

## CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO PRÉ-CLÍNICO PARA O ESTUDO DA COMORBIDADE PSIQUIÁTRICA COMPULSÃO ALIMENTAR ASSOCIADA A DEPRESSÃO EM CAMUNDONGOS C57BL/6 MACHOS

MARIANA PARRON PAIM<sup>1</sup>; LETÍCIA DEVANTIER KRÜGER<sup>2</sup>; LARISSA SANDER MAGALHÃES<sup>2</sup>; DIANER NORNBERG STRELOW<sup>2</sup>; CÉSAR AUGUSTO BRÜNING<sup>2</sup>; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas (UFPeL) – Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM) – [maa\\_paim@hotmail.com](mailto:maa_paim@hotmail.com);

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas (UFPeL) – Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM) - [leticiadevantier@hotmail.com](mailto:leticiadevantier@hotmail.com); [larissasama@hotmail.com](mailto:larissasama@hotmail.com); [dianer\\_strelow@hotmail.com](mailto:dianer_strelow@hotmail.com); [cabruning@yahoo.com.br](mailto:cabruning@yahoo.com.br)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas (UFPeL) – Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM) - [cbortolato@gmail.com](mailto:cbortolato@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

O Transtorno de Compulsão Alimentar Periódica (TCAP) é o transtorno alimentar mais recorrente, atingindo de 2 a 5% da população mundial. Entre as pessoas com sobrepeso ou obesidade, essa taxa aumenta em até 30% (KESSLER et al, 2016; KUCHARSKA et al, 2017). De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (DSM-V), uma pessoa com episódios compulsivos regularmente estabelecidos apresenta uma ingestão alimentar muito rápida em comparação com as outras pessoas, mesmo sem fome. Após o ato de comer exagerado, sentimentos de culpa, vergonha e desgosto aparecem (DSM-V 2014). O consumo exacerbado pode ser intensificados por eventos de estresse, ansiedade e depressão. Esses eventos foram muito evidenciados durante a pandemia, período em que muitas pessoas que passaram pelo isolamento social durante a pandemia relataram ter tido hábitos alimentares mais insalubres, como consumir alimentos de conforto, aumentando os casos de TCAP (CECCHETTO, et al. 2021).

O manejo para a remissão da doença é baseado em terapia comportamental cognitiva, terapia de base familiar e farmacoterapia. Essa última é, geralmente, feita com antidepressivos (KLEIN, et al. 2021). Entretanto, são conhecidos os efeitos adversos e a limitada eficácia dos fármacos atualmente disponíveis no mercado. Além disso, objetivou-se a realização de testes adicionais ao protocolo piloto afim de analisar a associação do comportamento alimentar com o comportamento do tipo depressivo.

### 2. METODOLOGIA

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos com peso médio de 20-25g mantidos em caixas separadas. Os animais, aprovados para uso de acordo com código para cadastro, tinham aproximadamente 60 dias e foram provenientes do Biotério Central da UFPeL. Eles foram divididos uniformemente em relação ao peso e ao consumo alimentar em quatro grupos, sendo eles: naïve (N), controle (C), jejum 16h (J16) e jejum 20h (J20).

Todos os grupos receberam água *ad libitum*. Os animais que estavam no grupo naïve tiveram acesso ilimitado à ração. Já o grupo controle, além de ração ilimitada, também teve acesso à solução de sacarose 10% *ad libitum*. O grupo J16 teve restrição total à ração e solução de sacarose entre 16h00-8h00 (16h totais), possuindo, portanto, uma janela alimentar de 8 horas por dia. O J20 ficou sem ração e sacarose 10% das 12h00 até 08h00 do dia seguinte (20h totais), o que resulta em uma janela alimentar diária de 4h. Com base em estudos e achados na literatura, optou-se por um protocolo de duração curta (10 dias) para a indução do comportamento alimentar compulsivo (YASOSHIMA; SHIMURA, 2015), que foi precedido por um período de adaptação e acompanhamento de medidas basais

(peso e consumo) para melhor distribuição dos animais entre os grupos experimentais.

Após o período de treinamento para o estabelecimento da compulsão alimentar, foram realizados, no 11º dia, o teste alimentar e os demais testes comportamentais bem como a eutanásia para a retirada de tecidos. O teste alimentar consiste em oferecer ração, água e sacarose 10% para todos os grupos, inclusive o grupo N, e monitorar o consumo na primeira e quarta hora.

