sem precedente na literatura. Alguns estudos observaram que conceder acesso à dieta de cafeteria a ratos alimentados somente com ração por um período de tempo, resulta em maior consumo da dieta de cafeteria por estes animais em relação aos animais que sempre tiveram acesso à dieta de cafeteria (MARTIRE et al., 2014; SOUTH; WESTBROOK; MORRIS, 2012). Os animais do presente estudo com acesso somente à ração conviveram com animais com acesso à dieta de cafeteria sendo expostos a estímulos sensoriais da dieta, principalmente olfatórios. Podemos conjecturar que quando dada a oportunidade de consumir tal dieta, da mesma forma que os animais nos estudos supracitados eram motivados a consumir em excesso em relação aos que sempre tiveram acesso, as ratas no presente estudo apresentaram motivação elevada de tolerar um ambiente iluminado para ter o acesso ao alimento. Mais estudos seriam necessários para explorar os mecanismos envolvidos.

Os animais do presente estudo alimentados com dieta de cafeteria sem interrupção tiveram seus parâmetros metabólicos alterados, apesar de não desenvolverem obesidade. O grupo CAF SR apresentou concentração sérica de colesterol total e colesterol LDL significativamente maior do que o grupo CAF RG. Maior concentração de colesterol total e/ou LDL já foram demonstrados em estudos com oferta de dieta de cafeteria desde o desmame (LALANZA et al., 2014; SAGAE et al., 2012). Nossos achados demonstram que é possível a reversão destes parâmetros pouco tempo após a retirada da dieta, já que para o grupo CAF RG apenas uma semana sem dieta de cafeteria foi suficiente para melhora do perfil lipídico. Dados similares foram encontrados por Lanza et al. (2014), que observou reversão dos níveis alterados de triglicerídeos após alimentar ratos jovens com dieta de

cafeteria por sete semanas, seguido de retirada da dieta e oferta somente de ração durante a oitava semana. O resultado encontrado traz otimismo ao estudo de mudanças de hábitos alimentares em indivíduos jovens, já que demonstra a rápida reversão de parâmetros metabólicos alterados quando a intervenção é feita ainda durante a adolescência.

O consumo e retirada da dieta de cafeteria resultou também em alterações importantes na regularidade do ciclo estral das ratas. Alguns estudos apontam para efeitos negativos da obesidade causada pelo consumo excessivo de dieta de cafeteria na função reprodutiva de ratas (GLICK et al., 1990; SAGAE et al., 2012). Porém, aqui encontramos que mesmo sem o desenvolvimento da obesidade, foi a oferta e subsequente retirada da dieta palatável que resultou em interrupções no ciclo estral regular, já que o grupo CAF SR tinha mais ratas com ciclos regulares do que os grupos CAF RB e RG. O relato de Leigh et al. (1998) foi o único encontrado descrevendo uma associação entre *binge eating* em ratas de peso normal e alterações no ciclo estral caracterizado por períodos prolongados de diestro, de forma similar ao nosso estudo. Neste estudo, os efeitos da dieta foram revertidos três meses após a oferta da dieta de cafeteria ser cessada. Entretanto, como no presente estudo foram as ratas que sofreram retirada que apresentaram irregularidades, consideramos que a provável causa não foi a dieta de cafeteria ou ganho de peso, mas a restrição calórica resultante da retirada. Dos Santos et al. (2011) demonstraram que restrição calórica de 50% em relação aos animais controle alimentados *ad libitum* resultou em interrupção da ciclicidade do ciclo estral da maioria das ratas. De forma menos severa, em nosso estudo as ratas do grupo CAF RB tiveram uma redução de aproximadamente 27% do consumo calórico anterior na primeira semana de retirada, seguido de 19% durante a segunda semana; já o grupo CAF RG, que teve mais ratas ciclando irregularmente, sofreu redução de 23% durante a primeira semana de retirada gradual, seguido de redução de 25% durante a segunda semana. No estudo de Glick et al. (1990) entretanto, a reversão da dieta de cafeteria para a ração, mesmo com menor consumo calórico e perda de peso, resultou no retorno da ciclicidade estral das ratas, que havia sido interrompido durante o período de alimentação em excesso. A discrepância de resultados aponta para a necessidade de mais estudos para investigar o papel da oferta e da retirada da dieta de cafeteria no ciclo estral de ratas adolescentes. É importante também que profissionais da saúde em contexto clínico estejam atentos a mudanças na função reprodutiva de meninas que apresentam distúrbios alimentares, ou buscam tratamento dietético.

