

Letícia de Souza

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E METABÓLICAS  
INDUZIDAS PELA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE FRUTOSE  
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Fleury Fina Speretta

Florianópolis  
2019

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

Souza, Letícia de

Alterações comportamentais e metabólicas induzidas  
pela administração crônica de frutose em camundongos  
/ Letícia de Souza ; orientador, Prof. Dr. Eduardo  
Luiz Gasnhar Moreira, coorientador, Prof. Dr.  
Guilherme Fleury Fina Speretta , 2019.

105 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,  
Programa de Pós-Graduação em Neurociências,  
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Frutose. 3. Síndrome  
Metabólica. 4. Memória; Aprendizado. 5. Depressão;  
Camundongo. I. Moreira, Prof. Dr. Eduardo Luiz  
Gasnhar . II. Speretta , Prof. Dr. Guilherme Fleury  
Fina . III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

**“Alterações comportamentais e metabólicas induzidas pela administração crônica de frutose em camundongos”**

Por

**Letícia de Souza**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (001/2019/PGN) do Programa de Pós-Graduação em Neurociências - UFSC.

  
Prof.(a) Dr.(a) Adair Roberto Soares dos Santos  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Banca examinadora:

  
Dr.(a) Eduardo Luiz Gasnhar Moreira (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)

  
Dr.(a) Mauricio Peña Cunha (Universidade Federal de Santa Catarina)

  
Dr.(a) Marcelo Farina (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 22 de fevereiro de 2019.



## AGRADECIMENTOS

Essa é a produção de dois anos de jornada durante meu mestrado, jornada essa que me fez evoluir muito profissionalmente e intelectualmente através de todo conhecimento adquirido, mas também pessoalmente através de pessoas que conheci e experiências que vivi. E é nesse espaço que gostaria de destacar e agradecer todas essas pessoas especiais que me apoiaram e ajudaram a construir esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, grande pessoa e orientador.

Agradeço-o por ter me dado a oportunidade de entrar no mestrado e acreditado em meu potencial, assim como, o apoio em algumas ideias. Obrigada pelo sempre presente respeito em minhas escolhas e o incentivo a sermos independentes.

Aos professores: Dr. Guilherme Fleury Fina Speretta e Dr. Alex Rafacho pelo suporte e disponibilidade de aprender técnicas em seus laboratórios.

Ao professor Dr. Geisson Marcos Nardi pelo auxílio e participação nos protocolos cardiovasculares deste trabalho.

Aos colegas de Laboratório Adriano, Raul, Eslen, Izolene, Giovana, Sara pela amizade, parceria, conversas e troca de ideias produtivas e muitas risadas e momentos alegres. Vocês fizeram toda a diferença.

Aos demais colegas do PPGNeuro, pela receptividade, colaborações, cursos e eventos que participamos e ministramos juntos.

A todos os professores do Curso de Pós-graduação em Neurociências, pela qualidade do curso e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos meus pais, Patrícia e Rafael, por me incentivarem a lutar por meus sonhos e correr atrás dos meus objetivos e sempre estarem presentes na minha vida, com muito amor e dedicação.

Ao Jean por ter encarado essa caminhada acadêmica de dois anos junto comigo, foram muitos finais de semana estudando juntos e também muitos momentos felizes. Essa jornada nos fortaleceu e o amor só cresceu, obrigada por tudo.

A Universidade Federal de Santa Catarina, por ser um espaço democrático e acolhedor.

Ao projeto amanhecer HU-UFSC pela oportunidade de atuar como psicóloga voluntária e atender a comunidade universitária, foi um período

e experiência enriquecedora. Acredito que a relação pós-graduação e comunidade deve ser fortalecida e incentivada.

Aos órgãos de fomento CNPq e CAPES pelas bolsas de estudo e auxílio financeiro.

## RESUMO

A adição de frutose na alimentação aumentou em, pelo menos, 25% nos últimos 30 anos, como consequência da adição de açúcares à dieta, como por exemplo, açúcar de mesa e xarope de milho rico em frutose. Evidências clínicas e não-clínicas mostraram que o alto consumo de bebidas açucaradas ricas em frutose está diretamente relacionado ao desenvolvimento da obesidade e suas consequências, e.g., síndrome metabólica. Mais recentemente, tem havido um crescente interesse nos possíveis efeitos colaterais da frutose no sistema nervoso central (SNC), com evidências de que distúrbios metabólicos podem afetar a sinalização da insulina no cérebro e contribuir para o desenvolvimento de comprometimento cognitivo, transtornos do humor e mudanças na plasticidade sináptica. Assim, o objetivo do presente estudo foi caracterizar as alterações comportamentais (ou seja, cognitivas e emocionais) e metabólicas induzidas pela administração crônica de frutose em camundongos Swiss machos e fêmeas. Para tanto, foram utilizados 60 camundongos machos e 60 camundongos fêmeas, com três meses de idade, ao início dos experimentos. Os animais receberam, durante 8 semanas, água potável (filtrada) ou água potável contendo frutose (a uma concentração de 15 % ou 30% p / v) *ad libitum*. Todos os animais tiveram livre acesso à dieta padrão de roedores. Após o período de 8 semanas, os animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais na seguinte ordem: campo aberto, reconhecimento de objetos, labirinto em T, teste da borrifagem de sacarose, suspensão pela cauda e labirinto em cruz elevado. Observou-se que o consumo crônico de frutose em uma concentração de 15% não induziu alterações na memória e aprendizado dos animais, entretanto refletiu em comportamento anedônico em camundongos machos e fêmeas. Ademais, em termo metabólico, houve apenas um aumento na concentração plasmática de colesterol em camundongos fêmeas. Por outro lado, o protocolo experimental com a concentração de 30% de frutose induziu comprometimento cognitivo e alterações do tipo ansiogênica e do tipo depressiva em camundongos fêmeas e machos. O consumo crônico de frutose também induziu significativo ganho de peso, hipercolesterolemia, hipertriacilglicerolemia e intolerância à glicose em camundongos machos e fêmeas. Além disso, o consumo de frutose, na concentração de 30%, aumentou a variação da pressão arterial média em resposta a agentes vasoconstritores e diminuiu tal variação em resposta a agentes vasodilatores. Tal alteração foi relacionada a uma maior densidade do

receptor AT1 no leito mesentérico dos animais. Em conjunto, os resultados enfatizam que, além das alterações metabólicas, o consumo crônico de frutose também pode desencadear importantes mudanças comportamentais, isto é, emocionais e cognitivas em roedores. Há várias ressalvas ao se extrapolar os resultados de modelos animais para possíveis efeitos da frutose sobre o comportamento humano, mas o presente estudo propõe um modelo experimental para o estudo futuro dos possíveis mecanismos neurais subjacentes.

**Palavras-chave:** Frutose; Síndrome Metabólica; Memória; Aprendizado; Depressão; Camundongo.

## ABSTRACT

The addition of fructose in the feed has increased by at least 25% in the past 30 years, especially by the addition of sugars to the diet, e.g., table sugar and fructose rich corn syrup. Clinical and nonclinical evidence has shown that the high consumption of sugary beverages rich in fructose is directly related to the development of obesity and its consequences, e.g., metabolic syndrome. More recently, there has been increasing interest in the potential side effects of fructose on the central nervous system (CNS), with evidence that metabolic disorders may affect insulin signaling in the brain and contribute to the development of cognitive impairment and changes in synaptic plasticity. Thus, the aim of the present study was to characterize the behavioral (i.e., cognitive and emotional) and metabolic changes induced by chronic fructose administration in male and female Swiss mice. For this purpose, 60 male and 60 female mice, with three months old, were used at the beginning of the experiments. The animals received, for 8 weeks, drinking water (filtered) or drinking water containing fructose (at a concentration of 15% or 30% w / v) ad libitum. All animals had free access to standard rodent diet. After the 8-week period, the animals were submitted to a battery of behavioral tests in the following order: open field, object recognition, T-maze, splash test, tail suspension and elevated plus maze. It was observed that chronic consumption of fructose at a concentration of 15% did not induce cognitive deficits, although reflected in depressive behavior in males and females. In addition, regarding the metabolic data, it was observed only an increase in the plasma cholesterol levels in females. On the other hand, in the protocol at a concentration of 30%, it was observed that the chronic consumption of fructose induced cognitive impairments and anxiogenic and depressive-like changes in female and male mice. Moreover, the chronic consumption of fructose induced a significant weight gain, hypercholesterolemia, hypertriacylglycerolemia and glucose intolerance in male and female mice. Finally, fructose consumption increased the mean variation of blood pressure in response to vasoconstricting agents and decreased the variation in response to vasodilator agents. This alteration was associated with a higher density of the AT1 receptor in the mesenteric bed of the animals. Collectively, the results emphasize that, in addition to metabolic changes, chronic consumption of fructose may also trigger important behavioral, i.e., emotional and cognitive changes in rodents. There are several caveats when extrapolating the results of animal models for putative effects of fructose on human behavior, but the

present study proposes an experimental model for the future study of the possible underlying neural mechanisms.

**Keywords:** Fructose; Metabolic Syndrome; Memory; Learning; Depression; Rodents.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Adultos com depressão são mais propensos a serem obesos do que adultos sem depressão. <sup>1</sup>Significativamente diferente em relação ao grupo sem depressão. <sup>2</sup>Significativamente diferente em relação ao grupo das mulheres..... 23
- Figura 2 - Os efeitos do diabetes mellitus tipo 2 (T2DM) e desordem depressiva (TDM) no cérebro e no sistema neuroendócrino. Disfunções no eixo HPA, como hiperatividade, são responsáveis pela liberação de altos níveis de cortisol. ACTH: hormônio adrenocorticotrópico, CRH: hormônio liberador de corticotropina, GR: receptor glicocorticóide, HPA: hipotálamo-hipófise-adrenal..... 25
- Figura 3 - Consumo do xarope de milho nos Estados Unidos, entre os anos de 1970 e 2015, demonstrado em libras por pessoa. Os adoçantes de derivados do milho, apresentaram um crescimento acentuado nesse período..... 26
- Figura 4 - Vias intracelulares de metabolização hepática da frutose e da glicose. A frutose é metabolizada no fígado através de processos que envolvem as enzimas, frutocinase, aldolase e triocinase..... 29
- Figura 5 - O consumo excessivo de frutose pode aumentar a lipogênese de novo, proporcionando também o acúmulo de gordura no fígado (esteatose hepática). A resistência à insulina e estresse oxidativo alimentam um ambiente lipotóxico no fígado, que pode resultar em inflamação hepática e lesão levando à fibrose. .... 30
- Figura 6 - Potenciais relações entre a alta ingestão de frutose com doenças humanas. O consumo exagerado de frutose, está relacionado com um aumento da ingestão calórica, obesidade, resistência a insulina, dislipidemia, diabetes, aterosclerose, pressão alta e doença vascular. .. 31
- Figura 7 - Possíveis mecanismos envolvidos na dislipidemia induzida pela frutose. 1. Aumento na lipogênese intestinal, 2. Aumento na lipogênese hepática, 3. Alta secreção de VLDL – TG, 4. Baixa liberação VLDL – TG, 5. Baixa oxidação de gordura. .... 33
- Figura 8 - O papel chave dos receptores de insulina na memória. A sinalização fisiológica da insulina, atua em processos de plasticidade sináptica e aprendizado, quando essa sinalização tem interferências esses processos são prejudicados..... 35
- Figura 9 - Desenho experimental I. Linha do tempo do cronograma de tratamento com a concentração de 15% frutose. Os animais receberam a frutose na água de beber pelo período de 8 semanas. Finalizado o período

de tratamento, foram realizados os testes comportamentais, na semana 9 o teste de tolerância a glicose e demais coletas plasmáticas foram feitas, finalizando com a eutanásia. ....	42
Figura 10 - Desenho experimental I. Linha do tempo do cronograma de tratamento com a concentração de 30% frutose. Os animais receberam a frutose na água de beber pelo período de 8 semanas. Finalizado o período de tratamento, foram realizados os testes comportamentais, na semana 9 o teste de tolerância a glicose e demais coletas plasmáticas foram feitas, finalizando com a eutanásia. ....	43
Figura 11 - Teste do Campo Aberto. Foram avaliados o (A) número de cruzamentos totais, (B) levantamentos verticais (rearing), (C) porcentagem de cruzamentos centrais e (D) porcentagem de tempo no centro, em camundongos machos e fêmeas. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. ....	51
Figura 12 - Teste do Reconhecimento de Objetos. Foram avaliados (A) o número de cruzamentos totais durante a sessão de treino, (B) índice de reconhecimento durante a sessão de treino, (C) o número de cruzamentos totais durante a sessão de teste e (D) o índice de reconhecimento durante a sessão de teste. Os valores estão expressos em média + e erro padrão da média. & p <0.05 comparado grupo macho controle (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Newman Keuls). *p<0,05 comparado aos 50% (nível de chance) Teste t de Student. ....	53
Figura 13 - Teste do Labirinto em T. Foram avaliados (A) número total de cruzamentos na sessão de treino, (B) número total de cruzamentos na sessão de teste, (C) porcentagem de tempo no braço novo na sessão de teste e (D) alternância forçada. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. *p <0.05 comparado aos 33% (nível de chance) teste t. ....	54
Figura 14 - Teste da Borrifagem de Sacarose. Foram avaliadas a (A) latência para auto-limpeza, (B) tempo total de auto-limpeza. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. #P<0.05 comparado com controle do mesmo sexo (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Newman Keuls). ....	55
Figura 15 - Teste da Suspensão pela Cauda. Foram avaliados a (A) latência para imobilidade, (B) tempo total de imobilidade. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. #p <0.05 comparado ao grupo controle do mesmo sexo (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Newman Keuls). ....	56

Figura 16 - Teste do Labirinto em Cruz Elevado. Foram avaliados os parâmetros de (A) total de entradas no braço fechado, (B) porcentagem de tempo no aberto e (C) porcentagem de tempo no braço aberto. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média (ANOVA de duas vias).....	56
Figura 17 - Teste da Tolerância à Glicose. Foram avaliadas (A) a curva temporal da concentração plasmática de glicose e (B) a somatória total dos pontos referentes ao gráfico da curva temporal. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média (ANOVA de duas vias, com medidas repetidas em A). .....	58
Figura 18 - Concentração plasmática de (A) colesterol total e (B) triglicérides. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. #p <0.05 comparado ao controle do mesmo sexo (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Newman Keuls). .....	58
Figura 19 - Avaliação da variação de massa corporal (g). Os valores estão expressos em média + erro padrão da média (ANOVA de duas vias). .	59
Figura 20 - Teste do Campo Aberto. Foram avaliados o (A) número total de cruzamentos totais, (B) número de levantamentos verticais, rearing, (C) porcentagem de cruzamentos centrais e (D) porcentagem de tempo no centro. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. #P<0,05 comparado com controle do mesmo sexo (ANOVA de duas vias seguido do teste de Newman Keuls). .....	60
Figura 21 - Teste do Reconhecimento de Objetos. Foram avaliados (A) o número de cruzamentos totais durante a sessão de treino, (B) índice de reconhecimento durante a sessão de treino, (C) o número de cruzamentos totais durante a sessão de teste e (D) o índice de reconhecimento durante a sessão de teste. Os valores estão expressos em média + e erro padrão da média. *p<0,05 comparado aos 50% (nível de chance) Teste t de Student. ....	61
Figura 22 - Teste do Labirinto em T. Foram avaliados (A) número total de cruzamentos na sessão de treino, (B) total de cruzamentos na sessão teste, (C) porcentagem de tempo no braço novo na sessão de teste e (D) alternância forçada. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. *p <0.05 comparado aos 33% (nível de chance); teste “t” de Student.....	62
Figura 23 - Teste da Borrifagem de Sacarose. Foram avaliados a (A) latência para auto-limpeza e (B) tempo de auto-limpeza. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. #p <0.05 comparado com controle do mesmo sexo (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-	

hoc de Newman Keuls); &p <0,05 comparado com o grupo macho frutose (teste “t” de Student). .....63

Figura 24 - Teste da Suspensão pela Cauda. Foram avaliados a (A) latência para imobilidade e (B) tempo de imobilidade. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. #p <0.05 comparado ao controle do mesmo sexo (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Newman Keuls). &p <0,05 comparado ao grupo fêmea frutose (Teste “t” de Student). .....64

Figura 25 - Teste do Labirinto em Cruz Elevado. Foram avaliados (A) número total de entradas nos braços fechados, (B) porcentagem de tempo nos braços abertos e (C) porcentagem de tempo nos braços abertos. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. ....65

Figura 26 - Teste da Tolerância à Glicose. Foram avaliadas (A) a curva temporal da concentração plasmática de glicose e (B) a somatória total dos pontos referentes ao gráfico da curva temporal. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. #p <0.05 comparado ao respectivo grupo controle (ANOVA de duas vias, com medias repetidas em A, seguida pelo teste de Newman Keuls). .....66

Figura 27 - Concentração plasmática de (A) colesterol total e (B) triglicérides. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. #p <0.05 comparado ao controle do mesmo sexo (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Newman Keuls). #p <0.05 comparado ao controle do mesmo sexo (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Newman Keuls). .....67

Figura 28 - Avaliação da variação de massa corporal (g). Os valores estão expressos em média + erro padrão da média (ANOVA de duas vias). #p <0.05 comparado ao controle do mesmo sexo (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Newman Keuls). .....68

Figura 29 - Variação de pressão arterial média após a (A) administração de 3 doses consecutivas de angiotensina II (2,63; 7,88 e 23,63 ng/kg) e (B) duas doses de nitroprussiato de sódio (2,4 e 24,0 µg/kg). \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 em comparação com o respectivo grupo controle (ANOVA de duas vias e teste post hoc de Newman Keuls). .....69

Figura 30 - Imunoconteúdo (densitometria óptica) do receptor AT1 no leito mesentérico. \*P<0,05; em comparação com o respectivo grupo controle (teste “t” de student). .....70

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Evidências experimentais relacionando dietas ricas em frutose com alterações comportamentais em estudos pré-clínicos. ....	37
---	----



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1 OBESIDADE E COMORBIDADES .....	19
1.2 CONSUMO DE FRUTOSE .....	25
1.3 ALTERAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS PELO CONSUMO CRÔNICO DE FRUTOSE .....	27
1.4 EFEITOS DA FRUTOSE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL .....	33
1.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE DIETAS RICAS EM FRUTOSE E ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS .....	36
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	39
2.1 OBJETIVO GERAL .....	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	39
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
3.1 ANIMAIS .....	41
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	41
3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS .....	43
<b>3.3.1 Teste de reconhecimento de objeto</b> .....	<b>43</b>
<b>3.3.2 Teste da alternância forçada</b> .....	<b>44</b>
<b>3.3.3 Teste de Suspensão pela Cauda</b> .....	<b>45</b>
<b>3.3.4 Teste da Borrifagem de Sacarose (<i>Splash Teste</i>)</b> .....	<b>45</b>
<b>3.3.5 Labirinto em cruz elevado</b> .....	<b>46</b>
3.4 ENSAIOS METABÓLICOS E CARDIOVASCULARES .....	46
<b>3.4.1 Determinação de parâmetros plasmáticos</b> .....	<b>46</b>
<b>3.4.2 Avaliação da Reatividade Vascular</b> .....	<b>47</b>
<b>3.4.3 Análises de <i>western blott</i></b> .....	<b>48</b>
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	49
<b>4. RESULTADOS</b> .....	51
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL I: PROTOCOLO DE FRUTOSE NA CONCENTRAÇÃO DE 15% .....	51
<b>4.1.1 Campo Aberto</b> .....	<b>51</b>
<b>4.1.2 Reconhecimento de Objetos</b> .....	<b>52</b>
<b>4.1.3 Labirinto em T</b> .....	<b>53</b>
<b>4.1.4 Teste da Borrifagem de Sacarose (<i>Splash Teste</i>)</b> .....	<b>54</b>

<b>4.1.5</b>	<b>Teste da Suspensão pela Cauda .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1.6</b>	<b>Teste do Labirinto em Cruz Elevado .....</b>	<b>56</b>
<b>4.2</b>	<b>ANÁLISES METABÓLICAS .....</b>	<b>57</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Teste de Tolerância à Glicose.....</b>	<b>57</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Concentração plasmática de colesterol e triglicerídeos .....</b>	<b>58</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Variação da massa corporal.....</b>	<b>59</b>
<b>4.3</b>	<b>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL II: PROTOCOLO DE FRUTOSE NA CONCENTRAÇÃO DE 30% .....</b>	<b>59</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Campo Aberto .....</b>	<b>59</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Teste de Reconhecimento de Objetos .....</b>	<b>60</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Labirinto em T .....</b>	<b>61</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Teste da Borrifagem de Sacarose (<i>Splash Teste</i>) .....</b>	<b>63</b>
<b>4.3.5</b>	<b>Teste da Suspensão pela Cauda .....</b>	<b>63</b>
<b>4.3.6</b>	<b>Teste do Labirinto em Cruz Elevado .....</b>	<b>64</b>
<b>4.4</b>	<b>ANÁLISES METABÓLICAS .....</b>	<b>65</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Teste de Tolerância à Glicose.....</b>	<b>65</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Concentração Plasmática de Colesterol e Triglicerídeos.....</b>	<b>66</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Variação da Massa Corporal .....</b>	<b>67</b>
<b>4.5</b>	<b>ANÁLISES CARDIOVASCULARES .....</b>	<b>68</b>
<b>4.5.1</b>	<b>Reatividade Vascular .....</b>	<b>68</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Expressão do Receptor AT1 no Leito Mesentérico .....</b>	<b>69</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>85</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 OBESIDADE E COMORBIDADES

A obesidade é uma doença crônica, caracterizada pelo excesso de gordura corporal, que causa prejuízos à saúde do indivíduo. O número de crianças e adultos obesos, ou com sobrepeso, é cada vez maior em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Desta forma, a Organização Mundial de Saúde (OMS) passou a considerar a obesidade como um problema de saúde pública tão preocupante quanto a desnutrição (Pinheiro et al., 2004). Diversas patologias e condições clínicas estão associadas à obesidade. Alguns exemplos são: apneia do sono, acidente vascular encefálico, fertilidade reduzida em homens e mulheres, hipertensão arterial, diabetes tipo 2, dislipidemias, doenças cardiovasculares, cálculo biliar, aterosclerose e síndrome metabólica. Ainda, a obesidade está associada ao desenvolvimento de vários tipos de câncer, como o de mama, útero, próstata e intestino, assim como, doenças pulmonares e problemas ortopédicos. Os prejuízos que o excesso de peso pode causar ao indivíduo são muitos e envolvem desde distúrbios não fatais, embora comprometam seriamente a qualidade de vida, até o risco de morte prematura (Baynes; Dominiczak, 2007).

A OMS alerta que um em cada oito adultos em todo o planeta é obeso. A projeção é de que, em 2025, cerca de 2,3 bilhões de indivíduos estejam com excesso de peso, sendo mais de 700 milhões com obesidade. A obesidade infantil é um dos mais sérios desafios da saúde pública global do século 21, afetando todos os países do mundo. Em apenas 40 anos o número de crianças em idade escolar e adolescentes com obesidade aumentou mais de 10 vezes, de 11 milhões para 124 milhões (estimativas de 2016). Além disso, estima-se que 216 milhões foram classificados com excesso de peso, mas não obesos em 2016 (WHO, 2018).

A Síndrome Metabólica (MetS, do inglês *metabolic syndrome*) é conhecida como um agrupamento de condições patológicas, incluindo obesidade abdominal, hipertensão, dislipidemia e hiperglicemia. Está intimamente associada ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e risco de doença cardiovascular (Castellano et al., 2018). A MetS representa um problema sério em países em desenvolvimento, apresentando alta prevalência (30% a 40% na faixa etária 65 anos), e tanto sua prevalência como incidência estão aumentando (Han et al., 2016). O desenvolvimento da MetS é associado, principalmente, a características do estilo de vida, como a inatividade física, tabagismo, ingestão de álcool

frequentemente acentuada e dieta inadequada. No entanto, fatores genéticos e epigenéticos estão emergindo como fatores de importância primordial em sua fisiopatologia (Das et al., 2016).

O termo “diabesidade”, usado pela primeira vez em 1973 para designar a ocorrência de obesidade e diabetes tipo 2 (DM2) no mesmo indivíduo (Sims et al., 1973), é hoje reconhecido como um importante conceito de reflexão no que tange a intrínseca relação entre doenças não transmissíveis e sua ocorrência na sociedade atual (Verma e Hussain, 2017). Doenças não transmissíveis (também conhecidas como doenças crônicas) são geralmente de longa duração e resultam de uma combinação de fatores genéticos, fisiológicos, ambientais e de fatores comportamentais. Neste cenário, a obesidade tem sido associada principalmente com um desbalanço energético, que resulta de uma maior ingestão calórica em comparação com o gasto calórico. Este desequilíbrio de energia é principalmente causado por dietas com alto teor de gordura / alto teor de carboidratos e inatividade física. Ao longo do tempo, a obesidade pode desencadear várias condições de risco à saúde, especialmente DM2 (Astrup e Finer, 2000).