Os demais testes comportamentais foram: teste do labirinto em cruz elevada (TLCE) (HANDLEY e MITHANI, 1984), teste de suspensão pela cauda (TSC) (STERU, et al. 1985) e teste de tomada de risco (TTR) feito no aparato claro/escuro (CRAWLEY e GOODWIN, 1980).

A análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism 8.0.2 e para a comparação múltipla entre os grupos foi utilizada a análise de variância ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e um  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

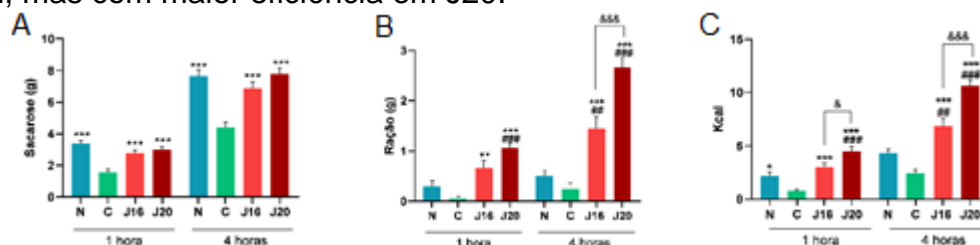
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teste alimentar como mostrado na figura 1 demonstram que os grupos J16 e J20 apresentaram um aumento significativo no consumo de solução de sacarose em relação ao grupo controle, tanto na primeira hora do teste quanto na quarta hora ( $F_{(3, 34)} = 20,12$  e  $F_{(3, 34)} = 17,37$  respectivamente, ambos com  $p < 0,0001$ ) (Fig. 1A). Este elevado consumo de solução nos grupos jejuns quando comparado ao controle demonstra o comportamento alimentar compulsivo estabelecido nos animais. Além disso, também observou-se que o grupo naïve (N) ingeriu maior volume de sacarose quando comparado ao grupo controle (C) ( $F_{(3, 34)} = 20,12$ ;  $p < 0,0001$ ). Sobre este achado, acreditamos que o aumento na ingesta observado no grupo naïve seja devido ao fator “novidade” (e não compulsão alimentar), levando-se em conta que estes animais nunca haviam tido contato prévio com a solução hiperpalatável.

Analisando o consumo de ração peletizada (Fig. 1B), foi observado um aumento significativo em grupos expostos ao jejum (J16 e J20) em relação ao controle na primeira hora de teste alimentar e nas quatro horas totais, sendo o consumo alimentar mais pronunciado no grupo J20 ( $F_{(3, 34)} = 17,42$  e  $F_{(3, 34)} = 40,97$ ; ambos com  $p < 0,0001$ ).

Ao ser contabilizado o somatório de ingesta calórica (Fig. 1C), foram detectadas diferenças significativas entre os grupos expostos ao jejum (J16 e J20) e o grupo controle, com efeitos mais proeminentes no grupo J20 ( $F_{(3, 34)} = 22,37$ ;  $F_{(3, 34)} = 44,09$ ; sendo ambos  $p < 0,0001$ ). Ainda, no dia do teste alimentar foi verificado que o grupo naïve ao ser exposto pela primeira vez à solução de sacarose teve o consumo de calorias mais direcionado a essa solução, com consumo usual de ração reduzido em relação às medidas basais durante o protocolo de treinamento (dados não mostrados).

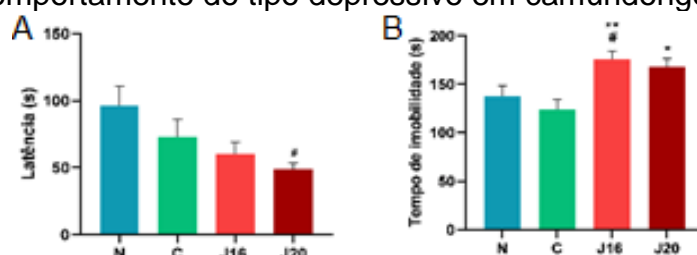
Em conjunto, os dados obtidos do teste de ingesta alimentar demonstram que o estresse crônico de restrição alimentar durante 10 dias (treinamento) é eficiente para induzir o comportamento de compulsão alimentar em ambos os protocolos de jejum, mas com maior eficiência em J20.