6 CONCLUSÕES

- ✓ A oferta limitada, de curto prazo, pós-desmame da dieta de cafeteria foi efetiva no desenvolvimento de compulsão alimentar em ratas adolescentes. As ratas expostas à dieta de cafeteria mostraram clara preferência por esta em comparação com a ração. O diagnóstico de compulsão foi composto devido ao consumo completo da porção após sua oferta durante o ciclo claro; pelo desenvolvimento de padrão de consumo compulsão-compensação; e pela inflexibilidade do comportamento alimentar após a retirada da dieta de cafeteria.
- ✓ O acesso limitado à dieta de cafeteria garantiu que todas as ratas mantivessem peso corporal similar durante o estudo. Porém, a taxa de ganho de peso das ratas expostas à dieta de cafeteria foi mais rápida do que as ratas alimentadas somente com ração.
- ✓ A manutenção do peso similar às ratas somente alimentadas com ração foi independente, entretanto, da modificação prejudicial de parâmetros metabólicos. As ratas alimentadas com dieta de cafeteria apresentaram hipercolesterolemia, a qual foi totalmente revertida pela abstinência de apenas uma semana da dieta.
- ✓ A retirada completa da dieta de cafeteria e consequente diminuição do consumo energético foi responsável por alterações importantes no ciclo reprodutivo das ratas. A maioria das ratas dos grupos Cafeteria Retirada Gradual e Brusca passaram a ciclar irregularmente.
- ✓ Após retirada da oferta de dieta de cafeteria, as ratas não demonstraram nível alterado de ansiedade em relação às ratas dos grupos Cafeteria Sem Retirada e Ração, conforme medido pelo labirinto em cruz elevado.
- ✓ As ratas que passaram por retirada da dieta de cafeteria, não demonstraram motivação elevada para restituir o acesso à esta, conforme medido pelo teste de restabelecimento. Ao contrário, ratas que só tiveram acesso à ração durante o estudo, mostraram comportamento de tomada de risco para obter acesso à dieta de cafeteria.
- ✓ Não houveram diferenças significativas em todos os parâmetros avaliados, entre os modelos de retirada brusca ou gradual da dieta de cafeteria.

REFERÊNCIAS

- AMBROSINI, G. L. Childhood dietary patterns and later obesity: a review of the evidence. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 73, n. 01, p. 137-146, 2014.
- ANDERSON, J. W.; KONZ, E. C.; FREDERICH, R. C.; WOOD, C. L. Long-term weight-loss maintenance: a meta-analysis of US studies. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 5, p. 579-584, 2001.
- AVENA, N. M.; BOCARSLY, M. E.; RADA, P.; KIM, A.; HOEBEL, B. G. After daily bingeing on a sucrose solution, food deprivation induces anxiety and accumbens dopamine/acetylcholine imbalance. **Physiology & Behavior**, v. 94, n. 3, p. 309-315, 2008.
- AVENA, N. M.; LONG, K. A.; HOEBEL, B. G. Sugar-dependent rats show enhanced responding for sugar after abstinence: evidence of a sugar deprivation effect. **Physiology & Behavior**, v. 84, n. 3, p. 359-362, 2005.
- AVENA, N. M.; RADA, P.; HOEBEL, B. G. Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 1, p. 20-39, 2008.
- AVENA, N. M.; RADA, P.; HOEBEL, B. G. Sugar and fat bingeing have notable differences in addictive-like behavior. **The Journal of Nutrition**, v. 139, n. 3, p. 623-628, 2009.
- BARRY, D.; CLARKE, M.; PETRY, N. M. Obesity and its relationship to addictions: is overeating a form of addictive behavior? **American Journal on Addictions**, v.18, n. 6, p. 439-451, 2009.
- BERNER, L. A.; AVENA, N. M.; HOEBEL, B. G. Bingeing, self-restriction, and increased body weight in rats with limited access to a sweet-fat diet. **Obesity**, v. 16, n. 9, p. 1998-2002, 2008.
- BERTHOUD, H. R.; MORRISON, C. The brain, appetite, and obesity. **Annual Review of Psychology**, v. 59, p. 55-92, 2008.
- BIRCH, L. L. Development of food preferences. **Annual Review of Nutrition**, v. 19, n. 1, p. 41-62, 1999.
- BIRCH, L. L.; FISHER, J. O.; DAVISON, K. K. Learning to overeat: maternal use of restrictive feeding practices promotes girls' eating in the absence of hunger. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 2, p. 215-220, 2003.

- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD R. J.; RODGERS, R. J. Risk assessment and animal models of anxiety. **Animal Models in Psychopharmacology**. Birkhäuser, Basel, p.117-134, 1991.
- BOCARSLY, M. E.; BERNER, L. A.; HOEBEL, B. G.; AVENA, N. M. Rats that binge eat fat-rich food do not show somatic signs or anxiety associated with opiate-like withdrawal: implications for nutrient-specific food addiction behaviors. **Physiology & Behavior**, v. 104, n. 5, p. 865-872, 2011.
- BOGGIANO, M. M.; ARTIGA, A. I.; PRITCHETT, C. E.; CHANDLER-LANEY, P. C.; SMITH, M. L.; ELDRIDGE, A. J. High intake of palatable food predicts binge-eating independent of susceptibility to obesity: an animal model of lean vs obese binge-eating and obesity with and without binge-eating. **International Journal of Obesity**, v. 31, n. 9, p. 1357-1367, 2007.
- CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1193-1205, 2005
- CHAVES, V. E.; FRASSON, D.; MARTINS-SANTOS, M. E.; NAVEGANTES, L. C.; GALBAN, V. D.; GARÓFALO, M. A.; MIGLIORINI, R. H. Fatty acid synthesis and generation of glycerol-3-phosphate in brown adipose tissue from rats fed a cafeteria diet. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 86, n. 7, p. 416-423, 2008.
- CHEN, Y. W.; FISCELLA, K. A.; BACHARACH, S. Z.; CALU, D. J. Effect of cafeteria diet history on cue-, pellet-priming-, and stress-induced reinstatement of food seeking in female rats. **PloS ONE**, v. 9, n. 7, p. e102213, 2014.
- COLANTUONI, C.; RADA, P.; MCCARTHY, J.; PATTEN, C.; AVENA, N. M.; CHADEAYNE, A.; HOEBEL, B. G. Evidence that intermittent, excessive sugar intake causes endogenous opioid dependence. **Obesity Research**, v. 10, n. 6, p. 478-488, 2002.
- CORWIN, R. L.; AVENA, N. M.; BOGGIANO, M. M. Feeding and reward: perspectives from three rat models of binge eating. **Physiology & Behavior**, v. 104, n. 1, p. 87-97, 2011.
- CORWIN, R. L.; HAYES, J. E. Are sugars addictive? Perspectives for practitioners. in fructose, high fructose corn syrup, sucrose and health (p. 199-215). Springer New York. 2014.
- COTTONE, P.; SABINO, V.; STEARDO, L.; ZORRILLA, E. P. Consummatory, anxiety-related and metabolic adaptations in female rats with alternating access to preferred food. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 1, p. 38-49, 2009.

DAVIS, C. Compulsive overeating as an addictive behavior: overlap between food addiction and binge eating disorder. **Current Obesity Reports**, v. 2, n. 2, p. 171-178, 2013.

DE MACEDO, I. C.; DE FREITAS, J. S.; DA SILVA TORRES, I. L. The influence of palatable diets in reward system activation: a mini review. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2016, Article ID 7238679, 7 pages, 2016.