De fato, há evidências sugerindo que tão pouco quanto 5% de perda de peso já é suficiente para prevenir, na maioria dos indivíduos obesos com intolerância à glicose, o desenvolvimento de DM2 (Astrup e Finer, 2000). A DM2, um distúrbio metabólico complexo multifacetado, é caracterizada por um estado de hiperglicemia crônica e resistência a insulina, que leva a complicações graves e comorbidades, sendo responsável por mais de 90% de todos os casos de diabetes mellitus (Zimmet et al., 2001). Um balanço calórico cronicamente positivo induz sobrecarga na capacidade de armazenamento lipídico do tecido adiposo. Como resultado, os ácidos graxos livres podem induzir respostas de estresse celular, entre outros processos, como inflamação hepática sistêmica, as quais podem causar uma redução na sensibilidade à insulina no músculo esquelético (Bacchi et al., 2013).

Por outro lado, a consciência de que o cérebro e a periferia estão interconectados em unidades rigorosamente reguladas está ganhando a atenção da comunidade científica e médica (Shalev e Arbuckle, 2017). Assim, além dos efeitos deletérios sobre a saúde acima expostos e das consequências psicológicas nos indivíduos, como, por exemplo, preocupações com o estigma que pessoas com sobrepeso e obesas frequentemente experimentam, estudos clínicos e epidemiológicos de larga escala demonstram que existe uma relação entre obesidade, DM2 e alterações desfavoráveis na estrutura e função cerebral (Pedditzi et al., 2016; Stillman et al., 2017). Neste contexto, foi sugerido que uma

considerável sobreposição de risco, comorbidade e mecanismos metabólicos alterados ocorrem em DM2 e indivíduos com sobrepeso/obesos (Ribeiro et al., 2018; Valladolid-Acebes et al., 2012).

Um mecanismo que é de interesse particular, dado seu papel no sistema nervoso central e representa uma raiz comum para ambos os distúrbios metabólicos, é a desregulação progressiva da via de sinalização da insulina e conseqüente estado de resistência à insulina, como uma das principais características da obesidade e DM2 (Cardoso et al., 2017; Ferrario e Reagan, 2018). Enquanto a resistência periférica à insulina representa o insucesso dos órgãos/tecidos sensíveis à insulina (fígado, músculo esquelético e tecido adiposo) para responder ao hormônio que é liberado após o aumento da concentração de glicose no sangue, a resistência a insulina cerebral afeta múltiplos processos incluindo a transmissão sináptica, regulação do metabolismo corporal e aprendizagem e memória (Cardoso et al., 2009; Obici et al., 2002). Acredita-se que a resistência à insulina é relacionada com o envelhecimento, inatividade física, obesidade e estresse, entre outros, que afetam vários processos celulares (Patti e Corvera, 2010).

Diversas evidências clínicas e epidemiológicas indicam que a ocorrência de obesidade e diabetes pode evoluir para várias possibilidades de comorbidades nas fases intermédias da vida, incluindo alto risco de declínio cognitivo e demência, o que pode levar a um aumento drástico na prevalência de doenças neurodegenerativas (Girard et al., 2018; Kandimalla et al., 2017; Prickett et al., 2015; Whitmer et al., 2005; Wolf et al., 2007). Em particular, os índices de antropometria para determinar sobrepeso e obesidade (índice de massa corporal;  $IMC \geq 25$  e  $30$ , respectivamente) e circunferência da cintura (homens  $>102$  cm e mulheres  $>88$  cm) demonstraram estar fortemente correlacionadas ao desempenho cognitivo dos pacientes (Elias et al., 2003, 2012) e a um aumento do risco de demência de início tardio por todas as causas, como a doença de Alzheimer (DA), a forma mais comum de demência em idosos (Albanese et al., 2017; Fitzpatrick et al., 2009; Gustafson et al., 2003; Kivipelto et al., 2005).

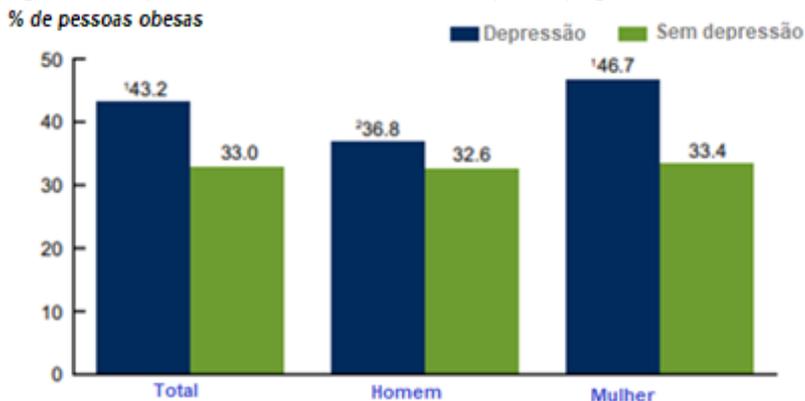
Além da relação entre a obesidade e o declínio cognitivo, outra comorbidade associada a esse quadro clínico são os transtornos de humor, sendo que esses também representam uma preocupação para a saúde pública. Em um estudo clínico, com dados coletados em 60 países, foi relatada a prevalência de 3,2% de ao menos um episódio depressivo ao longo de doze meses (Moussavi et al., 2008). A OMS relata que o transtorno depressivo maior (TDM) é a principal causa de incapacidade para homens e mulheres (WHO, 2008). Assim como a obesidade, a

depressão também parece aumentar o risco de desenvolvimento de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, AVC e aumento da mortalidade (Hunot et al., 2010; Clarke et al., 2009).

O TDM é uma síndrome clínica, sendo suas características principais o humor deprimido, vazio ou irritável, acompanhado de mudanças somáticas e cognitivas que afetam significativamente o bem-estar do indivíduo. Embora possa ocorrer apenas um episódio ao longo da vida, geralmente é uma condição crônica. Para se encaixar no critério para TDM, a pessoa precisa apresentar cinco dos sintomas citados abaixo, sendo que ou o sintoma 1 ou o sintoma 2 precisam estar presentes, sendo eles: humor deprimido na maior parte do dia e quase todos os dias; interesse ou prazer marcadamente diminuídos em relação a todas ou quase todas as atividades, quase todos os dias; Perda ou ganho de peso significativo; Insônia ou sono excessivo quase todos os dias; Agitação ou lentidão psicomotora quase todos os dias; Fadiga ou perda de energia quase todos os dias; Sentir-se sem valor ou com culpa excessiva, quase todos os dias; Habilidade reduzida de pensar ou se concentrar, quase todos os dias; Pensamentos recorrentes sobre morte, pensamentos suicidas sem um plano, tentativa de suicídio ou plano para cometer suicídio. Para que se considere que a pessoa esteja em depressão, os sintomas precisam causar impacto significativo no convívio social, no trabalho ou em outras áreas importantes (DSM – 5).

A relação entre obesidade e depressão tem sido cada vez mais examinada entre a população geral nas sociedades ocidentais. Uma revisão de meta-análise de estudos transversais de base comunitária, identificou uma associação positivamente significativa entre obesidade e depressão na população adulta geral (Wit, Luppino, Straten et al., 2010). Esta associação tem sido mais pronunciada entre mulheres do que homens. Conclusões de outra meta-análise de quinze estudos transversais indicam que a depressão está positivamente associada à obesidade abdominal na população em geral (Xu, Anderson e Beck, 2011). Neste sentido, dados publicados pelo Departamento de Saúde e Serviços Humanos, dos Estados Unidos, indicam que 43% dos adultos americanos com depressão eram obesos, enquanto 33% dos adultos sem depressão eram obesos (Figura 1). Entre os homens, as taxas de obesidade não diferiram estatisticamente pelo estado de depressão. Por outro lado, as mulheres com depressão são mais propensas a serem obesas do que mulheres que não apresentam depressão. Entre as pessoas com depressão, foi observado que as mulheres são mais propensas a serem obesas do que os homens.

Figura 1 - Adultos com depressão são mais propensos a serem obesos do que adultos sem depressão. <sup>1</sup>Significativamente diferente em relação ao grupo sem depressão. <sup>2</sup>Significativamente diferente em relação ao grupo das mulheres.



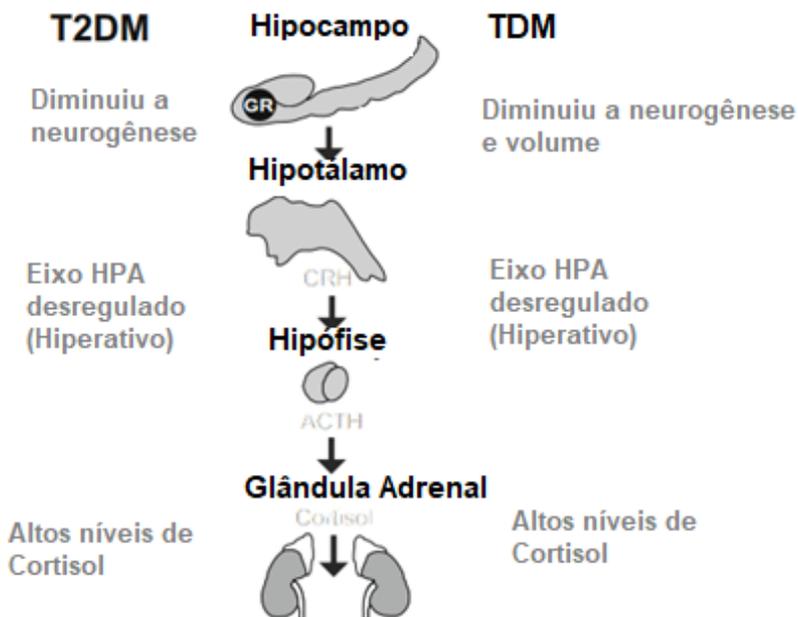
Fonte: Adaptado de National Health and Nutrition Examination Survey, 2005–2010, Estados Unidos.

A busca por uma melhor compreensão da associação entre depressão e obesidade é fundamental para o estabelecimento de estratégias apropriadas de prevenção e intervenção. Neste sentido, diversos estudos vem mostrando uma relação bidirecional entre a diabetes tipo 2 e a depressão. Um dos fatores dessa possível relação seria pelo uso de antidepressivos. O efeito de uma medicação no peso e controle glicêmico pode ser ditado pelas propriedades específicas de um determinado antidepressivo. Por exemplo, evidências demonstraram que a fluoxetina melhora o controle glicêmico e que a nortriptilina tem um efeito hiperglicêmico direto, independente de seus efeitos sobre o humor, peso ou adesão ao tratamento (McIntyre et al., 2006). A ligação entre o uso de antidepressivos e o início da DM2 pode estar relacionado à dose. Portanto, doses mais altas e uma maior duração do tratamento estão associadas a um maior risco de DM2 (Andersohn et al., 2009). Por outro lado, a obesidade e síndrome metabólica são outros fatores relacionados, justamente pelo ganho de peso presente em ambas às patologias, entre outras alterações como, adipocidade abdominal, elevadas concentrações de triglicerídeos, baixa concentração lipoproteína de alta densidade (HDL) e alta concentração de lipoproteína de baixa densidade (LDL), além de hipertensão e glicemia de jejum elevada (Skilton et al., 2007).

Com o intuito de identificar mecanismos biológicos envolvidos, parte das pesquisas tem sido feita a partir de modelos de depressão em roedores (Patterson et al., 2013). Um desses modelos usa o paradigma de

derrota social crônica, onde um animal agressivo e dominante é alojado com um animal subordinado, com o objetivo de induzir estresse nesse último animal (Becker et al., 2008). Em um estudo, a exposição a um paradigma de derrota social em camundongos resultou em alterações endócrinas, incluindo aumento na concentração plasmática de grelina (a grelina é um hormônio, liberado por células endócrinas do estômago, que resulta em aumento do apetite e dos depósitos de gordura) e hiperinsulinemia (Patterson et al., 2013). Estes resultados sugerem que a depressão leva a alterações no metabolismo da insulina e ganho de peso, ambos os fatores de risco conhecidos para o DM2. Além disso, ambas as doenças foram implicadas em alterações do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (eixo HPA), que regula a produção e liberação de cortisol. Estudos mostraram que a depressão e DM2 estão relacionadas à desregulação do eixo HPA, com excesso de ativação e aumento dos níveis plasmáticos de cortisol (Semenkovich et al., 2015). Ainda, Weber e equipe mostraram que indivíduos com depressão e hipercortisolemia apresentam uma diminuição a sensibilidade à insulina (2000). Também foi demonstrada uma associação entre depressão e hipercortisolemia e marcadores de síndrome metabólica (Vogelzangs et al., 2007). Além das mudanças no sistema endócrino, ocorrem também alterações neurológicas, incluindo alterações do hipocampo, estrutura pertencente ao sistema límbico e responsável pela formação de memórias e processamento de emoções. Ainda, existe conexão anatômica entre o hipocampo e eixo HPA, sendo que hipocampo é capaz de regular a retroalimentação negativa do eixo HPA (Pariante et al., 2008; Jacobson et al., 2008) (Figura 2).

Figura 2 - Os efeitos do diabetes mellitus tipo 2 (T2DM) e desordem depressiva (TDM) no cérebro e no sistema neuroendócrino. Disfunções no eixo HPA, como hiperatividade, são responsáveis pela liberação de altos níveis de cortisol. ACTH: hormônio adrenocorticotrópico, CRH: hormônio liberador de corticotropina, GR: receptor glicocorticóide, HPA: hipotálamo-hipófise-adrenal.



Fonte: Adaptado de Semenkovich et al., 2015.

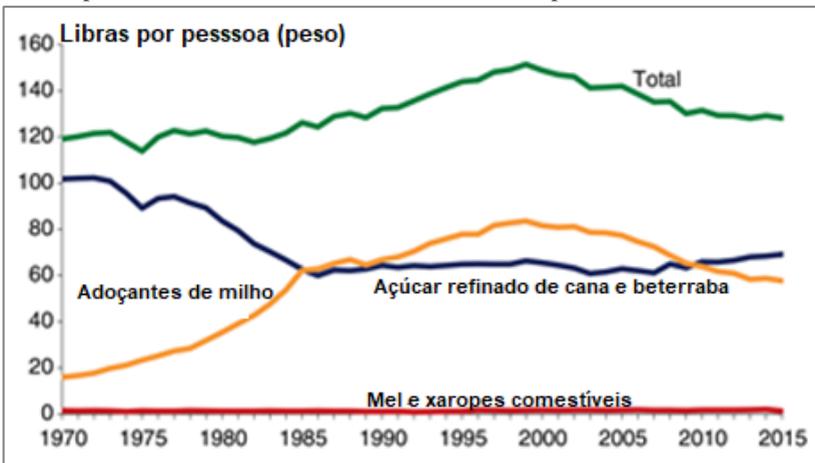
## 1.2 CONSUMO DE FRUTOSE

Nas últimas décadas o padrão do consumo alimentar da população mundial mudou drasticamente. Por meio da industrialização, ocorreram diversas mudanças nos processos de produção, que resultaram em uma maior disponibilidade de alimentos altamente calóricos e industrializados. Os alimentos industrializados, agora, estão se tornando parte do sistema alimentar global, cada vez mais dominado por produtos processados e prontos para consumo (Monteiro, 2013). Segundo Monteiro e colaboradores, a compra de produtos ultraprocessados, expressos em porcentagem de total de calorias, aumentou continuamente no Brasil, passando de 18,7% em 1987 para 26,1% em 2003.

A adição de frutose na alimentação tornou-se popular na década de 1970, quando esta começou a ser utilizada à produção de xarope de milho

rico em frutose (HFCS, do inglês *high fructose corn syrup*) (Elliott et al., 2002). Na figura 3, é possível observar o aumento do consumo de frutose entre os anos de 1970 e 2015 nos Estados Unidos. A frutose está presente naturalmente em frutas, mel e alguns vegetais, mas a maior fonte é a partir de açúcares adicionados, como açúcar de mesa (sacarose) e xarope de milho rico em frutose (Madero et al, 2011). O HFCS é amplamente utilizado em refrigerantes, pães, bebidas de fruta, fruta enlatada, geleias, compotas e laticínios (Bantle, 2009). Este xarope contém até 90% de frutose, contudo, a maior parte dos xaropes comercialmente vendidos contém 55% frutose e 45% glicose (Bidwell, 2017). Nos Estados Unidos, os adolescentes são os maiores consumidores de frutose, com valores em torno de 72,8 gramas por dia, sendo que um quarto dos adolescentes consome até 15% de sua ingesta calórica diária a partir da frutose (Vos et al., 2008).

Figura 3 - Consumo do xarope de milho nos Estados Unidos, entre os anos de 1970 e 2015, demonstrado em libras por pessoa. Os adoçantes de derivados do milho, apresentaram um crescimento acentuado nesse período.



Fonte: USDA, Serviço de Pesquisa em Economia, dados de disponibilidade de alimentos.

O elevado consumo de bebidas açucaradas ricas em frutose está diretamente relacionado ao desenvolvimento de obesidade e suas consequências, e.g., síndrome metabólica (Dhingra et al., 2007; Tappy e Lê, 2010; Bray e Popkin, 2014). Neste sentido, a OMS recomenda que o consumo de açúcar de adição na dieta não ultrapasse 10% do consumo de calorias total da dieta. Porém, ainda aconselha que esse consumo seja

menor que 5% do total de calorias (WHO, 2015). De acordo com essa recomendação, em média, um indivíduo pode consumir até 50g de açúcar, por dia, ou 18,25 kg por ano. No Brasil, o consumo médio de sacarose<sup>1</sup> por dia, segundo a última Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2008-2009), é de 109 g/dia, o que equivale em média a 14% da ingestão calórica diária, muito além do máximo recomendado. Segundo dados da ABIA (Associação Brasileira das Indústrias da alimentação), os brasileiros consomem, individualmente, cerca de 30 kg de açúcar por ano, sendo 56,3 % desse valor proveniente do açúcar de mesa (sacarose) e 19,2 % do açúcar adicionado nos alimentos processados. Também no Brasil, o refrigerante é a bebida mais produzida, sendo que o açúcar está presente em grande quantidade, com o objetivo de conferir sabor doce e certa consistência. O país aparece no 12º lugar no ranking mundial de consumo, com 85 litros/por habitante/ano (Júnior, 2014).

Este desbalanço de energia vem resultando em uma crescente epidemia de síndrome metabólica (Rutledge e Adeli, 2007). Esta epidemia não é restrita a adultos, uma vez que cerca de 30% dos adolescentes americanos apresenta sobrepeso (Hruby e Hu, 2015) e as taxas de DM2 estão crescendo na população mais jovem (Nadeau e Dabelea, 2008). Na última década, a prevalência de doenças crônicas avançou no Brasil, com um aumento de 61,8% dos casos de diabetes e de 14,2 % dos casos de hipertensão. O número de brasileiros acima do peso cresceu 26,3% em 10 anos, sendo que mais da metade da população está acima do peso recomendado, passando de 42,6% em 2006 para 53,8% em 2016. Os indicadores aumentam com a idade e é maior entre os com menor escolaridade. Em relação a obesidade, a mesma cresceu 60% em 10 anos, de 11,8% em 2006 para 18,9% em 2016. A prevalência de obesidade duplica a partir dos 25 anos e também é maior entre os que tem menor escolaridade (Vigitel, 2017).

### 1.3 ALTERAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS PELO CONSUMO CRÔNICO DE FRUTOSE

Existe um crescente interesse no potencial papel destes açúcares adicionados como fatores contribuintes à síndrome metabólica (Yerlikaya et al., 2017). Quando consumida em concentrações elevadas, a frutose pode promover mudanças metabólicas que podem contribuir como fatores de risco associados à síndrome metabólica, como hiperuricemia,

---

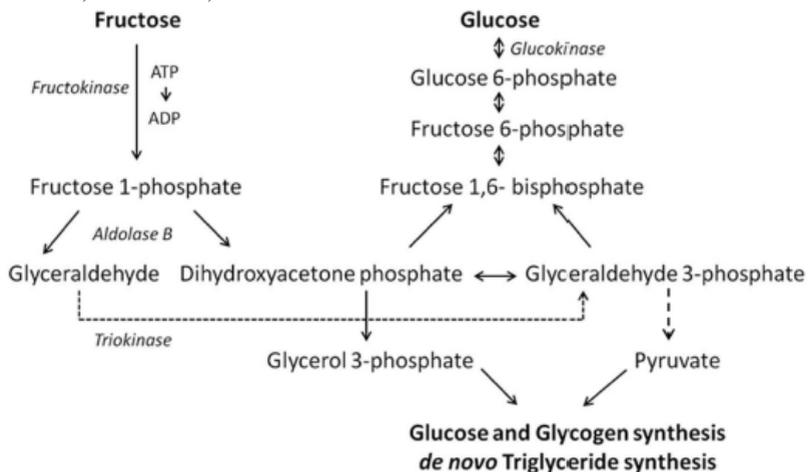
<sup>1</sup> A sacarose, também conhecida como açúcar de mesa, é um tipo de glicídio, formado por uma molécula de glicose e uma de frutose.

inflamação e alterações nas concentrações de diversos hormônios (Elliott et al., 2002; Dekker et al., 2010; Basu et al., 2013; Toop e Gentili, 2016). Ademais, uma vez que a frutose é menos propensa a promover saciedade e é mais palatável, irá estimular um maior consumo de alimentos, e alterar o metabolismo de lipídeos e carboidratos, desta forma favorecendo a síntese e acúmulo de gorduras (Lê et al., 2006; Lowette et al., 2015). Um recente estudo de meta-análise observou que o consumo de bebidas ricas em frutose induz ganho de massa corporal, aumento da pressão arterial sistólica, hiperglicemia, hiperinsulinemia e aumento das concentrações séricas de triglicérides em roedores (Toop e Gentili, 2016). Por outro lado, foi demonstrado que a substituição da frutose por glicose nas bebidas, por quatro semanas, resultou em uma melhora na sensibilidade à insulina no tecido adiposo em indivíduos jovens diagnosticados com doença hepática gordurosa não alcoólica (Jin et al., 2014).

Quando a frutose é ingerida como dissacarídeo na forma de sacarose, esta sacarose deverá ser primeiramente clivada, pela enzima sacarase, presente na membrana da borda em escova dos enterócitos, em uma molécula de glicose e outra de frutose, antes de ser metabolizada (Corpe et al., 1999). A frutose é absorvida pela membrana apical dos enterócitos por meio de um transportador específico, independente de sódio e de hidrólise de ATP, o transportador de glicose 5 (GLUT-5) – sendo posteriormente transportada pela membrana basolateral dos enterócitos à corrente sanguínea portal por meio do transportador de glicose 2 (GLUT-2) (Corpe et al., 1999; Douard e Ferraris, 2008). Posteriormente, a frutose é facilmente absorvida pelo fígado por meio dos transportadores GLUT-2 (Cheeseman, 1993). Devido à alta concentração de transportadores GLUT-2 e da enzima hepática frutocinase, existe uma alta afinidade pela captação de frutose no fígado (Adelman et al., 1967). Uma vez no fígado, a frutose é rapidamente convertida em frutose-1-fosfato por meio da frutocinase (Mayes, 1993).

Portanto, quase toda frutose é metabolizada no fígado via frutose 1-fosfato envolvendo as enzimas frutocinase, aldolase e tricinase (Figura 4). O intermediário desta via, di-hidroxiacetona-fosfato e glicérideo aldeído-3-fosfato, pode reagir para se tornar glicose-6 fosfato, que por sua vez pode ser metabolizado em glicose para alimentar processos celulares ou em glicogênio, para ser armazenado no fígado. Quando o glicogênio hepático é reabastecido, os intermediários de frutose são direcionados para a síntese de triglicérides *de novo* por meio da conversão de di-hidroxiacetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato em glicerol 3-fosfato e piruvato, respectivamente (Tappy et al., 2010).

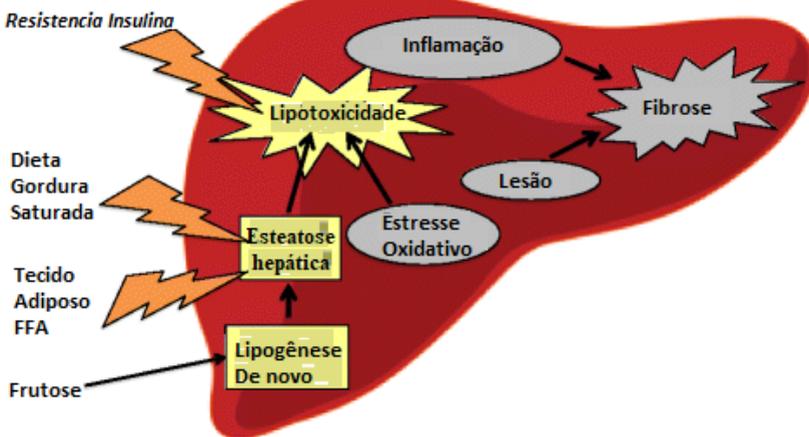
Figura 4 - Vias intracelulares de metabolização hepática da frutose e da glicose. A frutose é metabolizada no fígado através de processos que envolvem as enzimas, fructocinase, aldolase e triocinase.



Fonte: Retirado de Tappy et al., 2010.