**Figura 1.** Efeito dos períodos de jejum por 16 e 20h no teste do teste alimentar realizado com solução de sacarose 10% e ração peletizada para roedores. (A) Consumo de solução de sacarose no teste alimentar, (B) Consumo de ração, (C) Consumo total de calorias. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M (n = 9-10). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao grupo controle. ## $p < 0,01$  e ### $p < 0,001$  em comparação ao grupo naíve. & $p < 0,05$ ; && $p < 0,001$  ao comparar grupos J16 e J20 entre si. ANOVA de uma via/Tukey.

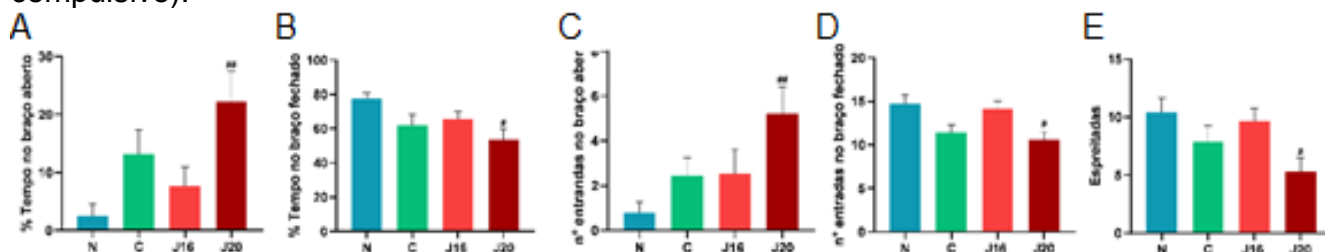
No TSC (Fig. 2), nota-se que houve uma menor latência para o primeiro episódio de imobilidade nos animais J20 em relação ao grupo naíve ( $F_{(3, 30)} = 3,270$ ;  $p = 0,0347$ ) (Fig. 2A). Para o tempo total de imobilidade (Fig. 2B), foi observado um aumento nos grupos J16 e J20 em relação ao grupo controle bem como no grupo J16 quando comparado ao grupo naíve ( $F_{(3, 31)} = 5,794$ ;  $p = 0,0029$ ).

Dessa forma, sugere-se a associação entre o comportamento compulsivo alimentar e o comportamento do tipo depressivo em camundongos.



**Figura 2.** Efeito dos períodos de jejum por 16 e 20h no teste de suspensão da cauda (TSC) para análise do comportamento do tipo depressivo em roedores. (A) Latência para o primeiro episódio de imobilidade, (B) Tempo de imobilidade. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M (n = 9-10). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  em comparação ao grupo controle e #  $p < 0,05$  em comparação ao grupo naíve. ANOVA de uma via/Tukey.

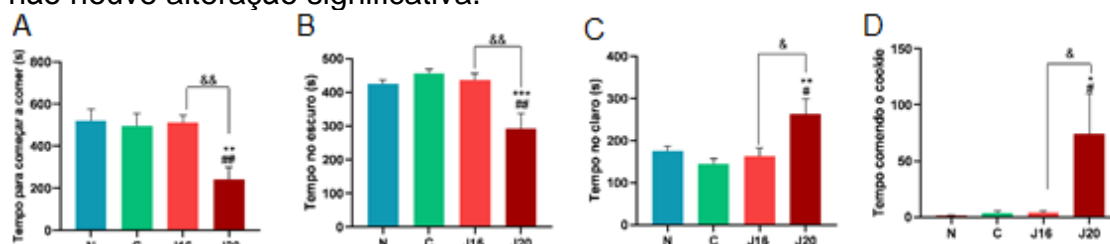
Como demonstrado na figura 3, no TLCE apenas o grupo J20 apresentou um aumento significativo no tempo destinado ao braço aberto ( $F_{(3, 33)} = 4,998$ ;  $p = 0,0057$ ) (Fig. 3A), tempo reduzido nos braços fechados ( $F_{(3, 34)} = 3,356$ ;  $p = 0,0300$ ) (Fig. 3B), maior número de entradas nos braços abertos ( $F_{(3, 33)} = 4,020$ ;  $p = 0,0153$ ) (Fig. 3C), diminuição das entradas nos braços fechados ( $F_{(3, 34)} = 4,611$ ;  $p = 0,0082$ ) (Fig. 3D), e menor números de espreitadas ( $F_{(3, 35)} = 3,425$ ;  $p = 0,0276$ ) (Fig. 3E), tudo corroborando para indícios de uma maior excitabilidade e uma menor diminuição da percepção do medo, características do vício (neste caso, do comportamento alimentar compulsivo).