DINGEMANS, A. E.; VAN FURTH, E. F. Binge eating disorder psychopathology in normal weight and obese individuals. **International Journal of Eating Disorders**, v. 45, n. 1, p. 135-138, 2012.

DOS SANTOS, Z. A.; DA SILVA, R. J.; BACURAU, R. F. P.; TIRAPEGUI, J.; RIBEIRO, S. M. L. Effect of food restriction and intense physical training on estrous cyclicity and plasma leptin concentrations in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 57, n. 1, p. 1-8, 2011.

EGUCHI, R.; CHEIK, N. C.; OYAMA, L. M.; NASCIMENTO, C. M. O. D.; MELLO, M. T. D.; TUFIK, S.; DÂMASO, A. Efeitos do exercício crônico sobre a concentração circulante da leptina e grelina em ratos com obesidade induzida por dieta. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 3, p. 182-187, 2008.

ERLANSON-ALBERTSSON, C. How palatable food disrupts appetite regulation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 97, n. 2, p. 61-73, 2005.

ESTEVE, M.; RAFECAS, I.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; REMESAR, X.; ALEMANY, M. Effect of a cafeteria diet on energy intake and balance in Wistar rats. **Physiology & Behavior**, v. 56, n. 1, p. 65-71, 1994.

FARAJIAN, P.; RISVAS, G.; PANAGIOTAKOS, D. B.; ZAMPELAS, A. Food sources of free sugars in children's diet and identification of lifestyle patterns associated with free sugars intake: the GRECO (Greek Childhood Obesity) study. **Public Health Nutrition**, v. 19, n. 13, p. 2326-2335, 2016.

FIELD, A. E.; SONNEVILLE, K. R.; MICALI, N.; CROSBY, R. D.; SWANSON, S. A.; LAIRD, N. M.; TREASURE, J.; SOLMI, F.; HORTON, N. J. Prospective association of common eating disorders and adverse outcomes. **Pediatrics**, v. 130, n. 2, p. e289-e295, 2012.

FREDERICK, C. B.; SNELLMAN, K.; PUTNAM, R. D. Increasing socioeconomic disparities in adolescent obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 4, p. 1338-1342, 2014.

FRENCH, S. A.; STORY, M.; JEFFERY, R. W. Environmental influences on eating and physical activity. **Annual Review of Public Health**, v. 22, n. 1, p. 309-335, 2001.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

FRYE, C. A.; PETRALIA, S. M.; RHODES, M. E. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3 α , 5 α -THP. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 67, n. 3, p. 587-596, 2000.

GARNER, D. M.; WOOLEY, S. C. Confronting the failure of behavioral and dietary treatments for obesity. **Clinical Psychology Review**, v. 11, n. 6, p. 729-780, 1991.

GEARHARDT, A. N.; CORBIN, W. R.; BROWNELL, K. D. Preliminary validation of the Yale food addiction scale. **Appetite**, v. 52, n. 2, p. 430-436, 2009.

GEARHARDT, A. N.; YOKUM, S.; ORR, P. T.; STICE, E.; CORBIN, W. R.; BROWNELL, K. D. Neural correlates of food addiction. **Archives of General Psychiatry**, v. 68, n. 8, p. 808-816, 2011a.

GEARHARDT, A. N.; DAVIS, C.; KUSCHNER, R.; BROWNELL, K. D. The addiction potential of hyperpalatable foods. **Current Drug Abuse Reviews**, v. 4, n. 3, p. 140-145, 2011b.

GEARHARDT, A. N.; WHITE, M. A.; MASHEB, R. M.; MORGAN, P. T.; CROSBY, R. D.; GRILO, C. M. An examination of the food addiction construct in obese patients with binge eating disorder. **International Journal of Eating Disorders**, v. 45, n. 5, p. 657-663, 2012.

GLICK, Z.; YAMINI, S.; LUPIEN, J.; SOD-MORIAH, U. Estrous cycle irregularities in overfed rats. **Physiology & Behavior**, v. 47, n. 2, p. 307-310, 1990.