O aspecto mais prejudicial da frutose é sua capacidade em ser convertida em ácidos graxos nos hepatócitos *via* lipogênese de novo (LDN), como ilustrado na figura 5 (Tappy e Lê, 2010). Em roedores, foi demonstrada que uma dieta rica em frutose (60%) é capaz de, em três semanas, aumentar os níveis intra-hepatocelulares de lipídeos, assim como estimular a lipogênese de novo hepática (Carmona e Freedland, 1989).

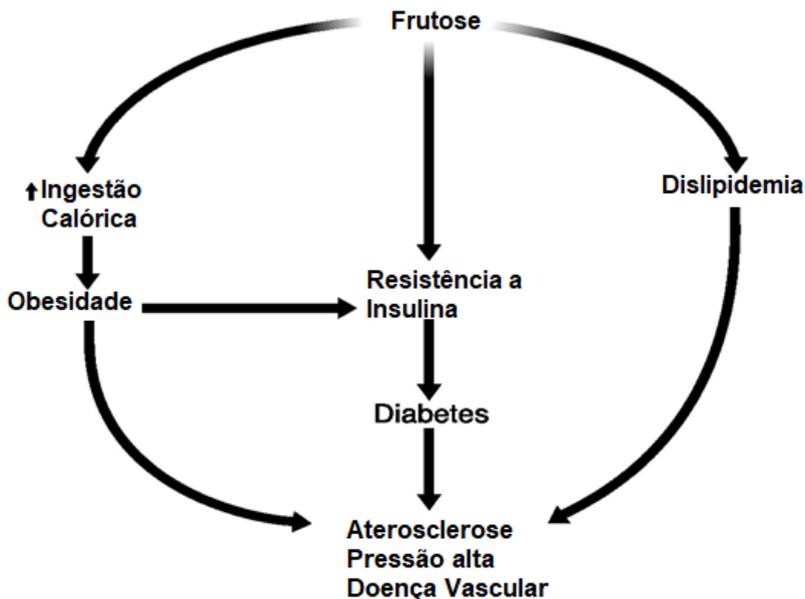
Figura 5 - O consumo excessivo de frutose pode aumentar a lipogênese de novo, proporcionando também o acúmulo de gordura no fígado (esteatose hepática). A resistência à insulina e estresse oxidativo alimentam um ambiente lipotóxico no fígado, que pode resultar em inflamação hepática e lesão levando à fibrose.



Fonte: Retirado de Paglialunga e Dehn, 2016.

Em humanos saudáveis, a suplementação com frutose, em uma concentração moderada (1,5 gramas/kg/dia), aumentou de modo significativo a concentração plasmática de triglicerídeos e glicose, embora não induziu acúmulo de lipídeos intramiocelulares ou resistência à insulina (Lê et al., 2006). Até o momento, existe uma abundante literatura indicando que a ingestão aguda ou crônica de frutose causa hiperlipidemia em ratos e humanos. Faeh e colaboradores demonstraram que, após seis dias de exposição a uma carga de frutose, as concentrações plasmáticas de triglicerídeos dos indivíduos foram aumentadas em cerca de 80% dos valores basais, possivelmente devido a um aumento de até seis vezes na lipogênese de novo (Faeh et al., 2005). De fato, o consumo elevado de frutose parece contribuir com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, dislipidemia, obesidade, doença hepática não alcoólica, síndrome metabólica, diabetes e pressão alta (Figura 6) (Tappy e Lê, 2010).

Figura 6 - Potenciais relações entre a alta ingestão de frutose com doenças humanas. O consumo exagerado de frutose, está relacionado com um aumento da ingestão calórica, obesidade, resistência a insulina, dislipidemia, diabetes, aterosclerose, pressão alta e doença vascular.



Fonte: Adaptado de Luc Tappy, e Kim-Anne Lê, 2010.

Um estudo analisou os efeitos de uma suplementação por 10 semanas com glicose ou frutose (em quantidades correspondentes a 30% das necessidades energéticas totais) em um grupo de mulheres com sobrepeso e obesas (Stanhope et al., 2009). Nesse contexto, o grupo de indivíduos com a alimentação de glicose ou frutose obtiveram ganhos de peso corporal semelhantes, porém a frutose levou a maior taxa pós-prandial de concentrações de triglicédeos do que a glicose. Além disso, a frutose, mas não glicose, diminuiu a tolerância à glicose e aumentou a concentração plasmática de LDL de pequena densidade e de LDL oxidada, que são partículas lipídicas associadas com alto risco arterogênico (Stanhope et al., 2009).

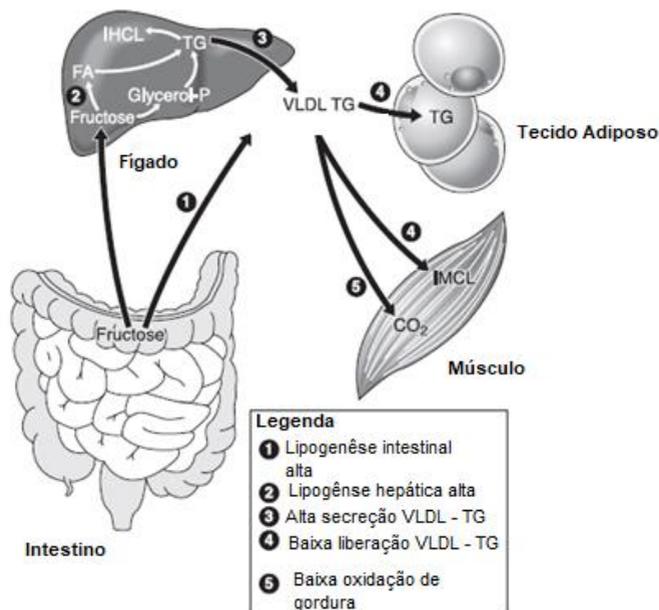
Já foi demonstrado que o consumo de frutose, por meio de dieta, causa um menor estímulo à secreção de insulina em comparação com o consumo de glicose ou de carboidratos que contenham glicose (Teef et al., 2009). A insulina, por sua vez, estimula a liberação de leptina dos adipócitos (Saad et al., 1998), sendo que foi demonstrado, em mulheres

saudáveis, que as concentrações de insulina e leptina circulantes são menores após a ingestão de refeições contendo frutose do que após a ingestão de refeições contendo glicose (Teef et al., 2004).

Vários estudos têm apontado para o efeito deletério da frutose no metabolismo da glicose e sensibilidade à insulina. A resistência à insulina é intimamente parecida com distúrbios do metabolismo lipídico; mais especificamente, os indivíduos resistentes à insulina têm maior deposição lipídica ectópica, o que pode gerar metabólitos derivados de lipídios tóxicos, como diacilglicerol, acil-graxo-CoA e ceramidas. A presença destes metabólitos no ambiente intracelular leva a uma maior fosforilação de serina/treonina nos substratos de receptor 1 (IRS-1) da insulina, que foi demonstrado reduzir a sinalização de insulina (Shulman, 2000). A diminuição da ativação do receptor de insulina reduz a sinalização necessária à absorção de glicose e, portanto, resulta em hiperglicemia de jejum e diabetes mellitus (Boucher et al., 2014).

Os mecanismos subjacentes à dislipidemia induzida pela frutose já foram parcialmente elucidadas na literatura, como demonstrado na figura 7. A cinética dos triglicerídeos plasmáticos foi medida em roedores alimentados com dietas com alto teor de sacarose, glicose ou frutose, e observou-se que, em comparação com a glicose, ambas a frutose e sacarose, aumentaram a produção de triglicerídeos e diminuíram depuração de triglicerídeos (Kazumi et al., 1986). De fato, com a frutose fornecendo grandes quantidades de triose-fosfato hepático como precursores para a síntese de ácidos graxos, o processo se torna altamente lipogênico. Como exposto anteriormente, fora observado em vários estudos que a síntese *de novo* hepática é estimulada após ingestão aguda de frutose. A frutose pode, além disso, aumentar a expressão das principais enzimas lipogênicas no fígado, e.g., do fator de transcrição SREBP-1c, o principal indutor da lipogênese hepática (Matsuzaka et al., 2004 e Shimomura et al., 1999).

Figura 7 - Possíveis mecanismos envolvidos na dislipidemia induzida pela frutose. 1. Aumento na lipogênese intestinal, 2. Aumento na lipogênese hepática, 3. Alta secreção de VLDL – TG, 4. Baixa liberação VLDL – TG, 5. Baixa oxidação de gordura.



Fonte: Retirado de Luc Tappy e Kim-Anne Lê, 2010.

A frutose também pode diminuir a sensibilidade à insulina através de alterações na flora microbiana do intestino ou alterações da permeabilidade intestinal. A resistência à insulina em pacientes obesos está associada a marcadores de inflamação, como proteína C-reativa ou citocinas pró-inflamatórias e com inflamação do tecido adiposo (Grimble, 2002). Recentemente, observou-se que uma dieta hiperlipídica pode levar a uma maior permeabilidade intestinal e alterações da flora bacteriana intestinal, resultando em um aumento da concentração plasmática de lipopolissacarídeos bacterianos, ou endotoxina. A endotoxemia, por sua vez, ativa vias inflamatórias e prejudica ação da insulina, levando ao desenvolvimento de resistência à mesma (Cani et al., 2008).

#### 1.4 EFEITOS DA FRUTOSE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Mais recentemente, tem se observado um crescente interesse nos potenciais efeitos secundários da frutose sobre o sistema nervoso central

(SNC) (Lakhan e Kirchgessner, 2013), com evidências de que os distúrbios metabólicos, tal qual diminuição das respostas à insulina nos tecidos periféricos, podem afetar a sinalização insulínica no cérebro e contribuir para prejuízo cognitivo e alterações na plasticidade sináptica (Costello et al., 2012).

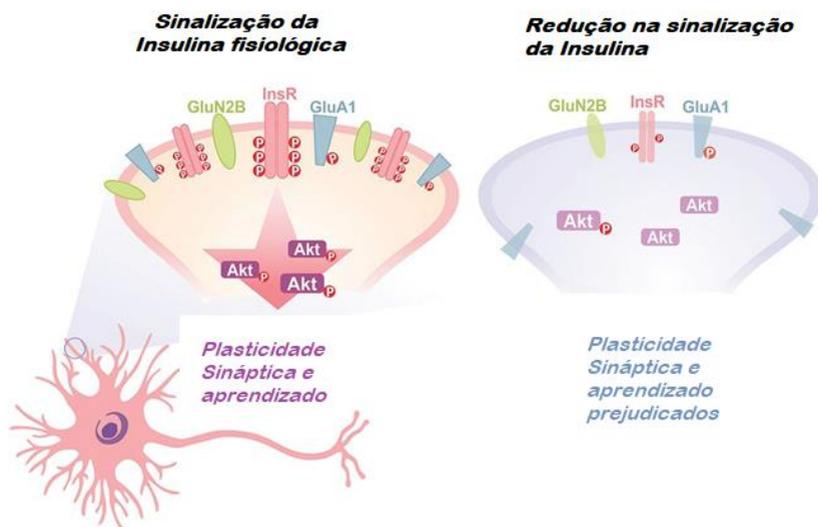
A insulina, produzida pelas células beta pancreáticas, regula a utilização de glicose na periferia e no metabolismo de lipídeos e proteínas. A ação da insulina é mediada pelo receptor de insulina (IR). O IR é uma proteína de membrana da família de receptores de tirosina cinase compreendida de duas subunidades alfa e beta que também é largamente expressa no cérebro (Schulingkamp et al., 2000; Zhao e Alkon, 2001). Os IRs no cérebro estão localizados principalmente no hipocampo (uma das áreas mais relevantes envolvidas na memória e na aprendizagem), mas também no bulbo, córtex cerebral, hipotálamo, cerebelo e plexo coróide (Zhao et al., 1999; Palleria, 2016). A insulina pode atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) por um mecanismo de transporte via receptor, sendo que um número crescente de funções não metabólicas para a insulina no SNC estão sendo descobertas (Banks et al., 2012). Neste sentido, a resistência a insulina é caracterizada pela redução da capacidade de resposta dos tecidos-alvo à sinalização de insulina. Essa resistência diminui a permeabilidade da insulina através da BHE, e consequente redução da sinalização da insulina no cérebro (de la Monte et al., 2009).

A atividade de insulina no SNC é mediada pela via do fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K)/AKT e Ras/Proteína Quinase ativada por Mitogênio (MAPK). Ativada a PI3K, há uma ativação da AKT, que fosforila vários substratos biológicos, incluindo glicogênio sintase cinase 3beta (GSK-3beta) (Tokutake et al., 2012). A ativação da via PI3K/AKT regula várias proteínas envolvidas no metabolismo da insulina através da ativação da mTOR. A via de sinalização através de mTOR está envolvida na proliferação celular, memória e aprendizagem (Russo et al., 2012). A via MAPK está envolvida no crescimento celular e sináptico, assim como, na reparação e manutenção celular (Lizcano e Alessi, 2002).

O papel da sinalização neuronal da insulina na plasticidade sináptica e em processos de aprendizagem e memória está esquematizado na figura 8. Simplificadamente a imagem ilustra alguns dos mecanismos pelos quais a sinalização de insulina prejudicada afeta a plasticidade e a função da sinapse (De Felice; Benedict, 2015). Em condições fisiológicas, os receptores de insulina (IRs) estão presentes nas sinapses e a fosforilação dos IRs e Akt reflete na sinalização adequada da insulina, que está ligada fosforilação de GluA1 e presença de GluN2B nas sinapses,

favorecendo a função das sinapses e a formação da memória. Em condições patológicas como por exemplo, diabetes mellitus, ocorre uma diminuição dos níveis de IRs e de fosforilação dos IRs e Akt, ocorrendo uma redução da sinalização da insulina, que em última instância leva a plasticidade e função de sinapses prejudicadas (Grillo et al., 2015).

Figura 8 - O papel chave dos receptores de insulina na memória. A sinalização fisiológica da insulina, atua em processos de plasticidade sináptica e aprendizado, quando essa sinalização tem interferências esses processos são prejudicados.



Fonte: Retirado de De Felice & Benedict, 2015.

Diversos estudos sugerem que o consumo de frutose, em concentrações entre 35 até 60% da energia vindo a partir deste carboidrato simples, induzem prejuízos no aprendizado e memória de roedores (Ross et al., 2009; Hsu et al., 2014), sendo que os principais mecanismos subjacentes reportados estão relacionados a (i) alterações na sinalização insulínica hipocampal, nos níveis do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (Ross et al., 2012), (ii) redução da neurogênese hipocampal (van der Borgh et al., 2011) e (iii) aumento nos marcadores neuroinflamatórios (Hsu et al., 2014). Estes achados são de particular importância uma vez que o hipocampo é necessário para diversas formas de aprendizagem e memória e diversas linhas de evidência indicam que a sinalização da insulina neuronal facilita as memórias dependentes do hipocampo (Park, 2001). De fato, diversos estudos sugerem que a resistência à insulina

periférica e o DM2 são associados com déficits na memória declarativa dependente do hipocampo (Convit, 2005; Messier, 2005). Não obstante, o aprendizado de uma tarefa espacial no labirinto aquático é correlacionado com a ativação da via de sinalização da insulina no hipocampo de roedores (Zhao et al., 1999; Dou et al., 2005). Ademais, a infusão de insulina diretamente no hipocampo potencializa o desempenho em uma variedade de testes cognitivos, sendo que estes efeitos não são observados em modelos animais de diabetes. (Moosavi et al., 2006, 2007). Além destes efeitos sobre o aprendizado e a memória, a frutose também parece afetar os processos de neurogênese, como demonstrado no hipocampo e no núcleo do trato solitário (van der Borght et al., 2011; Rafati et al., 2013). Van der Borght e colaboradores (2011) demonstraram que quatro semanas de consumo de solução de frutose (23%) reduziu significativamente a neurogênese hipocampal, enquanto que o consumo de glicose não apresentou nenhum efeito.

Ainda, vários fatores ambientais são propostos com fatores associados ao risco de desenvolvimento de depressão e ansiedade. A dieta, por exemplo, tem sido sugerida como um fator de risco contribuinte para essas condições. No geral, dietas saudáveis, que são relacionadas ao consumo de alimentos menos processados, têm sido associadas com efeitos protetores, enquanto a adesão ao padrão alimentar ocidental é proposto para aumentar o risco de desenvolver esses distúrbios psicológicos (Weng; Jacka, 2010). Reddy e colaboradores demonstram que uma dieta rica em frutose (65%), pelo período de oito semanas, aumentou o nível de ansiedade dos animais em relação aos controles no teste do campo aberto, resultados similares foram encontrados no teste da caixa claro/escuro, com um comportamento tipo hiperansioso dos roedores. Por conseguinte, a coadministração de Resveratrol ou Metformina, nos grupos com dieta rica em frutose, diminuíram os sintomas de ansiedade dos animais avaliados (2016).

## 1.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE DIETAS RICAS EM FRUTOSE E ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS

Diversos grupos de pesquisa vêm avaliando os impactos de dietas ricas em frutose sobre o comportamento dos animais, sendo avaliadas a função cognitiva e alterações emocionais. As pesquisas no geral relacionam essas alterações com doenças metabólicas como DM2 e síndrome metabólica. A tabela 1 resume algumas das principais evidências científicas relacionadas ao consumo de frutose e a prejuízos cognitivos e alterações emocionais obtidas em estudos pré-clínicos.

Tabela 1 - Evidências experimentais relacionando dietas ricas em frutose com alterações comportamentais em estudos pré-clínicos.

<b>Animais - Linhagem</b>	<b>Teste</b>	<b>Alterações</b>	<b>Duração da dieta</b>	<b>Concentração de Frutose %</b>	<b>Ano</b>	<b>Autores</b>
C57BL / 6 Machos	Labirinto aquático de Morris	Prejuízo de memória espacial	8 semanas	15%	2015	Cisternas et al.
Sprague-Dawley(Ratos) Machos	Labirinto aquático de Morris	Prejuízo de memória espacial	8 meses	10%	2014	Hui-Wen et at.
Sprague-Dawley(Ratos) Machos	Labirinto aquático de Morris	Prejuízo memória espacial e trabalho	9 semanas	55%	2017	Woodie et al.
Sprague-Dawley(Ratos) Machos	Labirinto aquático de Morris	Prejuízo de memória espacial	19 semanas	60 %	2009	Ross et al.
Sprague-Dawley(Ratos) Machos	Campo Aberto	Aumento do comportamento ansiogênico	8 semanas	65 %	2016	Reddy et at.
Wistar Machos	Labirinto em Cruz elevado	Aumento do comportamento ansiogênico	10 semanas	55%	2015	Harrell et al

Fonte: Elaborado pela autora.

Com base na Tabela 1 é possível notar que os protocolos experimentais empregam a exposição à frutose por um período médio de 8-10 semanas, contudo, as faixas de concentração da mesma variam bastante, entre 10 e 65%, sendo a maioria dos estudos realizados em ratos. Outro importante viés é que poucas pesquisas acabam utilizando animais fêmeas. É importante ressaltar que as mulheres são mais afetadas por depressão e obesidade concomitantemente, como já foi citado anteriormente. De fato, um aspecto marcante da maioria dos transtornos de ansiedade e depressão é a maior incidência em mulheres do que em homens. Além disso, as diferenças de gênero no metabolismo de fármacos psicotrópicos e depuração dos mesmos podem ter efeitos diretos sobre a eficácia dos tratamentos farmacológicos nos transtornos mentais em mulheres. Fatores biológicos, hormonais e culturais podem contribuir para diferenças de gênero em alguns transtornos e à eficácia específica das intervenções farmacológicas. A pesquisa básica em animais pode ajudar a determinar o grau em que esses recursos são causados por diferenças na fisiologia cerebral (Palanza, 2001). Dada a preponderância das diferenças sexuais em muitos aspectos dos transtornos de ansiedade e depressão, é surpreendente descobrir quão poucos estudos em animais consideraram o gênero como uma fator para depressão e transtornos de ansiedade. Aproximadamente 90% dos estudos em animais utilizando drogas serotoninérgicas e comportamentos semelhantes à ansiedade, utilizaram machos exclusivamente em suas análises. Claramente, essa deficiência atrasou o progresso para uma compreensão dos processos que contribuem para transtornos de ansiedade e depressão e muito provavelmente, impediu o desenvolvimento de tratamentos (Fuchs and Flügge, 2006). Assim, com base nas evidências supracitadas, a presente proposta objetiva avaliar as alterações metabólicas e comportamentais, i.e., cognitivas e emocionais, induzidas pelo consumo crônico de frutose em camundongos *Swiss*. Afim de analisar diferentes variáveis possivelmente envolvidas nesse contexto, são utilizados camundongos machos e fêmeas, assim como, duas concentrações diferentes de frutose na dieta dos animais (i.e., 15% e 30%). Essa padronização é relevante pois compara alterações comportamentais e metabólicas dos diferentes gêneros e diferentes concentrações de frutose, com o objetivo de identificar as alterações específicas e características de cada administração.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar, em camundongos *Swiss* machos e fêmeas, as alterações metabólicas e comportamentais induzidas pela administração crônica de diferentes concentrações de frutose (i.e., 15% e 30%).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. *Avaliação de parâmetros metabólicos:*
  - a. Acompanhar o ganho de peso, do perfil de ingestão hídrica e quantificação de ingestão calórica ao longo dos tratamentos;
  - b. Avaliar a ação da insulina, por meio do teste de tolerância a glicose;
  - c. Mensurar a concentração plasmática de triglicérides e colesterol;
  - d. Avaliar a reatividade vascular em camundongos tratados com frutose.
2. *Avaliação de parâmetros comportamentais:*
  - a. Memória de curto prazo no teste labirinto em T;
  - b. Exploração espontânea no teste do campo aberto;
  - c. Memória espacial de curto prazo no teste do reconhecimento de objetos;
  - d. Comportamento exploratório e “emocional” no teste do labirinto em cruz elevado;
  - e. Comportamento tipo depressivo no teste de suspensão pela cauda;
  - f. Avaliação de autocuidado e comportamento motivacional no teste de borrifagem de sacarose;
  - g. Avaliação do possível efeito antidepressivo da fluoxetina, nos testes de comportamento tipo depressivo.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

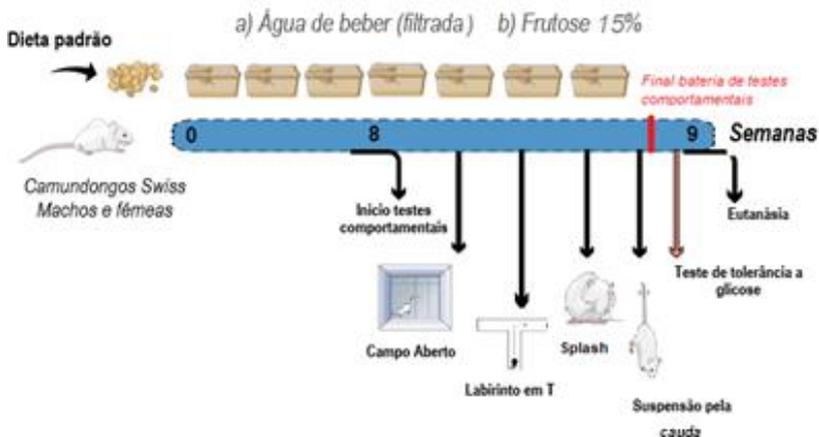
*Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Neurociências e Comportamento, localizado no Departamento de Ciências Fisiológicas CCB/UFSC. Projeto aprovado pelo CEUA, Protocolo: 3026310817.*

Foram utilizados camundongos adultos machos e fêmeas (3-4 meses ao início dos experimentos) da linhagem *Swiss* pesando entre 30 e 40g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (42 x 34 x 17 cm), com condição controlada de temperatura ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, fase clara das 06:00 às 18:00 h), e com livre acesso a água e comida. Foram mantidos no máximo 10 (dez) animais por gaiola-moradia, de acordo com as recomendações do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica do CONCEA (Resolução Normativa 13, 2013).

#### 3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

*Desenho experimental I:* Camundongos adultos machos e fêmeas da linhagem *Swiss*, entre três e quatro meses de idade ao início dos experimentos, foram divididos em quatro grupos experimentais. Os animais receberam, por 8 semanas, água potável (filtrada) ou água potável contendo frutose (na concentração de 15% peso/volume) (Synth, Diadema, SP, Brasil) *ad libitum*. Os animais foram mantidos em suas gaiolas-moradia. Durante todo esse período foi mensurado, semanalmente, o peso dos animais e a ingestão líquida e calórica. Ao final do período de oito semanas, ainda sobre influência dos tratamentos acima mencionados, os animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais, composta pelos testes do campo aberto e reconhecimento de objetos (dias 1 e 2), teste do Labirinto em T (dia 3), testes da borrifagem de sacarose e suspensão pela cauda (dias 4 e 5) e o teste do labirinto em cruz elevado (dia 6). Um dia após o último teste comportamental, foi realizado o teste de tolerância a glicose, para avaliação da ação da insulina. E no dia seguinte, os animais, em jejum calórico de seis horas, foram anestesiados com uma mistura de cetamina (80 mg/kg; i.p.) e xilazina (10 mg/kg; i.p.) e o sangue foi coletado por punção cardíaca para a determinação da concentração plasmática de triacilgliceróis e colesterol.