**Figura 3.** Efeito do teste do labirinto em cruz elevada. (A) % tempo gasto nos braços abertos, (B) % de tempo gasto nos braços fechados, (C) nº de entradas nos braços abertos, (D) nº de entradas nos braços fechados, (E) nº de espreitadas. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M (n = 9-10). \* $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$  em comparação ao grupo naíve. ANOVA de uma via/Tukey.

Por fim, no teste de tomada de risco, feito em uma caixa de claro/escuro, foi colocado uma bolacha no lado aversivo (iluminado) para analisar o comportamento de arriscar-se relacionado ao compulsivo alimentar dos camundongos. Nesse teste, apenas o J20 apresentou maior tempo significativo no lado aversivo ( $F_{(3, 35)} = 5,506$ ;  $p = 0,0033$ ) (Fig. 4C), menor tempo no lado escuro ( $F_{(3, 35)} = 8,426$ ;  $p = 0,0002$ ) (Fig. 4B), e um menor tempo de latência para iniciar a comer o biscoito colocado do lado

claro, como mostra a figura 4 A ( $F_{(3, 35)} = 6,922$ ;  $p=0,0009$ ). Além disso, o J20 ficou um tempo maior comendo o biscoito em comparação a todos os outros grupos ( $F_{(3, 54)} = 4,304$ ;  $p=0,0086$ ) (Fig. 4D). Foram analisados os cruzamentos entre o lado claro e escuro para averiguar o deslocamento dos animais (atividade locomotora), e não houve alteração significativa.



**Figura 4.** Efeito do teste de tomada de risco. (A) Tempo para o início da alimentação, (B) Tempo gasto no lado escuro, (C) Tempo gasto no lado claro. (D) Tempo gasto comendo o biscoito. Os Valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M ( $n = 9-10$ ). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao grupo controle. # $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$  em comparação ao grupo naíve. & $p < 0,05$  e && $p < 0,01$  ao comparar J16 e J20. ANOVA de uma via/ Tukey.

#### 4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que ambos os períodos de jejum testados (16h - J16, ou 20h - J20) produzem comportamento compulsivo alimentar. Porém, o protocolo baseado no jejum por 20h é o que apresenta maior evidência para reproduzir comportamento compulsivo e permitir a associação desse comportamento com maior impacto negativo a outros transtornos mentais como depressão e ansiedade. Como perspectivas futuras, o grupo J20 será utilizado para mapeamento do funcionamento de novos compostos como forma de elucidar melhores alternativas para fins terapêuticos para a TCAP.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KESSLER, R.M; HUTSON, P.H; HERMAN, B.K; POTENZA, M.N. The neurobiological basis of binge-eating disorder. **Neurosci. Biobehav. Rev.** Estados Unidos, v. 63, p. 223-238, 2016.
- KUCHARSKA, K. KOSTECKA, B. TYLEC, A. BONDER, E. WILKOS, E. Binge eating disorder – Etiopathogenesis, disease and treatment. **Adv. Psychiatry. Neurol.** v. 26, n. 3, p. 154–164, 2017.
- Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: **DSM-5. 5.** ed. Porto Alegre: Artmed, 2014
- CECCHETTO, C. AIELLO, M. GENTILI, C, IONTA, S.OSIMO, S.A. Increased emotional eating during COVID-19 associated with lockdown, psychological and social distress. **Appetite.** Itália, v.160, p. 1-9. 2021.
- KLEIN, D.A. SYLVESTER, J.E. SCHVEY, N.A. Eating disorders in primary care: diagnosis and management. **American Academy of Pediatrics**, v. 103, n. 1, p. 22-32, 2021.
- YASOSHIMA, Y. SHIMURA, T. A mouse model for binge-like sucrose overconsumption: Contribution of enhanced motivation for sweetener consumption. **Physiol. Behav.** Japão, v. 138, p. 154-164, 2015.
- HANDLEY, S.L. MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.327, n.1, p.1-5. 1984.
- STERU, L. CHERMAT, R. THIERRY, B. SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology.** Berl, v. 85, p. 367-70, 1985.
- Crawley, J. e Goodwin, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav**, v.13, n.2, p.167-170. 1980.