GOULARTE, J. F.; FERREIRA, M. B.; SANVITTO, G. L. Effects of food pattern change and physical exercise on cafeteria diet-induced obesity in female rats. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 8, p. 1511-1518, 2012.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1-5, 1984.

HEBE BRAND, J.; ALBAYRAK, Ö.; ADAN, R.; ANTEL, J.; DIEGUEZ, C.; DE JONG, J.; VAN DER PLASSE, G. "Eating addiction", rather than "food addiction", better captures addictive-like eating behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 47, p. 295-306, 2014.

HEYNE, A.; KIESSELBACH, C.; SAHÚN, I.; MCDONALD, J.; GAIFFI, M.; DIERSSEN, M.; WOLFFGRAMM, J. Research focus on compulsive behaviour in animals: An animal model of compulsive food-taking behaviour. **Addiction Biology**, v. 14, n. 4, p. 373-383, 2009.

HUBSCHER, C. H.; BROOKS, D. L.; JOHNSON, J. R. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 80, n. 2, p. 79-87, 2005.

IBGE - Coordenação de Trabalho e Rendimento. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil**. Rio de Janeiro, 2011.

JEFFERY, R. W.; EPSTEIN, L. H.; WILSON, G. T.; DREWNOWSKI, A.; STUNKARD, A. J.; WING, R. R. Long-term maintenance of weight loss: current status. **Health Psychology**, v. 19, n. 1S, p. 5, 2000.

JOHNSON, P. M.; KENNY, P. J. Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 5, p. 635-641, 2010.

KENNY, P. J. Reward mechanisms in obesity: new insights and future directions. **Neuron**, v. 69, n. 4, p. 664-679, 2011.

KIM, S. Y.; SIM, S.; PARK, B.; KONG, I. G.; KIM, J. H.; CHOI, H. G. Dietary habits are associated with school performance in adolescents. **Medicine**, v. 95, n. 12, p. e3096, 2016.

KOCH, M. A. Chapter 18 - Experimental Modeling and Research Methodology, In American College of Laboratory Animal Medicine, edited by Mark A. Suckow, Steven H. Weisbroth and Craig L. Franklin, Academic Press, Burlington, p. 587-625, **The Laboratory Rat** (Second Edition), 2006.

LALANZA J. F.; CAIMARI A.; DEL BAS J. M.; TORREGROSA D.; CIGARROA I.; PALLAS, M.; CAPDEVILA, L.; AROLA, L.; ESCORIHUELA, R. M. Effects of a post-weaning cafeteria diet in young rats: metabolic syndrome, reduced activity and low anxiety-like behaviour. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e85049, 2014.

LEIGH, A. J.; STOCK, M. J.; LACEY, J. H.; WILSON, C. A. J. Diet-induced loss of cyclic ovarian function at normal body weight in a rodent model for bulimia nervosa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 112, n. 2, p. 217-223, 1998.

LING, J.; ROBBINS, L. B.; WEN, F. Interventions to prevent and manage overweight or obesity in preschool children: A systematic review. **International Journal of Nursing Studies**, v. 53, p. 270-289, 2016.