Figura 9 - Desenho experimental I. Linha do tempo do cronograma de tratamento com a concentração de 15% frutose. Os animais receberam a frutose na água de beber pelo período de 8 semanas. Finalizado o período de tratamento, foram realizados os testes comportamentais, na semana 9 o teste de tolerância a glicose e demais coletas plasmáticas foram feitas, finalizando com a eutanásia.

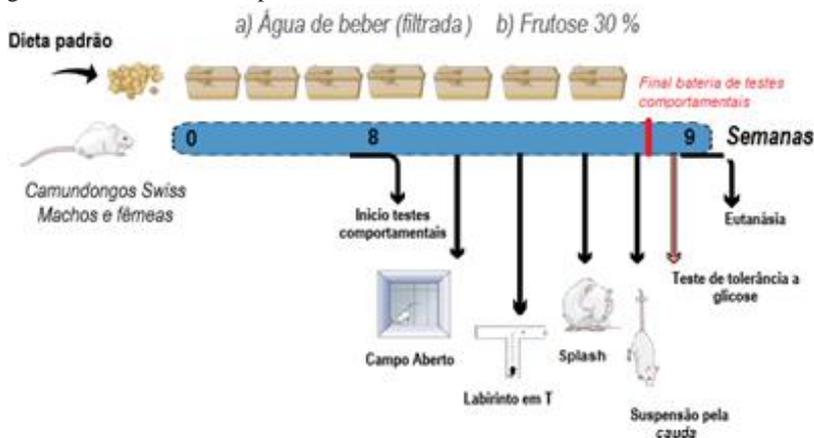


Fonte: Elaborado pela autora.

Desenho experimental II: Camundongos adultos machos e fêmeas da linhagem *Swiss*, entre três e quatro meses de idade ao início dos experimentos, foram divididos em 4 grupos experimentais. Os animais receberam, por oito semanas, água potável (filtrada) ou água potável contendo frutose (na concentração de 30% peso/volume) (Synth, Diadema, SP, Brasil) *ad libitum*. Os animais foram mantidos em suas gaiolas-moradia. Durante todo esse período foi mensurado, semanalmente, o peso dos animais e a ingestão líquida e calórica. Ao final do período de oito semanas, ainda sobre influência dos tratamentos acima mencionados, os animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais, composta pelos testes do campo aberto e reconhecimento de objetos (dias 1 e 2), teste do Labirinto em T (dia 3), testes da borrifagem de sacarose e suspensão pela cauda (dias 4 e 5) e o teste do labirinto em cruz elevado (dia 6). Foi realizado, ainda, tratamento com fluoxetina, 10 mg/kg i.p., 60 minutos antes dos animais do grupo frutose serem avaliados nos testes de comportamento tipo depressivo (o grupo de animais tratados com fluoxetina foram posteriormente eutanasiados após o teste comportamental). Um dia após o último teste comportamental, foi realizado o teste de tolerância a glicose, para avaliação da ação da insulina. E no dia seguinte, os animais, em jejum calórico de seis horas, foram anestesiados com uma mistura de cetamina

(80 mg/kg; i.p.) e xilazina (10 mg/kg; i.p.) e o sangue foi coletado por punção cardíaca para a determinação da concentração plasmática de triacilgliceróis e colesterol. Uma parte dos animais foram destinados para análise da reatividade vascular.

Figura 10 - Desenho experimental I. Linha do tempo do cronograma de tratamento com a concentração de 30% frutose. Os animais receberam a frutose na água de beber pelo período de 8 semanas. Finalizado o período de tratamento, foram realizados os testes comportamentais, na semana 9 o teste de tolerância a glicose e demais coletas plasmáticas foram feitas, finalizando com a eutanásia.



Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os animais foram transportados à sala de experimentos climatizada para ambientação de 1 hora antes do início de todos os experimentos comportamentais, realizados durante a fase clara do ciclo (9:00 – 16:00h). Após cada experimento os aparatos foram limpos com etanol 10%.

#### 3.3.1 Teste de reconhecimento de objeto

**Protocolo Experimental:** O teste de reconhecimento de objetos, para avaliar a memória de curto prazo dos camundongos, foi realizado de acordo com Leger et al. 2013. O aparato utilizado foi um campo aberto de 50cm de largura x 50 cm de profundidade x 40 cm de altura. Um dos objetos era de plástico, com 5 cm de altura e 2,5 cm de largura, sendo uma peça de lego. Outro objeto era de madeira, com 4 cm de altura e 2 cm de largura, peça de brinquedo. O procedimento consistiu em uma sessão de

habituação ao campo aberto com duração de 5 minutos, na qual o animal foi colocado na caixa para livre exploração. Após 24 horas, os animais foram reexpostos ao campo aberto por 5 minutos, contudo nesta apresentação (treino) dois objetos idênticos foram apresentados aos animais. Neste momento, foi registrado o tempo de exploração de cada um dos objetos colocados na caixa. Depois do treino os animais retornaram à sua caixa moradia e aguardaram até o momento do teste, 180 minutos após o treino. No momento do teste, porém, um dos objetos foi trocado. Neste momento registrou-se, novamente, o tempo de exploração de cada um dos objetos. Os seguintes comportamentos foram considerados como exploração do objeto: cheirar, tocar ou observar o objeto a menos de 1 cm de distância. Este tempo de exploração dos objetos foi utilizado para o cálculo do índice de localização de objetos, o qual foi utilizado como parâmetro de memória (Leger et al., 2013).

### 3.3.2 Teste da alternância forçada

**Protocolo Experimental:** O teste de alternância forçada foi conduzido usando um labirinto em T simétrico, feito de madeira pintada de preto. Cada braço do labirinto em T tinha 30 cm de comprimento, 9 cm de largura e 12 cm de altura, e a parede no final de cada braço era marcada com um padrão preto e branco diferente. Para reduzir a ansiedade nos animais, a luz na área de teste foi reduzida para  $30 \pm 5$  lux. O protocolo para o teste de alternância forçada foi adaptado de Wolf e colegas (2016). O teste consistiu em um teste de amostragem de 5 min (T1) seguido por um ensaio de recuperação de 5 min (T2). Em T1, o animal foi colocado no final do braço inicial, de frente para a parede e longe do centro. O camundongo foi então liberado para explorar dois braços do labirinto em T, enquanto a entrada no terceiro braço foi bloqueada. Após o período de treino (T1), o animal foi devolvido à sua gaiola de origem por um intervalo de 30 minutos. Em T2, o bloco no braço 3 foi removido, e o camundongo foi novamente colocado no braço inicial e, em seguida, permitindo o acesso a todos os três braços do labirinto. Para minimizar a presença de trilhas olfativas, os objetos foram cuidadosamente limpos com etanol a 10% após cada experimento. O número de entradas (definido pela colocação das quatro patas em um braço) e o tempo gasto em cada braço foram registrados. Tempo no braço novo [%] foi definido como o tempo gasto no novo braço dividido pelo tempo gasto em todos os braços durante o teste (T2). A alternância forçada [%] foi definida como a porcentagem de camundongos entrando primeiro no novo braço durante o T2.

### 3.3.3 Teste de Suspensão pela Cauda

**Protocolo Experimental:** O teste da suspensão pela cauda foi desenvolvido por Steru e colaboradores (1985) baseado na premissa que um animal submetido a uma situação estressante e inescapável apresenta dois tipos de comportamentos alternados: a agitação, característica da tentativa de escape da situação de estresse, e a imobilidade. Este padrão de comportamento também pode ser chamado de “*searching-behavior*”, caracterizado pela alternância de intensa atividade motora e gasto de energia com a imobilidade (Steru et al., 1985). Neste sentido, fármacos antidepressivos comumente utilizados na clínica são capazes de reduzir o tempo de imobilidade de animais submetidos ao teste da suspensão pela cauda (Steru et al., 1985; Mantovani et al., 2003). Os animais foram colocados em uma sala, com controle de ruídos, onde foram suspensos à 30 cm acima do chão por meio de uma fita adesiva presa na ponta da cauda e em uma superfície plana. O teste foi registrado, com o auxílio de uma câmera de vídeo, durante um período de 6 min. O tempo de imobilidade foi analisado de forma que foram considerados imóveis os animais que não apresentaram movimentos ativos ou qualquer movimento corporal. Foram observados o tempo para a primeira imobilidade (latência) e o tempo total de imobilidade.

### 3.3.4 Teste da Borrifagem de Sacarose (*Splash Teste*)

**Protocolo Experimental:** Este teste seguiu o protocolo descrito por Isingrini et al. (2010), com modificações. Os indícios de falta de autocuidado e comportamento motivacional são considerados como comportamentos do tipo depressivo (Moretti et al., 2015). Os animais foram isolados 1 hora antes do teste. Um pulverizador contendo 10% de solução de sacarose foi pulverizado no revestimento dorsal do camundongo em sua gaiola doméstica. A solução de sacarose suja o animal e induz o comportamento de limpeza. Após a aplicação da solução de sacarose, é realizado o registro do tempo de autolimpeza (*grooming*) por um período de 5 minutos, como índice de autocuidado e comportamento motivacional. A proporção de tempo gasto no *grooming* ( $\text{grooming} / 5 \text{ min}$ ) foi calculada. Foram analisados os seguintes parâmetros: Tempo de autolimpeza e latência até o primeiro comportamento de autolimpeza.

### 3.3.5 Labirinto em cruz elevado

**Protocolo Experimental:** Este modelo baseia-se no conhecimento de que roedores evitam locais abertos e elevados. Quando neles confinados, mostram sinais de medo – congelamento, defecação e micção – e aumento da concentração plasmática do hormônio de estresse, corticosterona. O roedor explora ambos os braços, abertos e fechados, mas tipicamente entrará com maior frequência e permanecerá por mais tempo nos braços fechados. Uma maior intensidade de “ansiedade” equivale a menor preferência por braços abertos. Este teste representa um importante instrumento de pesquisa na área experimental para estudos de comportamentos relacionados à ansiedade, em especial na análise do efeito farmacológico de novas drogas (Lister, 1987). O aparato para camundongos, feito de acrílico transparente, consistiu de dois braços abertos (18 x 6 cm), opostos a dois braços fechados (18 x 6 x 6 cm), elevados 60 cm acima do chão. A área de junção dos quatro braços (plataforma central) mede 6 x 6 cm. Cada animal foi individualmente colocado na plataforma central de frente para o um braço fechado e foram observados durante um período de 5 min. Foram analisados os seguintes parâmetros: o número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados, o tempo de permanência nos braços abertos e nos braços fechados (foi considerada uma entrada quando as quatro patas do animal estiverem no interior do braço). Estes dados foram utilizados para calcular a porcentagem de entradas nos braços abertos [%EA: entradas nos braços abertos / (entrada nos braços abertos + entradas nos braços fechados)]; porcentagem de permanência nos braços abertos [%TA: tempo nos braços abertos / (tempo nos braços abertos + tempo nos braços fechados)]. Além disso, foi utilizado o número total de entradas nos braços fechados como uma medida de locomoção

## 3.4 ENSAIOS METABÓLICOS E CARDIOVASCULARES

### 3.4.1 Determinação de parâmetros plasmáticos

A quantificação da concentração de triacilgliceróis e colesterol no plasma dos camundongos foi realizada utilizando reagentes comerciais (Gold Analisa, Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as especificações do fabricante. O teste de tolerância a glicose iniciou com os animais passando por 6 horas de jejum. Em seguida os valores basais da glicemia dos animais foram aferidos, por meio de punção de uma gota de sangue pela cauda dos mesmos. Após essa etapa, foi administrada a glicose na

concentração de 2g/kg de peso, por meio da via intraperitoneal. As análises foram aferidas nos tempos: 15 min, 30 min, 60 min e 120 minutos após a administração de glicose. As análises pelas amostras de sangue foram feitas com tiras reagentes de glicose por meio de glicosímetro G – Tech Free Lite.

### **3.4.2 Avaliação da Reatividade Vascular**

Para a avaliação da pressão arterial os camundongos machos e fêmeas, referentes ao protocolo experimental com frutose 30%, foram anestesiados com cetamina/xilazina (90/15 mg/kg), injetada por via intramuscular, e posicionados em decúbito dorsal sobre uma plataforma metálica aquecida a 37°C. Para evitar a formação de coágulos foi administrada por via intraperitoneal 10 UI/100 µL de heparina sódica. Em todos os experimentos, a veia femoral esquerda foi dissecada para a inserção de uma agulha acoplada a uma cânula de polietileno e a uma seringa. Esse acesso venoso foi a via de administração das drogas utilizados para avaliação da reatividade vascular. A prevenção da formação de coágulos e da obstrução das cânulas foi feita pela injeção de 30 UI de heparina sódica diluída em 40 µL de PBS, através da cânula implantada. Após a anestesia, e verificação de ausência de reflexo palpebral e doloroso, a artéria carótida esquerda foi localizada, e cuidadosamente separada do nervo vago e dos tecidos adjacentes. O fluxo sanguíneo da carótida foi interrompido na extremidade distal através de ligadura com fio de sutura, enquanto o fluxo da extremidade proximal foi temporariamente interrompido através de compressão com uma pinça curva. Um pequeno corte foi realizado na região medial da porção da artéria carótida, servindo como via de inserção de um cateter de polietileno (Angiocath<sup>®</sup>, nº 24), devidamente heparinizado. O cateter foi firmemente amarrado à artéria e conectado ao transdutor de pressão (Mikro-Tip<sup>®</sup>, Millar Instruments, Inc., Huston, Texas, EUA) acoplado a um amplificador e analisador Powerlab 8/30 (AD Instruments Pty Ltda., Castle Hill, Austrália). Os registros da pressão arterial média (PAM) foram avaliados e analisados em silico (sistema operacional Windows XP<sup>™</sup>, Microsoft Corporation, EUA) por um software de integração Chart7<sup>™</sup>. A reatividade vascular foi avaliada pela administração de 3 doses consecutivas de angiotensina II (2,63; 7,88 e 23,63 ng/kg) e duas doses de nitroprussiato de sódio (2,4 e 24,0 µg/kg). Para empurrar o volume após a administração de cada uma das drogas, foi injetado 35 µl de salina 0,9% por meio de uma seringa BD. Entre a injeção de uma droga

e a outra, foi respeitado o intervalo para o reestabelecimento dos valores de pressão arterial média. A reatividade vascular foi obtida calculando-se a diferença entre o pico máximo de variação promovido pelas drogas vasoativas do seu valor basal antes da administração destas mesmas drogas (D da PAM). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  EPM da variação do D da PAM de seis animais por grupo experimental.

### **3.4.3 Análises de *western blott***

Os camundongos foram eutanasiados por overdose de anestésicos químicos após o término dos tratamentos com frutose, e o leito mesentérico fora removido. As amostras foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido, homogeneizadas em tampão de lise gelado T-PER (78510, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, EUA), coquetel inibidor de protease (P8340, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), ortovanadato de sódio (200 mM) e fluoreto de fenilmetanossulfonilo (200 mM), centrifugado a 10000 g e o sobrenadante foi recolhido para determinação da concentração proteica e preparação para eletroforese. Quantidades iguais de amostra (80  $\mu$ g de proteína) foram separadas eletroforéticamente usando eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 10% (SDS-PAGE). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose usando um aparelho Mini Trans-Blot Cell conectado a uma fonte de alimentação PowerPac™ HC (ambas da Bio-Rad, CA, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. A membrana foi bloqueada com albumina (BSA) a 5% em TBST a 0,05% por 1 h em temperatura ambiente e então submetida a imunotransferência com anticorpos primários anti- $\beta$ -actina (A3854, 1: 40000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e anti-AT1 (sc-1173, 1: 250, Santa Cruz, CA, EUA) em tampão de bloqueio a 4 ° C durante a noite. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários ligados à peroxidase com diluição 1: 5000 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA, durante 1 h à temperatura ambiente). As membranas foram expostas a substrato de HRP (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, EUA) e os complexos imunes foram visualizados por quimioluminescência utilizando o sistema Chemidoc MP (Bio-Rad Laboratories). As bandas foram quantificadas por densidade óptica usando o software do fabricante e expressas como a razão para a  $\beta$ -actina representada por unidades arbitrárias.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como a média + erro padrão da média (EPM). As comparações estatísticas foram realizadas utilizando o teste t de Student, ou análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, com medidas repetidas quando necessário. Na sessão resultados, os testes estatísticos realizados estão explicitados de acordo com cada metodologia experimental. Quando significativa as ANOVAs, múltiplas comparações post hoc foram feitas utilizando os testes de Newman Keuls. No teste de realocação de objeto e no teste do labirinto em T, o teste t de Student foi utilizado para a determinação da mudança de desempenho no teste, ou seja, i) a avaliação se a % de tempo explorando o objeto trocado de lugar diferia significativamente de um valor teórico de 50% ou ii) a avaliação se a % de tempo explorando o braço novo diferia significativamente de um valor teórico de 33%. O nível de significância adotado em todos os experimentos foi  $p < 0,05$ . Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Statistica® (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA).



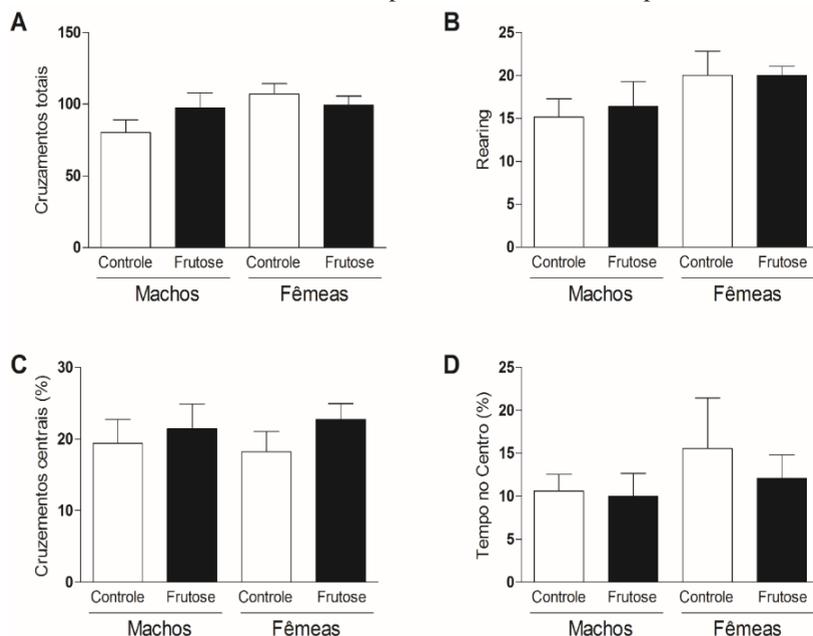
## 4. RESULTADOS

### 4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL I: PROTOCOLO DE FRUTOSE NA CONCENTRAÇÃO DE 15%

#### 4.1.1 Campo Aberto

Os resultados deste experimento foram analisados por ANOVA de duas vias (fatores dieta e gênero) e estão representados na Figura 1. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos experimentais nos parâmetros analisados, sendo esses cruzamentos totais (Fig 11a), levantamentos verticais (rearing) (Fig 11b), porcentagem de cruzamentos centrais (Fig 11c) e porcentagem de tempo no centro (Fig 11d). Estes resultados sugerem que o consumo crônico de frutose, não alterou a locomoção espontânea e não induziu comportamento tipo ansiogênico em camundongos machos e fêmeas.

Figura 11 - Teste do Campo Aberto. Foram avaliados o (A) número de cruzamentos totais, (B) levantamentos verticais (rearing), (C) porcentagem de cruzamentos centrais e (D) porcentagem de tempo no centro, em camundongos machos e fêmeas. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média.

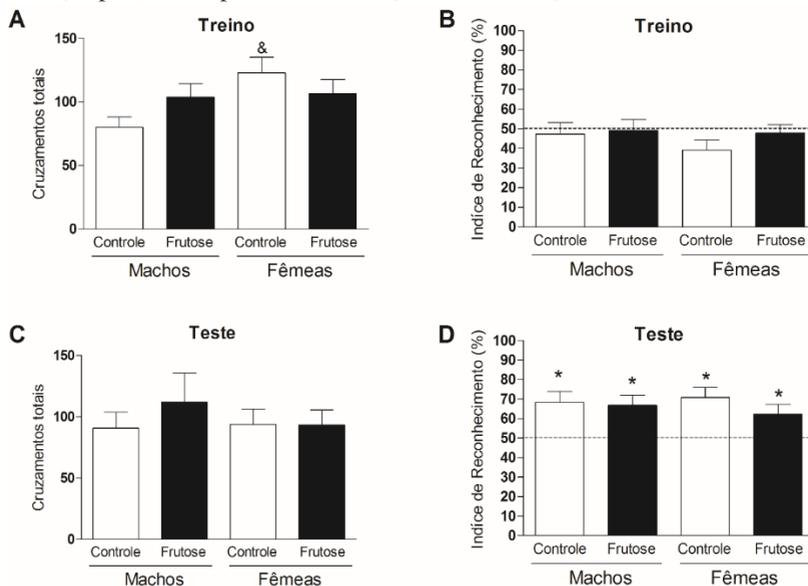


Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.1.2 Reconhecimento de Objetos

A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o fator gênero [ $F(1, 28) = 4,55$  e  $p < 0,05$ ] com relação ao número total de cruzamentos durante a fase de treino. As comparações *post hoc* subsequentes revelaram diferenças significativas entre os grupos macho e fêmea controles ( $P < 0,05$ ), mostrando um aumento na locomoção espontânea de fêmeas (Fig. 12a). Importante notar que nenhuma preferência inata pela posição do objeto foi exibida entre os grupos experimentais, como indicado pela igual exploração de tempo investigando ambos os objetos durante a sessão de treino (ou seja, nenhuma diferença entre o tempo gasto explorando um dos objetos, dentro do nível de chance, 50%, foi observado) (Fig. 12b). Ainda, nenhuma diferença estatística foi identificada entre os grupos, no que se refere à porcentagem de cruzamentos centrais (Fig. 12c). Com relação ao índice de reconhecimento do objeto, todos os grupos experimentais demonstraram aprender a tarefa, explorando os objetivos acima do nível de chance (50%) durante a sessão de teste: (Controle Macho:  $t = 3,34$ ,  $df = 7$  e  $P < 0,05$  e Controle Fêmea:  $t = 3,98$ ,  $df = 6$  e  $P < 0,01$ ) (Frutose Macho:  $t = 3,29$ ,  $df = 7$  e  $P < 0,05$  e Frutose Fêmea:  $t = 2,58$ ,  $df = 7$  e  $P < 0,05$ ) (Fig. 12d). Estes resultados indicam que o consumo crônico de frutose nesta concentração não afetou a memória de reconhecimento de curto prazo.

Figura 12 - Teste do Reconhecimento de Objetos. Foram avaliados (A) o número de cruzamentos totais durante a sessão de treino, (B) índice de reconhecimento durante a sessão de treino, (C) o número de cruzamentos totais durante a sessão de teste e (D) o índice de reconhecimento durante a sessão de teste. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. &  $p < 0.05$  comparado grupo macho controle (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Newman Keuls). \* $p < 0,05$  comparado aos 50% (nível de chance) Teste t de Student.



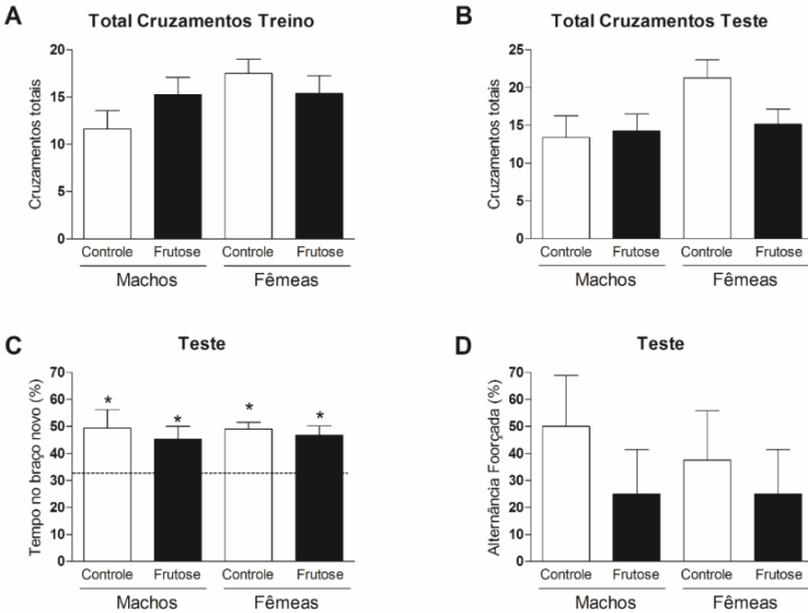
Fonte: Elaborado pela autora.

### 4.1.3 Labirinto em T

A memória de referência espacial foi avaliada por meio do teste de labirinto em T modificado. Embora o labirinto em T venha sendo amplamente utilizado para investigar aspectos específicos da memória de trabalho espacial, a versão modificada do labirinto em T, aqui utilizada, utilizou pistas visuais orientadas espacialmente para ajudar os roedores a explorar um novo braço anteriormente inexplorado (Santos et al., 2017). Com relação ao número total de cruzamentos totais ao longo dos braços do aparato, nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos na sessão de treino (Fig. 13a) e durante o teste (Fig. 13b). Ainda, como mostrado na Fig. 13c, com relação à porcentagem de tempo de exploração no braço novo, todos os grupos exploraram acima do nível de chance (33%) nesse parâmetro (*Controle Macho*:  $t = 2.38$ ,  $df = 7$ ,  $P <$

0,05 e Controle Fêmea:  $t=6.43$ ,  $df=7$  e  $P < 0,001$ ) (Frutose Macho:  $t=2.58$ ,  $df=7$  e  $P < 0,05$  e Frutose Fêmea:  $t=4.26$ ,  $df=7$  e  $P < 0,005$ ), demonstrando aprendizado da tarefa. Ademais, a ANOVA de duas vias não indicou diferenças significativas entre os grupos com relação à porcentagem de alternância forçada (ou seja, a porcentagem de camundongos entrando primeiro no novo braço durante o teste) (Fig. 13d).

Figura 13 - Teste do Labirinto em T. Foram avaliados (A) número total de cruzamentos na sessão de treino, (B) número total de cruzamentos na sessão de teste, (C) porcentagem de tempo no braço novo na sessão de teste e (D) alternância forçada. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. \* $p < 0.05$  comparado aos 33% (nível de chance) teste t.



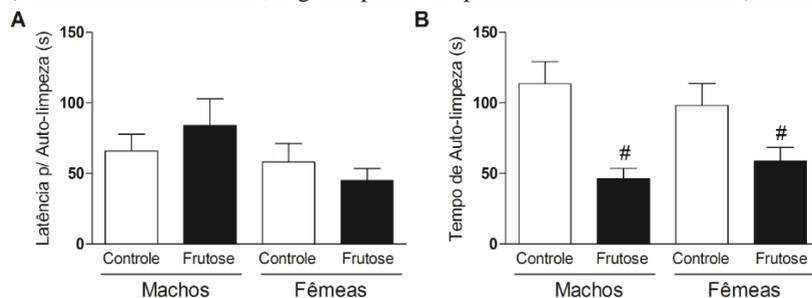
Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.1.4 Teste da Borrifagem de Sacarose (*Splah Teste*)

A ANOVA de duas vias não identificou nenhuma diferença estatística com relação à de latência para o comportamento de autolimpeza (Fig. 14a). Por outro lado, quando avaliado o tempo total de autolimpeza, a ANOVA indicou significância do fator frutose [ $F(1, 28)=17,482$ ,  $p < 0,0005$ ]. As comparações *post hoc* subsequentes

indicaram diferenças significativas entre os grupos macho controle e macho frutose ( $P < 0,05$ ), assim como entre os grupos fêmeas controle e fêmeas frutose ( $P < 0,05$ ), sendo que em ambos os casos, o consumo crônico de frutose diminuiu o tempo de autolimpeza (Fig 14b). Esse parâmetro é um índice de motivação e autocuidado, sendo que em estudos com modelos animais é relacionado ao comportamento do anedônico.

Figura 14 - Teste da Borrifagem de Sacarose. Foram avaliadas a (A) latência para auto-limpeza, (B) tempo total de auto-limpeza. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. # $P < 0,05$  comparado com controle do mesmo sexo (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Newman Keuls).

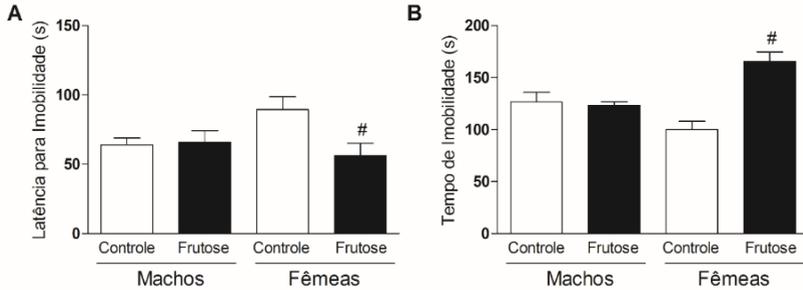


Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.1.5 Teste da Suspensão pela Cauda

A ANOVA de duas vias indicou uma interação entre os fatores gênero e frutose [ $F(1, 28) = 4,6800$ ,  $P < 0,05$ ] com relação ao parâmetro de latência para a imobilidade. As comparações post hoc subsequentes revelaram diferenças significativas entre os grupos fêmea controle e fêmea frutose ( $P < 0,05$ ) (Fig. 15a). Com relação ao tempo total de imobilidade, a ANOVA indicou significância do fator frutose [ $F(1, 28) = 15,796$ ,  $P < 0,005$ ] e também uma da interação dos fatores gênero e frutose [ $F(1, 28) = 19,252$ ,  $P < 0,005$ ]. As análises post hoc subsequentes revelaram diferenças significativas apenas entre os grupos fêmea controle e fêmea frutose ( $P < 0,05$ ), sendo observado um aumento no tempo de imobilidade em fêmeas tratadas com frutose (Fig. 15b).

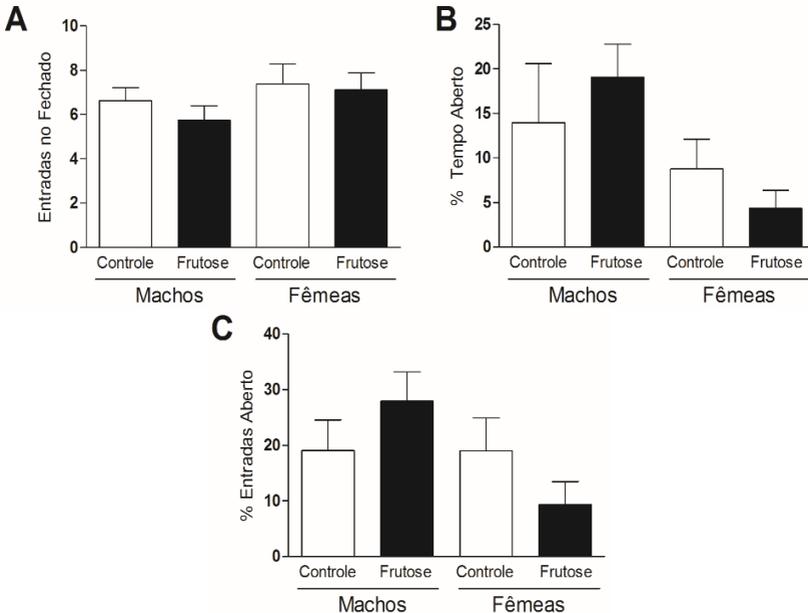
Figura 15 - Teste da Suspensão pela Cauda. Foram avaliados a (A) latência para imobilidade, (B) tempo total de imobilidade. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. #p < 0.05 comparado ao grupo controle do mesmo sexo (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Newman Keuls).



Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.1.6 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Figura 16 - Teste do Labirinto em Cruz Elevado. Foram avaliados os parâmetros de (A) total de entradas no braço fechado, (B) porcentagem de tempo no aberto e (C) porcentagem de tempo no braço aberto. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média (ANOVA de duas vias).



Fonte: Elaborado pela autora.

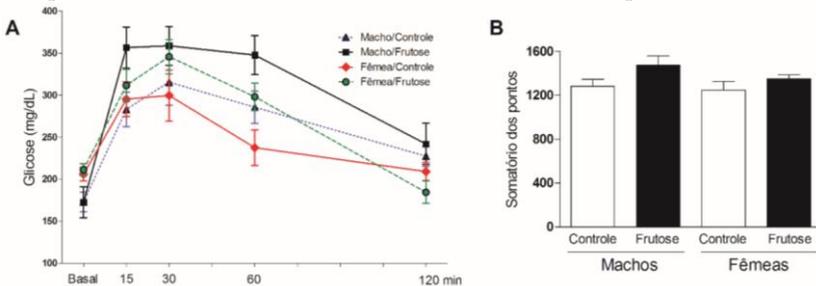
A ANOVA de duas vias não identificou nenhum fator significativo com relação ao número total de entradas no braço fechado, uns dos parâmetros análises (Fig 16a). Com relação à porcentagem de tempo que os animais permaneceram no braço aberto, a ANOVA indicou significância para o fator sexo [ $F(1, 28)=5,4809, P<0,05$ ], todavia as análises post hoc subsequentes não identificaram diferença entre os grupos experimentais (Fig 16b). Por outro lado, a ANOVA não indicou diferenças significativas no parâmetro de porcentagem de entradas no braço aberto (Fig 16c). Conjuntamente, esses resultados revelam que não houveram alterações no comportamento exploratório e emocional dos animais que receberam a dieta com a concentração de 15% de frutose.

## 4.2 ANÁLISES METABÓLICAS

### 4.2.1 Teste de Tolerância à Glicose

A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do fator frutose [ $F(1, 28)=4,7232, P<0,005$ ], do fator repetição [ $F(4, 112)=61,173, P<0,0001$ ], assim como, uma interação dos fatores Repetição\*Gênero [ $F(4, 112)=4,3275, P<0,005$ ] e interação dos fatores Repetição\*Frutose [ $F(4, 112)=3,4612, P<0,05$ ]. Contudo, na análise ponto a ponto, por meio do teste *post-hoc* de Newman Keuls, em nenhum ponto de análise foram encontradas diferenças significativas entre os grupos macho controle e macho frutose; ou os grupos fêmea controle e fêmea frutose (Fig. 17a). Quando avaliado a somatória dos pontos, a ANOVA identificou um efeito significativo do fator frutose [ $F(1, 28)=4,7232, P<0,05$ ], porém não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos quando analisados pelo teste de Newman Keuls (Fig 17b).

Figura 17 - Teste da Tolerância à Glicose. Foram avaliadas (A) a curva temporal da concentração plasmática de glicose e (B) a somatória total dos pontos referentes ao gráfico da curva temporal. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média (ANOVA de duas vias, com medidas repetidas em A).

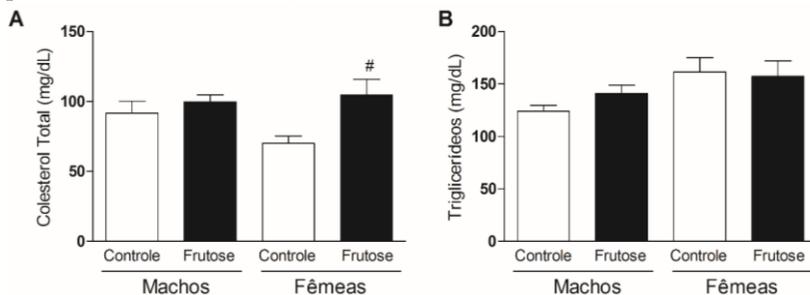


Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.2.2 Concentração plasmática de colesterol e triglicerídeos

Com relação à concentração de colesterol plasmática, a ANOVA de duas vias identificou um efeito significativo do fator frutose [ $F(1, 28)=7,2851, P<0,05$ ]. As subseqüentes análises *post hoc* identificaram diferenças significativas entre os grupos Fêmea Controle e Fêmea Frutose ( $P<0,05$ ), sendo observado um aumento na concentração plasmática de colesterol em fêmeas tratadas com frutose (Fig. 18a). Por outro lado, com relação à concentração de triglicerídeos plasmáticos, a ANOVA identificou um efeito significativo do fator gênero [ $F(1, 28)=5,9356, P<0,05$ ], porém as análises *post hoc* subseqüentes não identificaram diferença entre os grupos (Fig. 18b).

Figura 18 - Concentração plasmática de (A) colesterol total e (B) triglicerídeos. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. #p <0.05 comparado ao controle do mesmo sexo (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Newman Keuls).

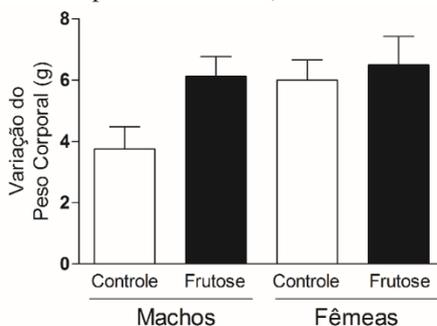


Fonte: Elaborado pela autora.

### 4.2.3 Variação da massa corporal

Com relação à variação de massa corporal durante o tratamento crônico com frutose, a ANOVA de duas vias não identificou fatores com significância, indicando desta forma que o tratamento por oito semanas com uma concentração de 15% de frutose não refletiu em significativamente em ganho de massa corporal nos animais (Fig. 19).

Figura 19 - Avaliação da variação de massa corporal (g). Os valores estão expressos em média + erro padrão da média (ANOVA de duas vias).



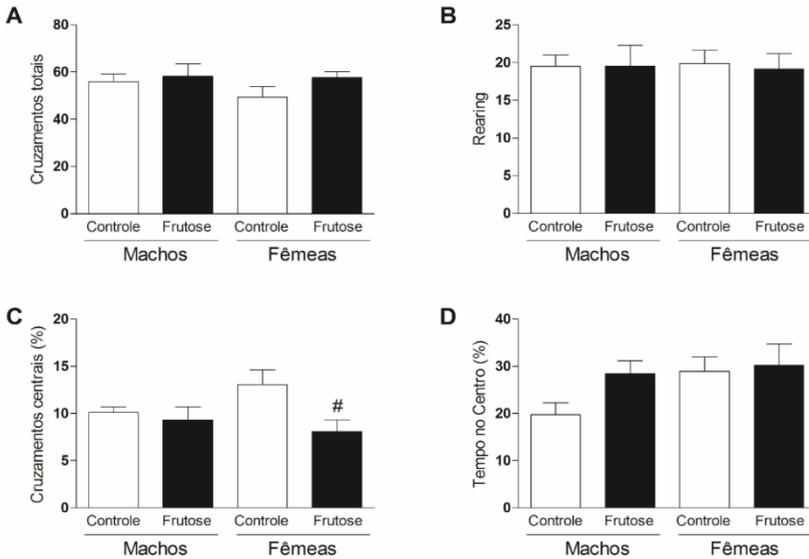
Fonte: Elaborado pela autora.

## 4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL II: PROTOCOLO DE FRUTOSE NA CONCENTRAÇÃO DE 30%

### 4.3.1 Campo Aberto

ANOVA de duas vias não indicou efeito significativos dos fatores avaliados com relação aos parâmetros de cruzamentos totais (Fig. 20a), levantamentos verticais (*rearing*) (Fig. 20b) e porcentagem de tempo no centro (Fig. 20d). Contudo, na análise da porcentagem de cruzamentos centrais (Fig. 20c), a ANOVA identificou um efeito significativo do fator frutose ( $F(1, 28)=5,3446, P<0,05$ ). Comparações *post hoc* subsequentes indicaram diferenças significativas entre os grupos fêmea controle e fêmea frutose, sendo observado uma diminuição na porcentagem de cruzamentos centrais em fêmeas tratadas com frutose ( $P<0,05$ ). Estes resultados sugerem que o consumo crônico de frutose induziu comportamento tipo ansiogênico no grupo das fêmeas, sem alterar a locomoção espontânea.

Figura 20 - Teste do Campo Aberto. Foram avaliados o (A) número total de cruzamentos totais, (B) número de levantamentos verticais, rearing, (C) porcentagem de cruzamentos centrais e (D) porcentagem de tempo no centro. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. # $P < 0,05$  comparado com controle do mesmo sexo (ANOVA de duas vias seguido do teste de Newman Keuls).



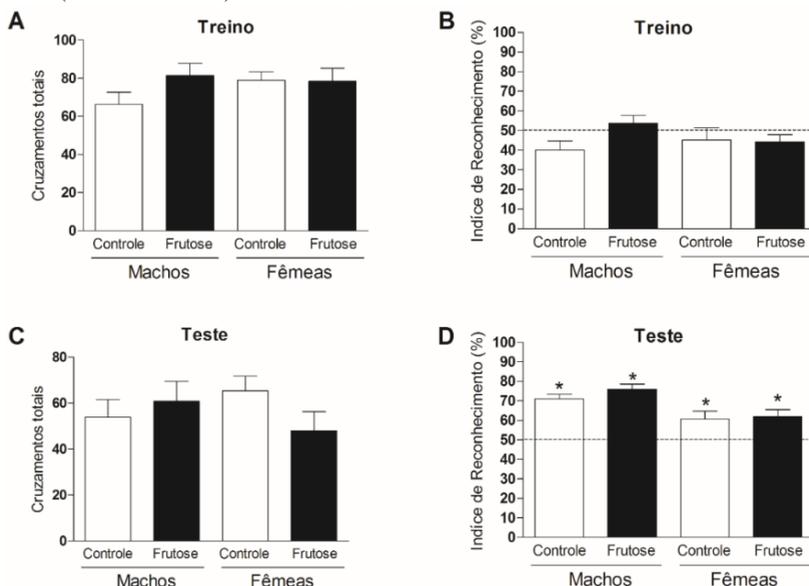
Fonte: Elaborado pela autora.

### 4.3.2 Teste de Reconhecimento de Objetos

A ANOVA de duas vias não indicou efeito significativo para nenhum fator com relação ao total de cruzamentos (Fig. 21a) durante a fase de treino. Também deve ser notado que nenhuma preferência inata pela posição do objeto foi exibida entre os grupos, como indicado pela quantidade similar de tempo gasto investigando ambos os objetos durante a sessão de treino (ou seja, nenhuma diferença entre o tempo gasto explorando um dos objetos, dentro do nível de chance, 50%, foi observada) (Fig. 21b). Em relação ao número de cruzamentos totais na sessão de teste (Fig. 21c), a ANOVA identificou um efeito do fator gênero [ $F(1, 28) = 14,358, P < 0,001$ ], porém as análises post hoc subsequentes não identificaram diferença entre os grupos. Por fim, com relação ao índice de reconhecimento do objeto durante a sessão de teste (Fig. 21d), todos os grupos demonstraram aprender a tarefa, explorando os objetivos acima do nível de chance (50%): (*Controle Macho*:  $t = 9,47, df = 7$  e  $P <$

0,05 e Controle Fêmea:  $t=2.51$ ,  $df=7$  e  $P < 0,05$ ) (Frutose Macho:  $t=10.21$ ,  $df=7$  e  $P < 0,05$  e Frutose Fêmea:  $t=3.34$ ,  $df=7$  e  $P < 0,05$ ). Estes resultados indicam que o consumo crônico de frutose não afetou a memória de reconhecimento curto prazo.

Figura 21 - Teste do Reconhecimento de Objetos. Foram avaliados (A) o número de cruzamentos totais durante a sessão de treino, (B) índice de reconhecimento durante a sessão de treino, (C) o número de cruzamentos totais durante a sessão de teste e (D) o índice de reconhecimento durante a sessão de teste. Os valores estão expressos em média + e erro padrão da média. \* $p < 0,05$  comparado aos 50% (nível de chance) Teste t de Student.



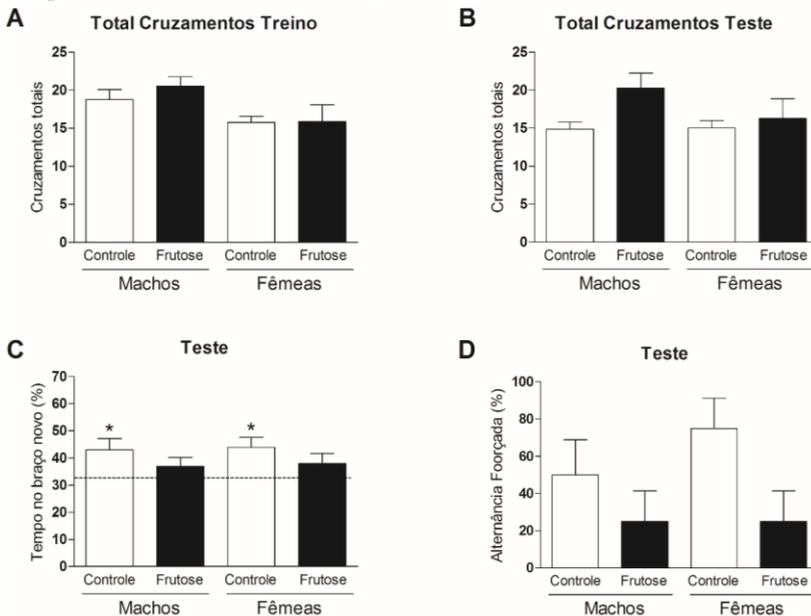
Fonte: Elaborado pela autora.

### 4.3.2 Labirinto em T

A ANOVA identificou um efeito significativo do fator gênero [F(1, 28)=6,6736,  $P < 0,05$ ] nos cruzamentos totais durante a sessão de treino (Fig. 22a), embora as análises post hoc subsequentes não identificaram diferença entre os grupos. Com relação a este mesmo fator, durante a sessão de teste, nenhuma diferença estatística fora encontrada (Fig. 22b). Quando analisado o tempo de exploração no braço novo na sessão de teste (Fig. 22c), foi observado que os grupos controles exploraram acima do nível de chance (33%), sendo os grupos controle

(Controle Macho:  $t = 2.37$ ,  $df = 7$ ,  $P < 0,05$  e Controle Fêmea:  $t = 3.024$ ,  $df = 7$  e  $P < 0,05$ ). Por outro lado, os grupos tratados com dieta 30% frutose passaram uma porcentagem de tempo menor no braço novo e que não foi significativamente diferente do nível de chance (33%) (Frutose Macho:  $t = 1.18$ ,  $df = 7$  e  $P > 0,05$  e Frutose Fêmea:  $t = 1.27$ ,  $df = 7$  e  $P > 0,05$ ). Estes resultados indicam que o consumo crônico de frutose prejudicou a consolidação da memória de curto prazo dos animais avaliados. Além disso, a ANOVA identificou um efeito significativo do fator frutose [ $F(1, 28) = 4,8462$ ,  $P < 0,05$ ] na porcentagem de alternância forçada, porém as análises post hoc subsequentes não identificaram diferença entre os grupos (Fig. 22d).

Figura 22 - Teste do Labirinto em T. Foram avaliados (A) número total de cruzamentos na sessão de treino, (B) total de cruzamentos na sessão teste, (C) porcentagem de tempo no braço novo na sessão de teste e (D) alternância forçada. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. \* $p < 0.05$  comparado aos 33% (nível de chance); teste “t” de Student.

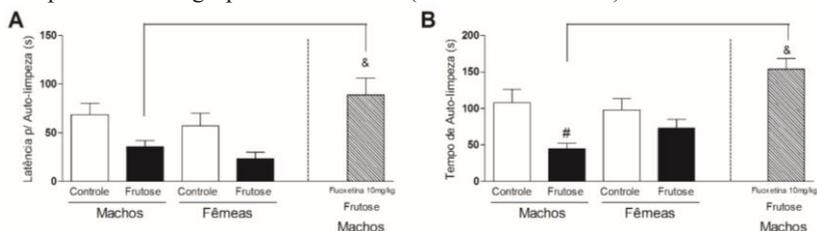


Fonte: Elaborado pela autora.

### 4.3.4 Teste da Borrifagem de Sacarose (*Splash Teste*)

A ANOVA de duas vias identificou um efeito significativo do fator frutose com relação ao parâmetro de latência para auto-limpeza [ $F(1, 28)=11,397, P<0,005$ ] (Fig. 23a), porém as análises post hoc subsequentes não identificaram diferença entre os grupos experimentais. Por outro lado, os grupos macho frutose e macho frutose tratados agudamente com o fármaco antidepressivo fluoxetina foram comparados, isoladamente por meio de teste “t” de Student, foi observado que o tratamento com fluoxetina induziu uma maior latência para o comportamento de autolimpeza dos animais [ $t=3.210 df=12, P=0,0075$ ]. Posteriormente, quando avaliado o tempo total de autolimpeza (Fig. 23b), a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do fator frutose [ $F(1, 28)=9,6704, P<0,005$ ]. As comparações post hoc subsequentes revelaram diferenças significativas entre os grupos macho controle e macho frutose ( $P<0,05$ ), sendo que o consumo crônico de frutose induziu uma diminuição no tempo de autolimpeza dos animais (Fig 23b). Ainda, quando comparados os grupos macho frutose com macho frutose e tratados agudamente com fluoxetina, foi observado que os animais tratados com fluoxetina apresentaram um aumento no tempo total de autolimpeza [ $t=7.012, df=12, P<0.0001$ ].

Figura 23 - Teste da Borrifagem de Sacarose. Foram avaliados a (A) latência para auto-limpeza e (B) tempo de auto-limpeza. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. # $p < 0.05$  comparado com controle do mesmo sexo (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Newman Keuls); & $p < 0,05$  comparado com o grupo macho frutose (teste “t” de Student).



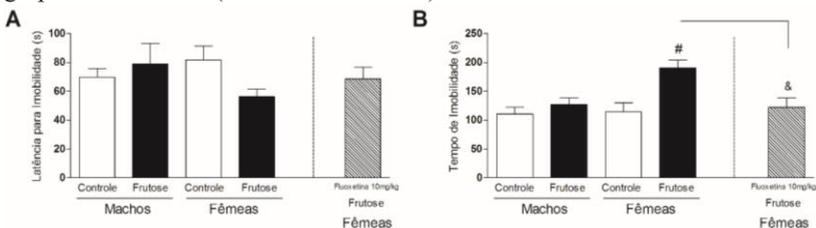
Fonte: Elaborado pela autora.