- LISTER, R. G. The use of plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 180-185, 1987.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.
- MARTIRE, S. I.; MANIAM, J.; SOUTH, T.; HOLMES, N.; WESTBROOK, R. F.; MORRIS, M. J. Extended exposure to a palatable cafeteria diet alters gene expression in brain regions implicated in reward, and withdrawal from this diet alters gene expression in brain regions associated with stress. **Behavioural Brain Research**, v. 265, p.132-141, 2014.
- MARTIRE, S. I.; WESTBROOK, R. F.; MORRIS, M. J. Effects of long-term cycling between palatable cafeteria diet and regular chow on intake, eating patterns, and response to saccharin and sucrose. **Physiology & Behavior**, v. 139, p. 80-88, 2015.
- MATTOS, M. C.; NASCIMENTO, P. C. B. D.; ALMEIDA, S. S.; COSTA, T. M. B. Influência de propagandas de alimentos nas escolhas alimentares de crianças e adolescentes. **Psicologia: Teoria e Prática**, v. 12, n. 3, p. 34-51, 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Vigitel Brasil 2013 : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Disponível em: <bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2013>
- MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory drive. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 48, n. 4, p. 254-260, 1955.
- NIELSEN, B.L. On the interpretation of feeding behaviour measures and the use of feeding rate as an indicator of social constraint. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 63, n. 1, p. 79-91, 1999.
- ONG, Z. Y.; WANASURIA, A. F.; LIN, M. Z.; HISCOCK, J.; MUHLHAUSLER, B. S. Chronic intake of a cafeteria diet and subsequent abstinence. Sex-specific effects on gene expression in the mesolimbic reward system. **Appetite**, v. 65, p. 189-199, 2013.
- PAES, V. M.; ONG, K. K.; LAKSHMAN, R. Factors influencing obesogenic dietary intake in young children (0–6 years): systematic review of qualitative evidence. **BMJ Open**, v. 5, n. 9, p. e007396, 2015.
- PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 219-233, 2001.

PARYLAK, S. L.; KOOB, G. F.; ZORRILLA, E. P. The dark side of food addiction. **Physiology & Behavior**, v. 104, n. 1, p. 149-156, 2011.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PICKERING, C.; ALSIÖ, J.; HULTING, A. L.; SCHIÖTH, H. B. Withdrawal from free-choice high-fat high-sugar diet induces craving only in obesity-prone animals. **Psychopharmacology**, v. 204, n. 3, p. 431-443, 2009.

PINI, R. T. B.; DO VALES, L. D. M. F.; BRAGA COSTA, T. M.; ALMEIDA, S. S. Effects of cafeteria diet and high fat diet intake on anxiety, learning and memory in adult male rats. **Nutritional Neuroscience**, p. 1-13, 2016.

REILLY, J. J.; METHVEN, E.; MCDOWELL, Z. C.; HACKING, B.; ALEXANDER, D.; STEWART, L.; KELNAR, C. J. Health consequences of obesity. **Archives of Disease in Childhood**, v. 88, n. 9, p. 748-752, 2003.

REIS, F. M. C. V.; PESTANA-OLIVEIRA, N.; LEITE, C. M.; LIMA, F. B.; BRANDÃO, M. L.; GRAEFF, F. G.; ANSELMO-FRANCI, J. A. Hormonal changes and increased anxiety-like behavior in a perimenopause-animal model induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) in female rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 49, p. 130-140, 2014.

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DAVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 289-304, 1997.

ROGERS, P. J. Returning ‘cafeteria-fed’ rats to a chow diet: negative contrast and effects of obesity on feeding behaviour. **Physiology & Behavior**, v. 35, n. 4, p. 493-499, 1985.

RUPA VANI, K.; VEENA, K. S.; SUBITHA, L.; HEMANTH KUMAR, V. R.; BUPATHY, A. Menstrual abnormalities in school going girls – are they related to dietary and exercise pattern? **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 11, p. 2537, 2013.

SADEGHIRAD, B.; DUHANEY, T.; MOTAGHIPISHEH, S.; CAMPBELL, N. R. C.; JOHNSTON, B. C. Influence of unhealthy food and beverage marketing on children's dietary intake and preference: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. **Obesity Reviews**, v. 17, n. 10, p. 945-959, 2016.

SAGAE, S. C.; MENEZES, E. F.; BONFLEUR, M. L.; VANZELA, E. C.; ZACHARIAS, P.; LUBACZEUSKI, C.; FRANCI, C. R.; SANVITTO, G. L. Early onset of obesity induces reproductive deficits in female rats. **Physiology & Behavior**, v. 105, n. 5, p. 1104-1111, 2012.