### 4.3.5 Teste da Suspensão pela Cauda

A ANOVA de duas vias não indicou diferenças significativas para os fatores em relação à latência para a imobilidade (Fig 24a). Por outro lado, quando avaliado o tempo de imobilidade, a ANOVA identificou um

efeito significativo do fator gênero [ $F(1, 28)=6,3420, P<0,05$ ], do fator frutose [ $F(1, 28)=12,023, P<0,005$ ] e também do fator interação entre gênero e frutose [ $F(1, 28)=5,0016, P<0,05$ ]. As análises *post hoc* subsequentes revelaram diferenças significativas entre os grupos fêmea controle e fêmea frutose ( $P<0,05$ ), sendo observado um aumento no tempo de imobilidade nas fêmeas tratadas com frutose (Fig 24b). Ademais, quando foram comparados separadamente os grupos fêmea frutose e fêmea frutose tratados agudamente com a fluoxetina, foi observado que o grupo que recebeu o tratamento com fluoxetina apresentou uma diminuição no tempo de imobilidade [ $t=3.229, df=12, P<0,005$ ].

Figura 24 - Teste da Suspensão pela Cauda. Foram avaliados a (A) latência para imobilidade e (B) tempo de imobilidade. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. # $p<0,05$  comparado ao controle do mesmo sexo (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Newman Keuls). & $p<0,05$  comparado ao grupo fêmea frutose (Teste “t” de Student).

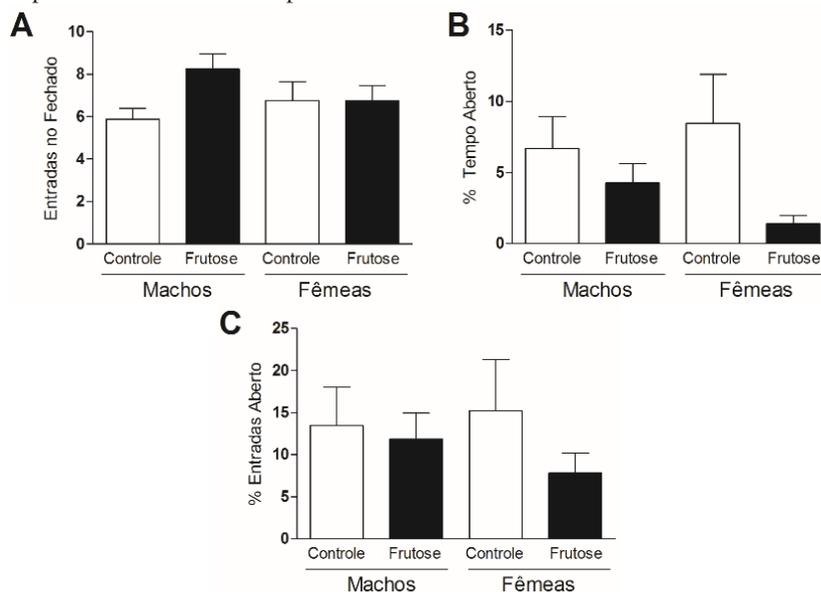


Fonte: Elaborado pela autora.

### 4.3.6 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

A ANOVA de duas vias não identificou nenhum fator significativo com relação ao parâmetro de número total de entradas no braço fechado (Fig 25a). Na avaliação da porcentagem de tempo que os animais permaneceram no braço aberto, a ANOVA indicou um efeito significativo do fator frutose [ $F(1, 28)=4,8133, P<0,05$ ], todavia as análises *post hoc* subsequentes não identificaram diferença entre os grupos (Fig 25b). Por fim, não houveram diferenças significativas com relação à porcentagem de entradas no braço aberto (Fig 25c).

Figura 25 - Teste do Labirinto em Cruz Elevado. Foram avaliados (A) número total de entradas nos braços fechados, (B) porcentagem de tempo nos braços abertos e (C) porcentagem de tempo nos braços abertos. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média.



Fonte: Elaborado pela autora.

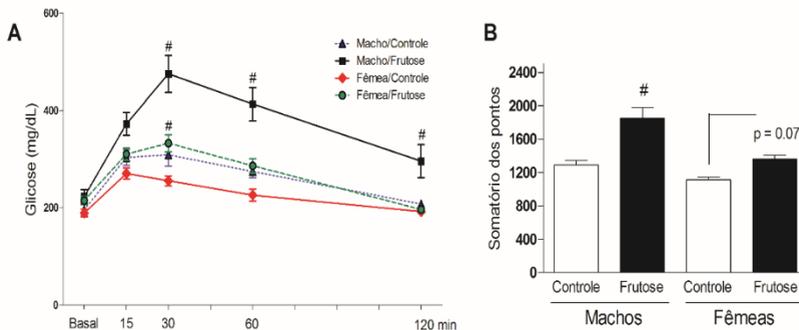
## 4.4 ANÁLISES METABÓLICAS

### 4.4.1 Teste de Tolerância à Glicose

A ANOVA de duas vias identificou um efeito significativo do fator gênero [ $F(1, 28)=18,880, P<0,0005$ ], do fator frutose [ $F(1, 28)=27,654, P<0,0001$ ], do fator repetição [ $F(4, 112)=92,171, P<0,00001$ ], assim como uma interação dos fatores repetição\*gênero [ $F(4, 112)=8,0567, P<0,00001$ ], interação repetição\*frutose [ $F(4, 112)=11,494, P<0,0001$ ] e interação repetição\*gênero\*frutose [ $F(4, 112)=2,6936, P<0,05$ ]. As análises *post hoc* subsequentes identificaram diferenças pontuais entre os grupos macho controle e macho frutose, assim como entre as fêmeas controle e as fêmeas frutose nos tempos 30 e 60 minutos após a administração de glicose (Fig 26a). Quando avaliado o somatório dos pontos, a ANOVA identificou um efeito significativo do fator gênero [ $F(1, 28)=18,880, P<0,0005$ ] e do fator frutose [ $F(1, 28)=27,654, P<0,00001$ ], sendo que o teste de Newman Keuls identificou uma

diferença entre os grupos macho controle e macho frutose ( $p < 0,05$ ) e uma tendência entre os grupos fêmea controle e fêmea frutose ( $p < 0,07$ ) (Fig. 26b). Conseqüentemente, esses resultados indicam que o consumo crônico de frutose (30%), causou uma intolerância à glicose nos animais machos e fêmeas, quando comparados aos seus respectivos grupos controle.

Figura 26 - Teste da Tolerância à Glicose. Foram avaliadas (A) a curva temporal da concentração plasmática de glicose e (B) a somatória total dos pontos referentes ao gráfico da curva temporal. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. # $p < 0,05$  comparado ao respectivo grupo controle (ANOVA de duas vias, com medias repetidas em A, seguida pelo teste de Newman Keuls).



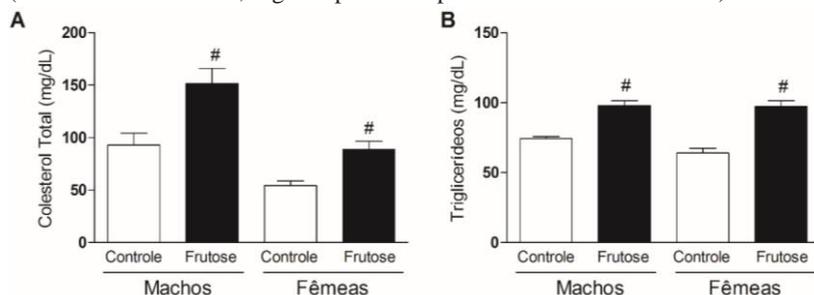
Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.4.2 Concentração Plasmática de Colesterol e Triglicerídeos

Com relação à concentração plasmática de colesterol, a ANOVA de duas vias identificou um efeito significativo do fator gênero [ $F(1, 28)=24,433, P < 0,0005$ ] e do fator frutose [ $F(1, 28)=20,751, P < 0,0005$ ]. As subsequentes análises *post hoc* revelaram diferenças significativas entre os grupos fêmea controle e fêmea frutose, bem como entre os grupos macho controle e macho frutose ( $p < 0,05$ ) (Fig 27a), sendo observado que a frutose aumentou a concentração plasmática de colesterol tanto em machos quanto em fêmeas. Com relação à concentração plasmática de triglicerídeos, a ANOVA identificou um efeito significativo do fator frutose [ $F(1, 28)=74,298, P < 0,00005$ ], sendo que as análises *post hoc* subsequentes identificaram diferença entre os grupos fêmea controle e fêmea frutose, bem como entre os grupos macho controle e macho frutose ( $p < 0,05$ ), sendo observado que a frutose aumentou a concentração

plasmática de triglicerídeos tanto em machos quanto em fêmeas. (Fig 27b).

Figura 27 - Concentração plasmática de (A) colesterol total e (B) triglicerídeos. Os valores estão expressos em média + erro padrão da média. #p <0.05 comparado ao controle do mesmo sexo (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Newman Keuls). #p <0.05 comparado ao controle do mesmo sexo (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Newman Keuls).

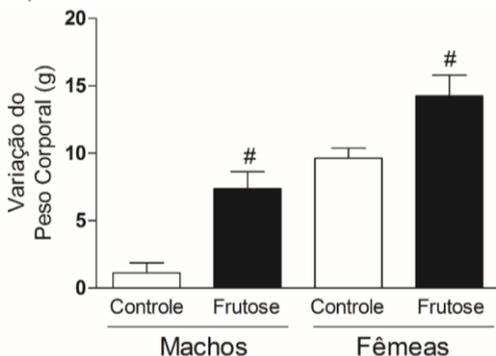


Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.4.3 Variação da Massa Corporal

A ANOVA de duas vias identificou um efeito significativo do fator gênero [ $F(1, 28)=46,592, P<0,0005$ ] e do fator frutose [ $F(1, 28)=23,310, P<0,0005$ ]. As subsequentes análises *post hoc* indicaram diferenças significativas entre os grupos fêmea controle e fêmea frutose, bem como entre os grupos macho controle e macho frutose ( $p<0,05$ ) (Fig. 28). Em síntese, o consumo crônico de frutose aumentou o ganho de massa corporal em ambos os grupos, fêmeas e machos, quando comparados aos seus controles.

Figura 28 - Avaliação da variação de massa corporal (g). Os valores estão expressos em média + erro padrão da média (ANOVA de duas vias). # $p < 0.05$  comparado ao controle do mesmo sexo (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Newman Keuls).



Fonte: Elaborado pela autora.

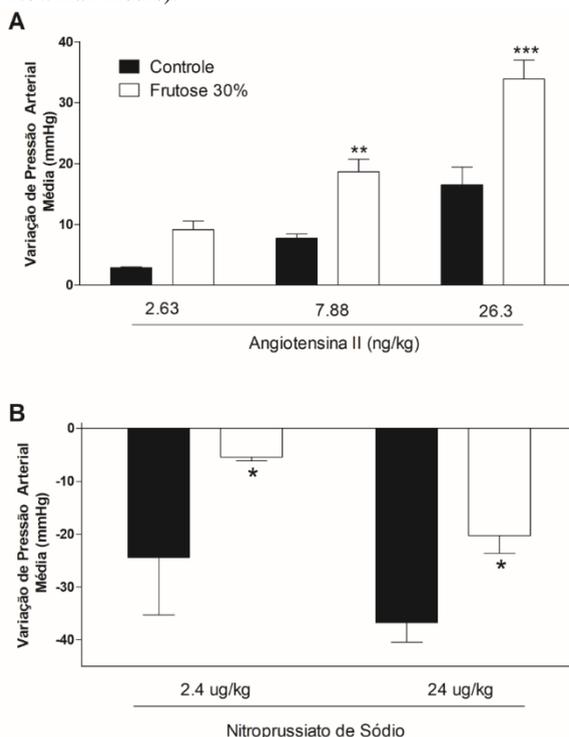
## 4.5 ANÁLISES CARDIOVASCULARES

### 4.5.1 Reatividade Vascular

A reatividade vascular foi avaliada por meio da aferência da variação da pressão arterial média após a administração de 3 doses consecutivas de angiotensina II (2,63; 7,88 e 23,63 ng/kg) e duas doses de nitroprussiato de sódio (2,4 e 24,0 µg/kg). Nestes experimentos foram utilizados seis animais por grupo experimental, sendo três machos e três fêmeas em cada um. Com relação ao desafio com angiotensina II, a ANOVA de duas vias identificou um efeito significativo do fator frutose [ $F=44,44$ ,  $P<0,0001$ ], do fator concentração de angiotensina [ $F=41,73$ ,  $P<0,0001$ ] e uma interação entre os fatores frutose e angiotensina [ $F=3,45$ ,  $P<0,05$ ]. Análises *post hoc* subsequentes identificaram uma maior variação da pressão arterial média nos animais cronicamente expostos à frutose, em comparação com o respectivo grupo controle, após a administração das doses de 7,88 ( $P<0,01$ ) e 23,65 ( $P<0,001$ ) ng/kg de angiotensina II, um agente vasoconstritor (Fig. 29a). Por outro lado, com relação ao desafio com nitroprussiato de sódio, a ANOVA de duas vias identificou um efeito significativo do fator frutose [ $F=17,62$ ,  $P<0,005$ ] e do fator concentração de nitroprussiato de sódio [ $F=10,36$ ,  $P<0,01$ ]. Análises *post hoc* subsequentes identificaram uma menor variação da pressão arterial média nos animais cronicamente expostos à frutose, em comparação com o respectivo grupo controle, após a administração das

doses de 2,4 ( $P<0,01$ ) e 24 ( $P<0,001$ )  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de nitroprussiato de sódio, um agente vasodilatador (Fig. 29b).

Figura 29 - Variação de pressão arterial média após a (A) administração de 3 doses consecutivas de angiotensina II (2,63; 7,88 e 23,63  $\text{ng}/\text{kg}$ ) e (B) duas doses de nitroprussiato de sódio (2,4 e 24,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). \* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$ ; \*\*\* $P<0,001$  em comparação com o respectivo grupo controle (ANOVA de duas vias e teste post hoc de Newman Keuls).



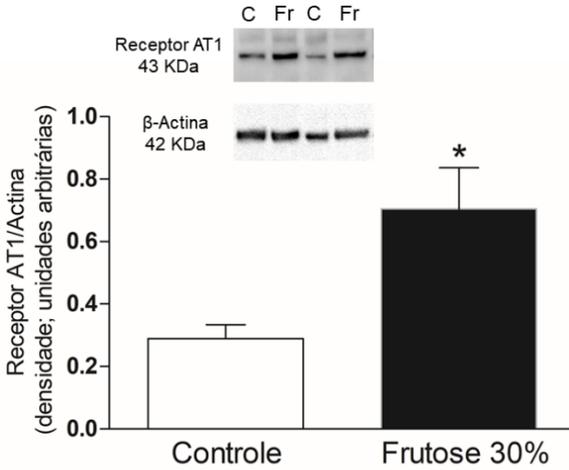
Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.5.2 Expressão do Receptor AT1 no Leito Mesentérico

O imunoconteúdo (densidade) do receptor de angiotensina 1, AT1, foi aferido no leito mesentérico dos animais por meio da técnica de *western blot*. A densidade óptica do receptor AT1 foi normalizada pela densidade óptica da beta-actina, proteína utilizada como controle de conteúdo proteico. O teste “t” de student foi utilizado para comparar as diferenças na densidade do receptor AT1 entre os grupos frutose e controle. Foi observado uma maior densidade do receptor AT1 no leito

mesentérico de animais tratados com frutose em comparação com animais controle ( $t=2,979$ ,  $df=10$ ;  $P<0,05$ ) (Fig. 30).

Figura 30 - Imunoconteúdo (densitometria óptica) do receptor AT1 no leito mesentérico. \* $P<0,05$ ; em comparação com o respectivo grupo controle (teste “t” de student).



Fonte: Elaborado pela autora.

## 5. DISCUSSÃO

Há muito tempo a ciência reconhece que o consumo excessivo de açúcar pode ser prejudicial à saúde humana. John Yudkin descreveu esse macronutriente como “puro, branco e mortal”, após sua pesquisa demonstrar a associação entre o consumo de açúcar e doenças coronarianas (1986). Neste sentido, muitas pesquisas vêm avaliando os efeitos negativos da frutose, um tipo de açúcar, também conhecido como açúcar das frutas, um monossacarídeo duas vezes mais doce que a glicose, que antigamente costumava ser consumido de forma equilibrada, juntamente com fibras, vitaminas e minerais presentes nos alimentos. No entanto, atualmente, quantidades crescentes de frutose livre são usadas em dietas ocidentais, e.g., em refrigerantes, os quais contém duas vezes mais frutose do que a glicose (Walker et al., 2014). Em 1957, com o desenvolvimento do HFCS (xarope de milho rico em frutose), facilitou-se a ingestão crescente de frutose por meio de alimentos processados e bebidas adoçadas (Douard et al., 2008). Ao longo dos anos, o consumo crônico e elevado de frutose resultou em um aumento da prevalência de doenças metabólicas, como obesidade e DM2. Dietas ricas em frutose são conhecidas por causar estresse oxidativo, diminuir a tolerância à glicose, e induzir resistência à insulina e hipertensão (Martinez et al., 1994; Akar et al., 2012; Lowette et al., 2015). Ainda, o aumento no consumo de frutose está associado à alterações na sinalização de hormônios relacionados à regulação do consumo alimentar (Lindqvist et al., 2008).

A obesidade, definida pelo excesso de acúmulo de gordura corporal, está associada ao desenvolvimento de DM2 e é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Yahiro et al., 2019). O aumento excessivo de adipócitos induz maior liberação de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo IL-6 e TNF- $\alpha$ , as quais em longo prazo culminam em um estado inflamatório crônico, levando a resistência à insulina e ao DM2 (Richardson et al., 2013). O DM2 tipicamente ocorre em indivíduos com sobrepeso ou obesos. Nesta doença, as células beta pancreáticas inicialmente continuam secretando insulina, mas progressivamente o corpo se torna resistente a essa ação, exigindo níveis mais elevados para restaurar a homeostase da glicose (Semenkovich et al., 2015).

Evidências crescentes sugerem que o comprometimento cognitivo leve e a demência podem ser complicações do DM2 (Li e Huang, 2016; Strachan et al., 2011), bem como, a depressão. Neste caso, a relação parece ser bidirecional. Pacientes com DM2 são mais propensos a passar por um episódio depressivo, assim como, pacientes depressivos são

igualmente mais propensos a desenvolver DM2 (Semenkovich et al., 2015). Neste sentido, um grande número de estudos epidemiológicos e meta-análises vem indicando a associação entre depressão e obesidade como condições médicas comumente co-ocorrentes (McIntyre et al., 2006; de Wit et al., 2010). Sugere-se que tanto a depressão quanto a obesidade são transtornos que envolvem desregulação do sistema de estresse (Bornstein et al., 2006). Os mecanismos que ligam essas duas condições vem sendo extensivamente estudados, e indicam o envolvimento da desregulação hipotalâmica, hipofisária e adrenal (eixo HPA), bem como inflamação, estresse oxidativo e disfunção endócrina (Hryhorczuk., 2013). É bem estabelecido que a depressão é uma doença inflamatória crônica. Portanto, a obesidade e transtornos depressivos são comuns comorbidades e têm discretas, mas sobrepostas, patologias (Jantaratnotai et al., 2017).

Considerando tal relação objeto do presente estudo, i.e., associação entre o aumento no consumo de frutose e o desenvolvimento de obesidade, distúrbios metabólicos e cardiovasculares, bem como sua relação com doenças neuropsiquiátricas (e.g., depressão e comprometimento cognitivo), é salutar a observação e padronização de tais alterações em modelos experimentais, a fim de se investigar os mecanismos celulares/moleculares envolvidos e, principalmente, desenvolver estratégias, farmacológicas ou não farmacológicas, preventivas e terapêuticas.

Neste sentido, os primeiros resultados obtidos com o protocolo da concentração de 15% de frutose, pelo período de oito semanas, não indicaram alterações no aprendizado e memória dos camundongos, tanto machos, quanto fêmeas, nos testes do labirinto em T e reconhecimento de objetos. Com relação ao comportamento emocional, não houveram diferenças nos testes do campo aberto e labirinto em cruz elevado, paradigmas experimentais que permitem uma avaliação do comportamento do tipo ansiogênico ou ansiolítico. Por outro lado, no teste da borrifagem de sacarose, paradigma de avaliação de comportamento anedônico, foram observadas alterações em ambos os gêneros, indicando um comportamento do tipo depressivo induzido pelo consumo crônico de frutose. Ainda, no teste da suspensão pela cauda, também houve alterações, i.e., aumento do tempo de imobilidade, indicando um comportamento do tipo-depressivo induzido pela frutose, embora aqui fora observado apenas no grupo dos camundongos fêmeas.

Steru et al. 1982 e Thierry et al. 1984, inspirados pelo de teste da Porsolt (1981) e baseados em um conceito de "desespero comportamental", desenvolveram o teste de suspensão pela cauda. Do

ponto de vista teórico, este teste apoia a seguinte hipótese: um animal normal submetido a um situação aversiva, alterna entre dois tipos de comportamentos, agitação e imobilidade. Estes podem ser denominados como um comportamento de busca, caracterizado por uma intensa atividade e despesa de energia, e o comportamento de espera com imobilidade e economia de energia. As sequências de escolha entre esses tipos de comportamentos pode ser nomeados como uma estratégia de busca e espera. Esses dados suportam a suposição de que os antidepressivos modificam o equilíbrio entre essas formas de comportamento em favor da busca. Por outro lado, o teste da borrifagem da sacarose foi desenvolvido como um índice de autocuidado e comportamento motivacional, considerado paralelo com alguns sintomas de depressão, como o comportamento anedônico (Willner, 2005). Em modelos animais de depressão, a administração crônica de antidepressivos clássicos aumenta o tempo despendido neste comportamento (Yalcin et al., 2005). Portanto mesmo que ambos os testes avaliem o mesmo tipo de comportamento, os métodos e parâmetros de acessar e quantificar esses comportamentos são característicos de cada paradigma, o que pode identificar diferentes resultados dentro de um mesmo protocolo experimental, tendo como possível justificativa os diferentes mecanismos relacionados a cada padrão de comportamento.

Posteriormente, foram avaliados alguns parâmetros metabólicos nestes animais expostos cronicamente a frutose na concentração de 15%. Neste sentido, não foram observadas diferenças com relação ao ganho de massa corporal e na concentração plasmática de triglicerídeos. Com relação ao ensaio de tolerância à uma sobrecarga de glicose, embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas entre os grupos controle e frutose, em ambos os gêneros, a análise de variância de duas vias indicou um efeito significativo do fator frutose tanto na curva temporal, quanto no somatório dos pontos, demonstrando que houve um efeito da abordagem experimental e que a frutose, na concentração de 15%, já foi capaz de induzir uma resistência às ações da insulina. Por fim, o consumo crônico de frutose, na concentração de 15%, induziu um aumento significativo na concentração de colesterol plasmático apenas em camundongos fêmeas. Traçando um paralelo entre tais observações metabólicas (i.e., aumento do colesterol plasmático) e comportamentais (i.e., comportamento do tipo depressivo), evidências clínicas e pré-clínicas tem associado o aumento na concentração de colesterol plasmático, i.e., hipercolesterolemia, com a patofisiologia de transtornos psiquiátricos, como a depressão. Nesta linha de evidências experimentais, o estudo de Strekalova e colaboradores (2015) demonstrou que

camundongos C57BL/6J expostos durante três semanas a uma dieta com teor aumentado de colesterol (0,2% de colesterol) apresentaram comportamento tipo-depressivo nos testes de suspensão pela cauda e da natação forçada. Por outro lado, quando a dieta com alto teor de colesterol foi descontinuada e a dieta padrão foi reintroduzida por dez dias adicionais, este efeito comportamental desapareceu. Ainda, o estudo de Engel e colaboradores (2016) demonstrou uma correlação significativa entre as concentrações de colesterol plasmático e comportamento tipo-depressivo em camundongos, nos testes de preferência pela sacarose, borrifagem de sacarose e no teste da suspensão pela cauda. Este estudo relacionou tal comportamento do tipo-depressivo associado ao quadro de hipercolesterolemia a um aumento significativo na atividade das enzimas monoamino oxidase A e B, enzimas que metabolizam as monoaminas, observando tal aumento no hipocampo dos camundongos hipercolesterolêmicos, bem como em cultivos neuronais expostos a LDL humana isolada (Engel et al., 2016).