- SAMPEY, B. P.; VANHOOSE, A. M.; WINFIELD, H. M.; FREEMERMAN, A. J.; MUEHLBAUER, M. J.; FUEGER, P. T.; MAKOWSKI, L. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity**, v. 19, n. 6, p. 1109-1117, 2011.
- SAPER, C. B.; CHOU, T. C.; ELMQUIST, J. K. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. **Neuron**, v. 36, n. 2, p. 199-211, 2002.
- SCHULTE, E. M.; AVENA, N. M.; GEARHARDT, A. N. Which foods may be addictive? The roles of processing, fat content, and glycemic load. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0117959, 2015.
- SCHULTE, E. M.; GRILO, C. M.; GEARHARDT, A. N. Shared and unique mechanisms underlying binge eating disorder and addictive disorders. **Clinical Psychology Review**, v. 44, p. 125-139, 2016.
- SCLAFANI, A.; SPRINGER, D. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. **Physiology & Behavior**, v. 17, n. 3, p. 461-471, 1976.
- SEgni, M. D.; PATRONO, E.; PATELLA, L.; PUGLISI-ALLEGRA, S.; VENTURA, R. Animal models of compulsive eating behavior. **Nutrients**, v. 6, n. 10, p. 4591-4609, 2014.
- SHAFAT, A.; MURRAY, B.; RUMSEY, D. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. **Appetite**, v. 52, n. 1, p. 34-38, 2009.
- SOUTH, T.; WESTBROOK, F.; MORRIS, M. J. Neurological and stress related effects of shifting obese rats from a palatable diet to chow and lean rats from chow to a palatable diet. **Physiology & Behavior**, v. 105, n. 4, p. 1052-1057, 2012.
- TEEGARDEN, S. L.; BALE, T. L. Decreases in dietary preference produce increased emotionality and risk for dietary relapse. **Biological Psychiatry**, v. 61, n. 9, p. 1021-1029, 2007.
- VISSCHER, T. L. S.; KREMERS, S. P. J. How can we better prevent obesity in children? **Current Obesity Reports**, v. 4, n. 3, p. 371-378, 2015.
- WARNEKE, W.; KLAUS, S.; FINK, H.; LANGLEY-EVANS, S. C.; VOIGT, J. P. The impact of cafeteria diet feeding on physiology and anxiety-related behaviour in male and female Sprague-Dawley rats of different ages. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 116, p. 45-54, 2014.

WOJNICKI, F. H. E.; JOHNSON, D. S.; CORWIN, R. L. W. Access conditions affect binge-type shortening consumption in rats. **Physiology & Behavior**, v. 95, n. 5, p. 649-657, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Comission on ending childhood obesity: Facts and figures on childhood obesity. 2014. Disponível em: < <http://www.who.int/end-childhood-obesity/facts/en/>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Health Observatory (GHO) data. 2016a. Disponível em: <http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/obesity_text/en/>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Health Organization fact sheet. Obesity and overweight. 2016b. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>.

WRIGHT, T.; LANGLEY-EVANS, S. C.; VOIGT, J. P. The impact of maternal cafeteria diet on anxiety-related behaviour and exploration in the offspring. **Physiology & Behavior**, v. 103, n. 2, p. 164-172, 2011.

ZIAUDDEEN, H.; FAROOQI, I. S.; FLETCHER, P. C. Obesity and the brain: how convincing is the addiction model? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 279-286, 2012.

ANEXOS

Anexo A - Certificado de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

Campus de Ribeirão Preto

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeitos de um modelo de oferta e retirada de dieta de cafeteria sobre o comportamento alimentar e ansiedade em ratas", processo nº 15.1.1680.59.1, sob a responsabilidade de Raquel Lunardi Baccetto que envolve manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - USP (CEUA FFCLRP) em reunião de 02/06/2016.

Vigência do Projeto	07/06/2016 a 07/08/2016
Espécie/Linhagem	Rato Wistar
Nº de animais	48
Idade	Recém - nascido
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério de Criação - PUSP-RP

Ribeirão Preto, 07 de junho de 2016.

Prof. Dr. Ademilson Panunto Castelo
Presidente da CEUA FFCLRP -