O segundo objetivo do presente estudo foi de analisar as mesmas variáveis supracitadas, só que com o tratamento, pelo mesmo período de tempo, com a concentração de frutose de 30%. A intenção em avaliar duas concentrações diferentes no mesmo estudo foi de analisar e padronizar as alterações metabólicas e comportamentais características de cada protocolo experimental, uma vez que a maioria dos estudos publicados empregaram uma única concentração de frutose, geralmente muito mais alta, não sendo possíveis as comparações dos efeitos dependentes da concentração, pois cada estudo utilizou recursos e métodos diferentes (Reddy et al., 2015; Harrell et al., 2016; Woodie et al., 2017). Como esperado, na concentração de 30% frutose, houve mais alterações nos parâmetros avaliados. Inicialmente, o teste do campo aberto revelou um perfil ansiogênico das fêmeas frutose quando avaliado o parâmetro de porcentagem de cruzamentos centrais, embora não foram visualizadas diferenças com relação à porcentagem de tempo gasto no centro do aparato, bem como nos parâmetros de porcentagem de entradas e de tempo de exploração nos braços abertos do labirinto em cruz elevado.

Bagul e colaboradores, em um estudo empregando ratos mantidos em uma dieta rica em frutose (65%) por oito semanas, mostraram que os animais desenvolveram uma condição pré-diabética ou síndrome metabólica. Esses animais foram então avaliados no teste do campo aberto e foram observadas alterações indicativas de comportamento do tipo ansioso (2012). Bukari e colaboradores também identificaram comportamentos do tipo ansiogênico, em estudo que utilizou o modelo animal para rastrear os efeitos da coocorrência de inflamação decorrente

de uma dieta com alto teor de frutose (60%) durante a gestação. Os resultados indicaram que os comportamentos ansiosos e níveis de citocinas pró-inflamatórias foram afetados em vários estágios do ciclo de vida do roedor. A ansiedade da prole foi alterada durante os períodos juvenis e adultos, como resultado da dieta materna e inflamação neonatal (2018).

Como relação aos testes de aprendizagem e memória, foi observado que o consumo crônico de frutose induziu um prejuízo de aprendizagem de memória espacial no teste do labirinto em T, em ambos os gêneros. Por outro, não foram observadas diferenças de aprendizagem entre os grupos no teste de reconhecimento de objetos, indicando que o consumo de frutose nesta concentração não foi capaz de prejudicar a memória de reconhecimento dos animais. O teste do labirinto em T relaciona-se com a memória espacial e a orientação espacial do animal no aparato, sendo a principal área responsável por essa ação o hipocampo (Shoji et al., 2012). Da mesma forma, o hipocampo é importante para a memória de reconhecimento de objetos e, se houver lesões nessa estrutura, haverá comprometimento moderado e confiável da memória anterógrada. Contudo, a tarefa pode ser adquirida por meio de estratégias alternativas que envolvam outras regiões cerebrais (Broadbent et al. 2010).

Por fim, foi demonstrado, assim como na concentração de 15%, que o consumo crônico de frutose, na concentração de 30%, foi capaz de induzir um comportamento do tipo depressivo em camundongos fêmeas no teste da suspensão pela cauda, bem como em camundongos machos no teste da borrifagem de sacarose. Neste sentido, diversos estudos clínicos sugerem uma associação entre dislipidemias e transtornos psiquiátricos, como ansiedade e depressão (Davison e Kaplan, 2012; Tyrovolas et al., 2009). Especificamente, a hipercolesterolemia também parece estar relacionada com insucesso da terapia antidepressiva: com demora na remissão dos sintomas ou resiliência ao tratamento (Iosifescu et al., 2005; Isingrini et al., 2010). Desta forma, foi realizada a administração de aguda do fármaco antidepressivo fluoxetina, com o intuito de avaliar a possível reversão dos efeitos do tipo depressivo induzidos pela frutose. A fluoxetina já se tornou o antidepressivo prescrito mais eficaz do mundo (Wong et al., 2015), sendo seu mecanismo primário de ação baseado na modulação do sistema monoaminérgico. Neste sentido, foi demonstrado aqui que a administração aguda de fluoxetina foi efetiva em reverter o comportamento do tipo depressivo induzido pela frutose em camundongos machos no teste da borrifagem de sacarose e em camundongos fêmeas no teste da suspensão pela cauda.

Por outro lado, as alterações metabólicas na concentração de 30% foram ainda mais perceptíveis, sendo que os machos e fêmeas tratados cronicamente com frutose apresentaram intolerância à glicose, assim como as concentrações de colesterol e triglicérides aumentaram em ambos os gêneros, inclusive com aumento na variação da massa corporal. Gancheva e colaboradores demonstraram que o consumo de uma dieta rica em gordura, ou frutose, em ratos Wistar, resultou em comportamentos alterados sugerindo níveis elevados de ansiedade e estados de depressão, como evidenciado pelos resultados dos testes do campo aberto, interação social e nado forçado (2017).

A relação entre depressão e alterações metabólicas vem sendo demonstrada na literatura científica. Estudos anteriores confirmaram que o sobrepeso e obesidade são fatores de risco para o desenvolvimento de depressão (Luppino et al., 2010; Pan et al., 2012). Uher et al. descobriram que as medidas contínuas e categóricas de sobrepeso e obesidade predizem piores resultados no tratamento dos antidepressivos (Uher et al., 2009). Outro estudo de Khan et al. também examinou o efeito do gênero e do IMC na resposta antidepressiva (Khan et al., 2007). Eles descobriram que homens obesos não responderam de forma diferente ao placebo, através da pontuação nas escalas de depressão HAMD e MADRS, enquanto as mulheres obesas mostraram resposta ao antidepressivo. As evidências acima sugerem que a questão de gênero precisar ser avaliada para quando se investiga o efeito da obesidade na resposta antidepressiva. As doses de vários inibidores seletivos da recaptção de serotonina usados neste estudo foram encontrados comparáveis entre pacientes obesos e não obesos; entretanto, homens obesos receberam significativamente menos medicação por kg de peso corporal quando comparado aos homens não obesos. Embora as mulheres obesas também receberam significativamente menos droga por kg de peso corporal, quando comparado a mulheres não obesas; no entanto, a obesidade não moderou a resposta ao tratamento nesta subpopulação, porém os níveis séricos dos fármacos não foram medidos. Não obstante, o impacto de doses mais baixas, medidas por mg/kg, é questionável, uma vez que existe um estudo que indica que o IMC não tem influência sobre os níveis séricos de antidepressivos (Unterecker et al., 2011).

Existem diferenças entre processos fisiológicos entre homens e mulheres, sendo que os mecanismos hormonais das mulheres parecem atuar de forma específica em funções diferentes, inclusive na resposta a fármacos e no progresso de patologias, como por exemplo a depressão. Um possível mecanismo envolvido nesse processo é que as mulheres têm níveis mais altos de estrógenos e progesterona circulantes, o que pode

estar relacionado com o papel dos estrogênios na regulação do sistema serotoninérgico, monoaminérgico, citocinas e BDNF (Hughes et al., 2009) e resultar em um melhor efeito dos antidepressivos ISRS (*inibidores seletivos de recaptção de serotonina*) (Bies et al., 2003; Harris et al., 1995; Hudson et al., 1989; Yonkers et al., 1992; Khan et al., 2007), aumentando potencialmente os efeitos destes fármacos. Na falta de tais hormônios circulantes, os homens podem precisar de uma dose maior, especialmente aqueles que são obesos (Khan et al., 2007).

Vários estudos apoiam a associação entre obesidade e a resposta de antidepressivos. Os resultados diferenciais entre esses estudos podem ser explicados por gênero, diferentes parâmetros medidos, diferentes medicações e o número de pacientes obesos comparados para pacientes com IMC normal. Atualmente, o mecanismo explicando a obesidade em relação à resposta antidepressiva não está bem estabelecida, mas um estudo recente mostra que o polimorfismo do gene da leptina está associado com resistência à resposta a vários antidepressivos (Kloiber et al., 2013). A observação precedente sugere que pode haver um caminho genético comum ligando obesidade e depressão. Os sintomas da depressão incluem alterações no aumento ou diminuição do apetite. Consequentemente, pode-se supor que o TDM pode afetar o peso corporal dependendo da alteração de apetite dos pacientes. De fato, o TDM atípico está associado a aumento da incidência de obesidade, aumento da adiposidade e aumento circunferência da cintura (Lasserre et al., 2014).

Contudo, o presente estudo não pode ser caracterizado como modelo de obesidade ou DM2, uma vez que o desenho experimental teve como objetivo caracterizar as alterações metabólicas decorrentes do consumo de crônico de frutose, sendo os resultados relacionados com ambas as condições de forma global. Neste sentido, uma condição relacionada a essa pesquisa é a síndrome metabólica, termo que representa uma situação clínica caracterizada por um agrupamento de fatores de risco para doenças cardiovasculares, entre eles, a hipertensão arterial, a dislipidemia, a obesidade visceral e disfunções endoteliais. Está positivamente associada ao aumento de risco de evento cardiovascular a longo prazo, assim como de desenvolvimento de DM2. A presença de resistência a ação da insulina tem sido considerada um fator fisiopatológico importante (Picon et al., 2006). Alguns critérios são utilizados na prática clínica para o diagnóstico da síndrome, sendo eles, glicemia de jejum, resistência de ação a insulina, pressão arterial, circunferência da cintura e quadril, índice de massa corporal, triglicérides e colesterol (OMS e NCEP-ATP III, 2005). Boa parte de tais análises foram realizadas na presente dissertação, sendo os resultados

dessas alterações mais aparentes na concentração de 30% frutose, devido ao aumento da concentração plasmática de triglicerídeos e colesterol, aumento da variação de massa corporal, bem como intolerância à sobrecarga glicose, sendo que tais alterações metabólicas foram observadas em camundongos machos e fêmeas. Contudo, devido a questão translacional de humanos para animais, não é possível afirmar que a atual pesquisa seja um modelo de síndrome metabólica, assim como não é possível afirmar que os animais estavam obesos ou desenvolveram DM2. Para essa finalidade, análises adicionais seriam necessárias. Em suma, pode-se afirmar que os animais desenvolveram alterações metabólicas, similares a condição de síndrome metabólica.

No presente estudo foi demonstrado um prejuízo cognitivo, avaliado no teste do labirinto em T, em camundongos machos e fêmeas, no protocolo de concentração 30% de frutose. Ambos os grupos tiveram a memória de curto prazo prejudicada nesse paradigma. Neste sentido, a glicose é a principal fonte de energia do cérebro. A hiperglicemia pode causar prejuízos na memória de trabalho e atenção, comprometimento cognitivo e anormalidades na plasticidade sináptica (Biessels et al., 1996; Palleria et al., 2016), assim como, afetar o humor (Sommerfield et al., 2004). Tanto a hiperglicemia crônica quanto as alterações agudas de glicose no sangue parecem ser fatores importantes no desenvolvimento de declínio cognitivo (Strachan et al., 2011). Essas evidências confirmam a hipótese do presente estudo, relacionando o consumo de frutose com alterações na metabolização da glicose e com o declínio cognitivo. Apesar de não ser possível afirmar quais os mecanismos envolvidos no processo, várias evidências vêm sendo publicadas por diversos estudos.

Treviño e colaboradores demonstram que noventa dias de uma dieta hipercalórica alterou os marcadores de energia metabólica e causou prejuízos à memória, avaliado pelo teste de reconhecimento de objetos. Além disso, os animais com síndrome metabólica mostraram diferenças significativas na ordem dendrítica, comprimento dendrítico total e densidade de espinhas dendríticas em CA1, CA3 e giro denteado, da área do hipocampo em comparação com ratos controles. Os animais com síndrome metabólica também diminuíram a imunorreatividade à sinaptofisina no hipocampo em comparação com seus controles (2017). Este poderia ser o resultado de uma alteração na comunicação neuronal, que depende principalmente do metabolismo, particularmente da glicose. Portanto, quando há um desequilíbrio no metabolismo da glicose, os mecanismos de estresse oxidativo e inflamação são ativados promovendo morte celular neuronal por apoptose (Elenkov et al., 2008; Adamopoulos et al., 2016). Ademais, o hipocampo apresenta muitas

conexões aferentes e eferentes dentro do córtex cerebral. Foi demonstrado que as projeções do córtex entorrinal representam o principal caminho de comunicação com o meio do circuito tri-sináptico no hipocampo, que envolve o giro denteado na região CA3. Além disso, as fibras de Schaffer, que se comunicam com os neurônios do região CA1 (Witter, 1988; Nolan et al., 2004) estão envolvidos. Todas estas projeções neurais estão envolvidas no processo de aquisição e armazenamento de informações (Remondes e Schuman, 2002). Portanto, quando há uma deterioração estrutural nessas projeções neuronais, ao nível de processos dendríticos ou espinhos dendríticos, processos cognitivos podem ser afetados progressivamente.

Paralelamente, foi demonstrado que ratos com hiperglicemia induzida por estreptozotocina apresentaram retração dendrítica e redução da densidade da espinha dendrítica nos neurônios do hipocampo (Costa et al., 2011; Xue et al., 2014; Lazcano et al., 2014). A hiperglicemia desencadeia a produção de espécies reativas de oxigênio, produtos de glicação e moléculas pró-inflamatórias, que por sua vez iniciam uma série de eventos neurodegenerativos que juntos afetam processos de plasticidade (Sripetchwandee et al., 2016). Da mesma forma, ratos com síndrome metabólica induzida por consumo crônico de frutose ou dietas ricas em gordura, tiveram alterações eletrofisiológicas e redução da plasticidade sináptica no hipocampo, afetando processos cognitivos apropriados (Cai et al., 2016; Cisternas et al., 2015; Arnold et al., 2014).

Além da hiperglicemia, outro fator bastante associado a essa condição é a resistência à insulina, que foi um resultado apresentado no protocolo de 30%, e um mecanismo altamente estudado na literatura. Spinelli e colaboradores, demonstraram que a resistência à insulina induzida por uma dieta rica em gordura provocou o comprometimento da memória e da formação de LTP, devido ao acúmulo de ácido palmítico e aumento da expressão e ativação de zDHHC3 (*DHHC zinc finger protein*) levando a hiper-palmitoilação de GluA1 no hipocampo. A estimulação in vitro de neurônios do hipocampo com insulina e ácido palmítico reproduzem as alterações da molécula in vivo, afetando o recrutamento de GluA1 para a membrana sináptica, e inibindo as correntes AMPA nas sinapses glutamatérgicas em ambas as condições basais e após os protocolos LTP (2017).

Dietas ricas em frutose são também relacionadas com a dislipidemia. Em um estudo transversal do National Health and Nutrition Examination (NHANES) entre 1999–2006, foi encontrado uma associação entre o consumo de açúcares adicionados na dieta e aumento significativo nas medidas lipídicas nos níveis de triglicérides e reduções

nos níveis de colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL). No presente estudo, fêmeas e machos frutose apresentaram aumento nos níveis de triglicerídeos, e como já dito na introdução, esse mecanismo está relacionado com um aumento representativo da lipogênese de novo, devido ao consumo de frutose (Faeh et al., 2005). Além disso, a obesidade é um importante fator de risco para a hipertensão (Mark et al., 1999). Em humanos, o diagnóstico de hipertensão é generalizado, mas geralmente assintomático; 20-50% da população mundial tem hipertensão e nos Estados Unidos ~30% da população é hipertensa (Hajjar et al., 2006). Além disso, a hipertensão é um importante fator de risco para doença cardiovascular, e.g., acidente vascular cerebral e infarto agudo do miocárdio, e, portanto, há significativa morbidade e mortalidade associadas a esta doença. Como a pressão arterial (PA) está relacionada com o débito cardíaco (DC) e a resistência vascular sistêmica (RVS) pela equação  $PA = DC \times RVS$ , aumentos tanto no DC quanto na RVS devem produzir hipertensão. O controle da pressão arterial é uma resposta integrada que inclui a regulação por receptores neurais, hormônios e balanço hídrico renal (Hajjar et al., 2006). A esse respeito, Hwang et al. relataram inicialmente que a hipertensão poderia ser induzida pela ingestão de uma dieta rica em frutose (1987), e isso foi apoiado por estudos subsequentes que demonstraram uma ligação entre a ingestão dietética de frutose e a elevação da pressão arterial (Dai et al., 1995).

A exposição prolongada à hipertensão ou à hipercolesterolemia leva a alterações na estrutura e função dos vasos sanguíneos (Grange et al., 2010). Enquanto as respostas vasculares variam um pouco entre os dois fatores de risco, uma característica das duas respostas é a disfunção endotelial. Adesão aumentada de leucócitos, formação acelerada de trombo, diminuição da função de barreira endotelial e respostas vasomotoras comprometidas são manifestações comuns da disfunção de células endoteliais induzida por fatores de risco. Embora o (s) mecanismo (s) subjacente (s) a estas alterações vasculares dependentes do endotélio permaneçam pouco compreendidas, evidências apontam para redução da biodisponibilidade de óxido nítrico, secundária à geração aumentada de superóxido, como um componente crítico da disfunção endotelial que acompanha ambas as condições (Forstermann et al., 2006). De fato, a capacidade de dilatação das artérias macroscópicas e microscópicas em resposta à acetilcolina, bradicinina e outros vasodilatadores dependentes do endotélio, como o nitroprussiato de sódio, é significativamente prejudicada em humanos e animais experimentais com hipertensão e dislipidemia. De fato, a maioria das formas de hipertensão resulta, em última análise, de um aumento do tônus vascular que leva a uma

resistência periférica elevada (Wirth et al., 2008). A este respeito, Zemancikoya e Torok (2014) mostraram que os ratos que consumiram frutose (solução a 10% em água potável durante o período de 8 semanas) tiveram um aumento na pressão arterial e diminuição no relaxamento da aorta torácica induzida pela acetilcolina em comparação com ratos controle bebendo apenas água da torneira (2014).

As células endoteliais têm um papel central na homeostase vascular, liberando, entre outros, óxido nítrico (NO) derivado da óxido nítrico sintase (NOS), prostaglandinas, angiotensina e endotelina. A disfunção endotelial é a alteração vascular mais comum observada nas doenças cardiovasculares e metabólicas (Avogaro et al., 2005). Por outro lado, as células musculares lisas proporcionam estrutura da parede do vaso e, por contração e relaxamento, são responsáveis pela regulação do tônus vascular, mantendo a pressão intravascular e a perfusão tecidual. Alterações vasculares estruturais e funcionais devem ocorrer em indivíduos obesos e o aumento de fatores pró-inflamatórios devido ao desenvolvimento da obesidade desempenha um papel importante na disfunção vascular e na doença cardiovascular (Stapleton et al., 2008). A este respeito, a elevação da pressão arterial induzida pela frutose foi encontrada concomitantemente com resistência à insulina, hiperinsulinemia (Verma et al., 1995) e hipertrigliceridemia (Ields et al., 1999). A resistência à insulina e a hiperinsulinemia compensatória podem atuar como fatores predisponentes ao desenvolvimento da hipertensão, possivelmente por meio da ativação do sistema nervoso simpático (SNS) (Reaven et al., 1996).

Constatou-se que a insulina ativa cronicamente o sistema nervoso simpático e causa um aumento do tônus vascular periférico, levando a uma elevação da pressão arterial. Uma consequência é que a ativação do sistema nervoso simpático pode contribuir para a resistência à insulina, causando uma vasoconstrição que leva a uma diminuição do fluxo sanguíneo e, portanto, diminui a entrega de glicose aos tecidos (Rattigan et al., 1999). De fato, disfunção vascular devido a uma dieta rica em frutose tem sido relatada no rato (Verma et al., 1996), e é reconhecido que a disfunção vascular na síndrome metabólica está associada com o aumento da sensibilidade vasoconstritora (Shinozaki et al., 2004) e produção de ânions superóxido vasculares (Shinozaki et al., 2000). Além disso, o relaxamento dependente do endotélio prejudicado foi encontrado após a ingestão crônica de frutose em camundongos (Kamata et al., 2001) e ratos (Verma et al., 1996). Nos estados de resistência à insulina, os efeitos sobre a eNOS e NO foram atenuados, resultando em relaxamento dependente do endotélio prejudicado (Kamata et al., 1999). Em outros

estudos utilizando aorta de ratos alimentados com frutose, o relaxamento dependente do endotélio foi diminuído (Krandji et al., 2011). Assim, um mecanismo vasodilatador dependente do endotélio prejudicado também pode estar envolvido no desenvolvimento da hipertensão neste modelo (Takagawa et al., 2001).

Além disso, indivíduos obesos têm aumento no nível plasmático do componente sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), incluindo renina, angiotensinogênio, angiotensina II (Ang II) e aldosterona (Goodfriend et al., 2004). O RAAS desempenha um papel crítico na elevação da pressão arterial através da regulação da contratilidade vascular e do volume sanguíneo (Gu et al., 2013). O hormônio peptídeo angiotensina II (AngII) desempenha um papel importante na homeostase cardiovascular regulando a descarga do nervo simpático em neurônios do sistema nervoso central e periférico (Allen et al., 2000). As ações de AngII são mediadas pela ativação de dois tipos de receptores de AngII, o AT1R e AT2R (Murphy et al., 1991). Em roedores, dois subtipos altamente homólogos (identidade de aminoácido a 94%) do AT1R, nomeadamente AT1A e AT1B, ocorrem. A ativação do receptor AT1 pela Ang II em músculo liso vascular causa ativação da fosfolipase C levando à geração de trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG), que ativa a liberação de  $Ca^{2+}$  intracelular e a proteína cinase C, respectivamente (Wynne et al., 2009). O aumento na  $[Ca^{2+}]$  ativa a MLCK resultando na fosforilação da MLC e na contração do músculo liso vascular (Wynne et al., 2009).

Muitos estados de doença cardiovascular são caracterizados por um excesso no fluxo simpático. A origem central da excitação simpática é mediada, em parte, pela estimulação dos receptores neuronais da angiotensina II (ANG II) tipo 1 (AT1) (AT1R), além dos altos níveis do peptídeo central da ANG II (Zucker et al., 2009). Por exemplo, há evidências significativas de que as pressões arteriais mais altas observadas no rato espontaneamente hipertenso (SHR), um modelo genético de hipertensão, poderiam estar relacionadas a níveis mais altos de expressão do gene AT1R nos centros vasomotores centrais, causando um aumento no nervo vasomotor simpático (Lenkei et al., 1995). Neste sentido, neste estudo foi demonstrado um aumento significativo na densidade do receptor AT1 no leito mesentérico dos animais tratados cronicamente com frutose. A rede arterial mesentérica, que recebe 25% do débito cardíaco, contribui substancialmente para a resistência periférica total e, conseqüentemente, para a pressão arterial (Christensen et al., 1993). Alterações estruturais e funcionais na função vascular mesentérica contribuem para o processo hipertensivo (Naito et al., 1998).

As principais ações fisiológicas do SRA são mediadas pelo receptor tipo 1 (AT1), e estudos clínicos demonstraram que o bloqueio farmacológico do receptor AT1 reduz efetivamente a pressão arterial e protege contra danos aos órgãos-alvo. Neste sentido, as evidências em nosso estudo sugerem que os receptores AT1 podem desempenhar um papel na fisiopatologia das anormalidades metabólicas e hemodinâmicas induzidas pela alimentação com frutose.

Como conclusão, os presentes achados experimentais indicam que a exposição por um período de oito semanas com a concentração de 15% de frutose, afetou o comportamento emocional, i.e., induziu um comportamento do tipo depressivo em camundongos machos e fêmeas. Ademais, os resultados da concentração de 30% frutose, indicam que ocorreram alterações cognitivas e emocionais, em ambos os gêneros, possivelmente oriundas de alterações metabólicas mais deletérias. De forma global, as mudanças na fisiologia metabólica desses animais, são muito similares a condição de síndrome metabólica e como esperado essas alterações refletiram no comportamento dos mesmos. Como o objetivo do presente estudo era realizar a padronização das possíveis alterações metabólicas e comportamentais induzidas pelo consumo crônico de frutose, bem como efeitos da variação de concentração e possíveis diferenças de susceptibilidade entre gêneros, fica como lacuna a realização de estudos elucidando os mecanismos subjacentes a tais alterações bem como o estudo de métodos de tratamento para a tentativa de reversão de sintomas.



## 6. CONCLUSÕES

- A exposição a uma dieta com a concentração de 15% de frutose pelo período de oito semanas induziu comportamento do tipo anedônico, observado no teste de borrifagem de sacarose, em camundongos Swiss machos e fêmeas;
- O consumo de frutose na concentração de 15% aumentou a concentração de colesterol plasmática em camundongos fêmeas;
- O consumo de frutose na concentração de 30% diminuiu a porcentagem de cruzamentos centrais, no teste do campo aberto, em camundongos fêmeas;
- O consumo de frutose na concentração de 30% causou prejuízo de memória espacial, no teste do labirinto em T, em camundongos machos e fêmeas;
- O consumo de frutose na concentração de 30%, diminuiu o tempo de autolimpeza em camundongos machos, no teste de borrifagem de sacatose, sendo esse comportamento revertido com a administração aguda de fluoxetina;
- O consumo de frutose na concentração de 30%, induziu comportamento do tipo depressivo em camundongos fêmeas, no teste da suspensão pela cauda, sendo esse comportamento revertido com a administração aguda de fluoxetina;
- Camundongos machos e fêmeas, quando expostos a concentração de 30% de frutose, apresentaram intolerância à glicose;
- O consumo de frutose na concentração de 30% aumentou significativamente a concentração de colesterol e triglicérides plasmáticos em camundongos machos e fêmeas.
- O consumo de frutose na concentração de 30% aumentou significativamente a a variação de massa corporal em camundongos machos e fêmeas.
- O consumo de frutose na concentração de 30% aumentou a variação da pressão arterial média em respostas a agentes vasoconstritores e diminuiu tal variação em resposta a agentes vasodiladores. Tal alteração foi relacionada a uma maior densidade do receptor AT1 no leito mesentérico dos animais.



## REFERÊNCIAS

- Adelman RC, Ballard FJ, Weinhouse S. Purification and properties of rat liver fructokinase. **J Biol Chem**, v.242, p.3360, 1967.
- Akar F, Uludag O, Aydin A, Aytekin YA, Elbeg S, Tuzcu M, et al. High-fructose corn syrup causes vascular dysfunction associated with metabolic disturbance in rats: protective effects of resveratrol. **FoodChemToxicol**, v.50, p.2135–41, 2012.
- Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FAO. Localisation and function of angiotensin AT1 receptors. **Am. J. Hypertension**, v. 13 (Suppl). S31–8, 2000.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Arlington, VA: **American Psychiatric Publishing**, 5th ed, 2013.
- Andersen JR, Aasprang A, Bergsholm P, Sletteskog N, Vage V, Natvig GK. Anxiety and depression in association with morbid obesity: changes with improved physical health after duodenal switch. **Health Qual Life Outcomes** v.8, p.52, 2010.
- Astrup, A., Finer, N., 2000. Redefining type 2 diabetes: 'diabesity' or 'obesity dependent diabetes mellitus'? **Obes. Rev.** V.1 (2), p.57–59, 2007.
- Avogaro A., De Kreutzenberg S. V. Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity. **Clinica Chimica Acta**, v.03, p.60(1-2):9–26, 2005.
- Bacchi E, Negri C, Targher G, et al. Both resistance training and aerobic training reduce hepatic fat content in type 2 diabetic subjects with nonalcoholic fatty liver disease (the RAED2 randomized trial). **Hepatology**, v.58, p.1287–1295, 2013.
- Bagul PK, Middela H, Matapally S, Padiya R, Bastia T, Madhusudana K, et al. 2012 Attenuation of insulin resistance, metabolic syndrome and hepatic oxidative stress by resveratrol in fructosefed rats. **Pharmacol. Res.** 66 260–268, 2012.
- Bantle JP, Laine DC, Thomas JW. Metabolic effects of dietary fructose and sucrose in types I and II diabetic subjects. **JAMA**, v.256, p.3241–3246, 1986.
- Bantle, J. P. Dietary Fructose and Metabolic Syndrome and Diabetes.

**Journal of Nutrition**, v.139, p.1263S–1268S, 2009.

Basu S, McKee M, Galea G, Stuckler D. Relationship of soft drink consumption to global overweight, obesity, and diabetes: a cross-national analysis of 75 countries. **Am J Public Health**, v.103, p.2071-7, 2013.

Baxter MG. "I've seen it all before": explaining age-related impairments in object recognition. Theoretical comment on Burke et al. **Behav Neurosci**, v.124, p.706-9, 2010.

Baynes JW, Dominiczak MH. **Bioquímica Médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

Bergheim I, Weber S, Vos M, Kramer S, Volynets V, Kaserouni S, McClain CJ, Bischoff SC. Antibiotics protect against fructose induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. **J Hepatol** v.48, p.983–992, 2008.

Bidwell AJ. Chronic Fructose Ingestion as a Major Health Concern: Is a Sedentary Lifestyle Making It Worse? **A Review. Nutrients**, v.9, p.6, 2017.

Bornstein SR, Schuppenies A, Wong ML, Licinio J. Approaching the shared biology of obesity and depression: the stress axis as the locus of gene-environment interactions. **Mol Psychiatry**, v.11, p. 892—902, 2006.

Boucher J, Charalambous M, Zarse K, Mori MA, Kleinridders A, Ristow M, et al. Insulin and insulin-like growth factor 1 receptors are required for normal expression of imprinted genes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.111, p.14512-7, 2014.

Bray GA, Popkin BM. Sugar consumption by Americans and obesity are both too high--are they connected? Response to letter by John White, PhD. **Pediatr Obes**, v.9, p.78-9, 2014.

Brenes JC, Fornaguera J. Effects of environmental enrichment and social isolation on sucrose consumption and preference: associations with depressive-like behavior and ventral striatum dopamine. **Neurosci Lett**, v.436, p.278-82, 2008.

Broadbent NJ, Gaskin S, Squire LR, Clark RE. Object recognition memory and the rodent hippocampus. **Learn Mem**, v.17, p.5–11, 2010.

Brouns, F. WHO Guideline: “Sugars intake for adults and children”

raises some question marks. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v.26(4),p.34–36, 2015.

Buckmaster CA, Eichenbaum H, Amaral DG, Suzuki WA, Rapp PR. Entorhinal cortex lesions disrupt the relational organization of memory in monkeys. **J Neurosci**, v.24(44), p.9811-25, 2004.

Bukhari, S. H. F., Clark, O. E., & Williamson, L. L. Maternal high fructose diet and neonatal immune challenge alter offspring anxiety-like behavior and inflammation across the lifespan. **Life Sciences**, 197, 114–121, 2018.

Burgmer R, Legenbauer T, Muller A, de Zwaan M, Fischer C, Herpertz S. Psychological outcome 4 years after restrictive bariatric surgery. **Obes Surg**, v.24, p.1670–8, 2014.

Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmee E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrieres J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v.56, p.1761–1772, 2007.

Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. **Diabetes**, v.57, p.1470–1481, 2008.

Carmona A, Freedland RA. Comparison among the lipogenic potential of various substrates in rat hepatocytes: the differential effects of fructose-containing diets on hepatic lipogenesis. **J Nutr**, v.119(9), p.1304-10, 1989.

Castellano C, Moreno DI, Garcia FJ, Alcaide J, Santos M, I., Ocana, L, Cardona, F. Adipose tissue LPL methylation is associated with triglyceride concentrations in the metabolic syndrome. **Clinical Chemistry**, v.64(1), p. 210–218, 2018.

Cervieri Júnior, O., Teixeira Junior, J. R., Galinari, R., Rawet, E. L., & Silveira, C. T. J. O Setor de Bebidas no Brasil. **Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico E Social**, v.40, p. 93–129, 2014.

Chang SH, Stoll CR, Song J, Varela JE, Eagon CJ, Colditz GA. The effectiveness and risks of bariatric surgery: an updated systematic review and meta-analysis, 2003—2012. **JAMA Surg**, v.149, p.275—87,

2014.

Cheeseman CI. GLUT2 is the transporter for fructose across the rat intestinal basolateral membrane. **Gastroenterology**, v.105(4), p.1050-6, 1993.

Choi HK, Curhan G. Soft drinks, fructose consumption, and the risk of gout in men: prospective cohort study. **BMJ** v.336, p.309–312, 2008.

Choi JW, Ford ES, Gao X, Choi HK. Sugar-sweetened soft drinks, diet soft drinks, and serum uric acid level: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Arthritis Rheum**, v. 59, p.109–116, 2008.

Chong MF, Fielding BA, Frayn KN. Mechanisms for the acute effect of fructose on postprandial lipemia. **Am J Clin Nutr**, v.85, p.1511–1520, 2007.

Christensen KL, Mulvany MJ. Mesenteric arcade arteries contribute substantially to vascular resistance in conscious rats. **J Vasc Res**, v.30, p.73–9, 1993.

Clark RE, Zola SM, Squire LR. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. **J Neurosci**, v.20(23), p.8853-60, 2000.

Clarke DM, Currie KC. Depression, anxiety and their relationship with chronic diseases: a review of the epidemiology, risk and treatment evidence. **Med J Aust**, v.190, p.54–65, 2009.

Colla M, Kronenberg G, Deuschle M, Meichel K, Hagen T, Bohrer M, et al. Hippocampal volume reduction and HPA-system activity in major depression. **J Psychiatr Res**, v.41(7), p.553–60, 2007.

Convit A. Links between cognitive impairment in insulin resistance: an explanatory model. **Neurobiol Aging**, v.26, p.31-5, 2005.

Corpe CP, Burant CF, Hoekstra JH. Intestinal fructose absorption: clinical and molecular aspects. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.28(4), p.364-74, 1999.

Costa, A.V., Calábria, L.K., Nascimento, R., Carvalho, W.J., Goulart, L.R., Espindola, F.S. The streptozotocin-induced rat model of diabetes mellitus evidences significant reduction of myosin-Va expression in the brain. **Metab. Brain. Dis.** v.26(4), p.247-251, 2011.

Costello DA, Claret M, Al-Qassab H, Plattner F, Irvine EE, Choudhury

AI, et al. Brain deletion of insulin receptor substrate 2 disrupts hippocampal synaptic plasticity and metaplasticity. **PLoS One**, v.7(2), p.31124, 2012.

Crapo PA, Kolterman OG. The metabolic effects of 2-week fructose feeding in normal subjects. **Am J Clin Nutr**, v.39, p. 525–534, 1984.

Dai S, McNeill JH. Fructose-induced hypertension in rats is concentration- and duration-dependent. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v.33(2), p.101–107, 1995.

Davison Km, kaplan bj. Food intake and blood cholesterol levels of community-based adults with mood disorders. **BMC Psychiatry**, v.12, p.10, 2012.

De Felice, F. G., & Benedict, C. A Key Role of Insulin Receptors in Memory: Figure 1. **Diabetes**, v 64(11), p. 3653–3655, 2015.

de Oliveira J, Moreira EL, dos Santos DB, Piermartiri TC, Dutra RC, Pinton S, et al. Increased susceptibility to amyloid- $\beta$ -induced neurotoxicity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. **J Alzheimers Dis**, p.41(1), v.43-60, 2014.

de Wit L, Luppino F, van Straten A, Penninx B, Zitman F, Cuijpers P. Depression and obesity: a meta-analysis of community-based studies. **Psychiatry Res**, v.178, p.230—5, 2010.

Dekker MJ, Su Q, Baker C, Rutledge AC, Adeli K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.299(5), p.685-94, 2010.

Dhingra R, Sullivan L, Jacques PF, Wang TJ, Fox CS, Meigs JB, et al. Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community. **Circulation**, v.116(5), p.480-8, 2007.

Dou JT, Chen M, Dufour F, Alkon DL, Zhao WQ. Insulin receptor signaling in long-term memory consolidation following spatial learning. **Learn Mem**, v.12(6), p.646-55, 2005.

Douard V, Ferraris RP. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.295, p.227–37, 2008.

Duffey KJ, Popkin BM. High-fructose corn syrup: is this what's for

dinner? **Am J Clin Nutr**, v.88(6), p.1722S-32S, 2008.

Elenkov, I.J. Neurohormonal-cytokine interactions: implications for inflammation, common human diseases and well-being. **Neurochem Int**, p.52, v.40-51, 2008.

Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. **Am J Clin Nutr**, v.76(5), p.911-22, 2002.

Emery CF, Fondow MD, Schneider CM, Christofi FL, Hunt C, Busby AK, et al. Gastric bypass surgery is associated with reduced inflammation and less depression: a preliminary investigation. **Obes Surg**, v.17, p.759—63, 2007.

Engel, D. F., de Oliveira, J., Lopes, J. B., Santos, D. B., Moreira, E. L. G., Farina, M., de Bem, A. F. Is there an association between hypercholesterolemia and depression? Behavioral evidence from the LDLr  $-/-$  mouse experimental model. **Behavioural Brain Research**, v.311, p.31–38, 2016.

Faeh D, Minehira K, Schwarz J, Periasami R, Seongus P, Tappy L. Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy males. **Diabetes**, v.54, p.1907–1913, 2005.

Faeh D, Minehira K, Schwarz JM, Periasamy R, Periasami R, Park S, et al. Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. **Diabetes**, p.54(7), v.1907-13, 2005.

Faulconbridge LF, Wadden TA, Thomas JG, Jones-Corneille LR, Sarwer DB, Fabricatore AN. Changes in depression and quality of life in obese individuals with binge eating disorder: bariatric surgery versus lifestyle modification. **Surg Obes Relat Dis**, v.9, p.790—6, 2013.

Fernández-Teruel A, Giménez-Llort L, Escorihuela RM, Gil L, Aguilar R, Steimer T, et al. Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? **Pharmacol Biochem Behav**, v.73(1), p.233-45, 2002.

Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: From marvel to menace. **Circulation**, v.113, p.1708–1714, 2006.

Gancheva, S., Galunska, B., & Zhelyazkova-Savova, M. Diets rich in

saturated fat and fructose induce anxiety and depression-like behaviours in the rat: is there a role for lipid peroxidation? **International Journal of Experimental Pathology**, v.98, p.296–306, 2017.

Gohlke P, Ganten D, Lang RE, Unger T. The renin-angiotensin system: systemic and local function. **Z Kardiol**, v. 77, p.Suppl 3: 1–12, 1988

Goodfriend TL, Calhoun DA. Resistant hypertension, obesity, sleep apnea, and aldosterone: theory and therapy. **Hypertension**, v.43, p.518–524, 2004.

Granger DN, Rodrigues SF, Yildirim A, Senchenkova EY. Microvascular responses to cardiovascular risk factors. **Microcirculation**, v.17, p.192–205, 2010.

Grillo CA, Piroli GG, Lawrence RC, et al. Hippocampal insulin resistance impairs spatial learning and synaptic plasticity. **Diabetes**, v.64, p.3927–3936, 2015.

Grimble RF. Inflammatory status and insulin resistance. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.5, p.551–559, 2002.

Gu P, Xu A. Interplay between adipose tissue and blood vessels in obesity and vascular dysfunction. **Rev Endocr Metab Disord**, v.14, p.49–58, 2013.

Hajjar I, Kotchen JM, Kotchen TA. Hypertension: trends in prevalence, incidence, and control. **Annu Rev Public Health** v.27, p.465–490, 2006.

Hallfrisch J, Ellwood KC, Michaelis OEt Reiser S, O’Dorisio TM, Prather ES. Effects of dietary fructose on plasma glucose and hormone responses in normal and hyperinsulinemic men. **J Nutr**, v.113, p.1819–1826, 1983.

Heinz F, Lamprecht W, Kirsch J. Enzymes of fructose metabolism in human liver. **J Clin Invest**, v.47(8), p.1826-32, 1968.

Hipertensão, S. B. de, Cardiologia, S. B. de, Metabologia, S. B. de E. e, Diabetes, S. B. de, & Obesidade, S. B. de E. da. I Brazilian guidelines on diagnosis and treatment of metabolic syndrome. **Arq Bras Cardiol**, v. 84 *Suppl 1*, p.1–28, 2005.

Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. **Pharmacoeconomics**, v.33(7), p.673-89, 2015.

Hryhorczuk C, Sharma S, Fulton SE. Metabolic disturbances connecting

obesity and depression. **Front Neurosci**, v.7, p.177, 2013.

Hsu TM, Konanur VR, Taing L, Usui R, Kayser BD, Goran MI, et al. Effects of sucrose and high fructose corn syrup consumption on spatial memory function and hippocampal neuroinflammation in adolescent rats. **Hippocampus**, v.25(2), p.227-39, 2015.

Hughes ZA, Liu F, Marquis K, Muniz L, Pangalos MN, Ring RH, et al. Estrogen receptor neurobiology and its potential for translation into broad spectrum therapeutics for CNS disorders. **Curr Mol Pharmacol**. Nov; v.2(3), p.215-36, 2009.

Hunot V, Moore T, Caldwell D *et al.* Interpersonal, cognitive analytic and other integrative therapies versus other psychological therapies for depression (Protocol). **Cochrane Libr**, v.1. p.1-18, 2010.

Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, Reaven GM. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. **Hypertension**, v.10(5), p.512–516, 1987.

Ields M, Lewis CG. Dietary fructose but not starch is responsible for hyperlipidemia associated with copper deficiency in rats: effect of high-fat diet. **Journal of the American College of Nutrition**, v.18(1), p.83–87, 1999.

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas 7th edition. **IDF Diabetes ATLAS**, 2015.

Iosifescu DV. Cardiovascular risk factors may moderate pharmacological treatment effects in major depressive disorder. **Psychosom. Med**, v.67, p.703–706, 2005.

Isingrini E, Camus V, Le Guisquet AM, Pingaud M, Devers S, Belzung C. Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. **PLoS ONE**, v.5, p.10404, 2010.

Izquierdo I, Furini CR, Myskiw JC. Fear Memory. **Physiol Rev**, v.96(2), p.695-750, 2016.

Jacka FN, Pasco JA, Mykletun A, Williams LJ, Hodge AM, O'Reilly SL, et al. Association of Western and traditional diets with depression and anxiety in women. **Am J Psychiatr**, v.167, p.305-11, 2010.

Jacobson L, Sapolsky R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. **Endocr**

**Rev**, v.12(2), p.118–34, 1991.

Jantaratnotai, N., Mosikanon, K., Lee, Y., & McIntyre, R. S. The interface of depression and obesity. **Obesity Research & Clinical Practice**, v.11(1), p.1–10, 2017.

Jin R, Welsh JA, Le NA, Holzberg J, Sharma P, Martin DR, et al. Dietary fructose reduction improves markers of cardiovascular disease risk in Hispanic-American adolescents with NAFLD. **Nutrients**, v.6(8), p.3187-201, 2014.

Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang DH, et al. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. **Am J Clin Nutr**, v.6(4), p.899-906, 2007.

Kamata K, Kanie N, Inose A. Mechanisms underlying attenuated contractile response of aortic rings to noradrenaline in fructose-fed mice. **European Journal of Pharmacology**, v.428(2), p.241–24, 2001.

Kamata K, Yamashita K. Insulin resistance and impaired endothelium-dependent renal vasodilatation in fructose-fed hypertensive rats. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, v.103(2), p.195–210, 1999.

Kazumi T, Vranic M, Steiner G. Triglyceride kinetics: effects of dietary glucose, sucrose, or fructose alone or with hyperinsulinemia. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 250, p.E325–E330, 1986.

Khan A, Schwartz KA, Kolts RL, Brown WA. BMI, sex, and antidepressant response. **J Affect Disord**, v.99, p.101–6, 2007.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother*. 2010;1(2):94-9.

Kloiber S, Ripke S, Kohli MA, Reppermund S, Salyakina D, Uher R, et al. Resistance to antidepressant treatment is associated with polymorphisms in the leptin gene, decreased leptin mRNA expression, and decreased leptin serum levels. **Eur Neuropsychopharmacol**, v.23, p.653–62, 2013.

Korandji C, Zeller M, Guillard JC, et al. Time course of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and oxidative stress in fructose-hypertensive rats: a model related to metabolic syndrome. **Atherosclerosis**, v.214(2), p.310–315, 2011.

Kränkel, N., Bahls, M., Van Craenenbroeck, E. M., Adams, V., Serratos, L., Solberg, E, Kemps, H. Exercise training to reduce cardiovascular risk in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus: How does it work? **European Journal of Preventive Cardiology**, 2018.

Lakhan SE, Kirchgessner A. The emerging role of dietary fructose in obesity and cognitive decline. **Nutr J**, v.12, p.114, 2013.

Larsson F, Winblad B, Mohammed AH. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v.73(1), p.193-207, 2002.

Lasserre AM, Glaus J, Vandeleur CL, Marques-Vidal P, Vaucher J, Bastardot F, et al. Depression with atypical features and increase in obesity, body mass index, waist circumference, and fat mass: a prospective, population-based study. **JAMA Psychiatry**, v.71, p.880—8, 2014.

Lazcano, Z., Solis, O., Díaz, A., Brambila, E., Aguilar-Alonso, P., Guevara, J., Flores, G. Dendritic morphology changes in neurons from the ventral hippocampus, amygdala and nucleus accumbens in rats with neonatal lesions into the prefrontal cortex. **Synapse**. v.69(6), p.314-325, 2015.

Lê KA, Faeh D, Stettler R, Ith M, Kreis R, Vermathen P, et al. A 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. **Am J Clin Nutr**, v.84(6), p.1374-9, 2006.

Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P, et al. Object recognition test in mice. **Nat Protoc**, v.8(12), p.2531-7. 2013.

Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortes C. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: A functional neuroanatomical review. **Front. Neuroendocrinol**, v.18, p.383–439, 1997.

Li, W., Huang, E. An update on type 2 diabetes mellitus as a risk factor for dementia. **J Alzheimer's Disease**, v.53, p.393–402, 2016.

Lier HO, Biringer E, Stubhaug B, Tangen T. Prevalence of psychiatric disorders before and 1 year after bariatric surgery: the role of shame in maintenance of psychiatric disorders in patients undergoing bariatric

surgery. **Nord J Psychiatry**, v.67, p.89-96, 2013.

Lindqvista, Baelemans A, Erlanson-Albertsson C. Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. **RegulPept**, v.150, p.26–32, 2008.

Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v.92(2), p.180-5, 1987.

Liu J, Grundy SM, Wang W, Smith SC Jr, Vega GL, Wu Z, Zeng Z, Wang W, Zhao D. Ethnic-specific criteria for the metabolic syndrome: evidence from China. **Diabetes Care**, v.29, p.1414–1416, 2006.

Lowette K, Roosen L, Tack J, Vanden Berghe P. Effects of high-fructose diets on central appetite signaling and cognitive function. **Front Nutr**, v. 2:5, 2015.

Lozada, L. G. S. The effect of two energy-restricted diets, a low-fructose diet versus a moderate natural fructose diet, on weight loss and metabolic syndrome parameters: A randomized controlled trial. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v.60(11), p.1551–1559, 2011.

Ludka, F. K., Dal-Cim, T., Binder, L. B., Constantino, L. C., Massari, C., & Tasca, C. I. Atorvastatin and Fluoxetine Prevent Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction Evoked by Glutamate Toxicity in Hippocampal Slices. **Molecular Neurobiology**, v.54, 2016.

Luppino FS, de Wit LM, Bouvy PF, Stijnen T, Cuijpers P, Penninx BW, et al. Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. **Arch Gen Psychiatry**, v.67, p.220-9, 2010.

Madero, M., Arriaga, J. C., Jalal, D., Rivard, C., McFann, K., Pérez-Méndez, O.,

Mark AL, Correia M, Morgan DA, Shaffer RA, Haynes WG. State-of-the-art-lecture: Obesity-induced hypertension: new concepts from the emerging biology of obesity. **Hypertension**, v.33, p.537–541, 1999.

Martinez FJ, Rizza RA, Romero JC. High-fructose feeding elicits insulin resistance, hyperinsulinism, and hypertension in normal mongreldogs. **Hypertension**, v. 23, p.456–63, 1994.

Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Tomita S, Sekiya M, Hasty A,

Nakagawa Y, Sone H, Toyoshima H, Ishibashi S, Osuga J, Yamada N. Insulin-independent induction of sterol regulatory element-binding protein-1c expression in the livers of streptozotocin-treated mice. *Diabetes* 53: 560–569, 2004.

Mayes PA. Intermediary metabolism of fructose. **Am J Clin Nutr**, v.58(5 Suppl), p.754S-65S, 1993.

McIntyre RS, Konarski JZ, Wilkins K, Soczynska JK, Kennedy SH. Obesity in bipolar disorder and major depressive disorder: results from a national community health survey on mental health and well-being. **Can J Psychiatry**, p.51, p.274-80, 2006.

Messier C. Impact of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes on cognitive aging. **Neurobiol Aging**, v.26 Suppl p.1:26-30, 2005.

Mitchell JE, King WC, Chen JY, Devlin MJ, Flum D, Garcia L, et al. Course of depressive symptoms and treatment in the longitudinal assessment of bariatric surgery (LABS-2) study. **Obesity (Silver Spring)**, v.22, p.1799-806, 2014.

Monteiro, C. A., Moubarac, J. C., Cannon, G., Ng, S. W., & Popkin, B. Ultra-processed products are becoming dominant in the global food system. **Obesity Reviews**, 2013.

Moosavi M, Naghdi N, Maghsoudi N, Zahedi Asl S. Insulin protects against stress-induced impairments in water maze performance. **Behav Brain Res**, v.176(2), p.230-6, 2007.

Moosavi M, Naghdi N, Maghsoudi N, Zahedi Asl S. The effect of intrahippocampal insulin microinjection on spatial learning and memory. **Horm Behav**, v.50(5), p.748-52, 2006.

Moretti, M. et al. Effects of Agmatine on Depressive-Like Behavior Induced by Intracerebroventricular Administration of 1- Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+). **Neurotoxicity Research**, v. 28, n. 3, p. 222–231, 2015

Moussavi S, Chatterji S, Verdes E, Tandon A, Patel V, Ustun B. Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys. **Lancet**. v.370, p.851–858, 2007.

Muhlans B, Horbach T, de Zwaan M. Psychiatric disorders in bariatric surgery candidates: a review of the literature and results of a German prebariatric surgery sample. **Gen Hosp Psychiatry**, v.31, p.414—21, 2009.

Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. **Nature**, v.351, p.233–6, 1991.

Nadeau K, Dabelea D. Epidemiology of type 2 diabetes in children and adolescents. **Endocr Res**, v.33, p. 35-58, 2008.

Naito Y, Yoshida H, Konishi C, Ohara N. Differences in responses to norepinephrine and adenosine triphosphate in isolated perfused mesenteric vascular beds between normotensive and spontaneously hypertensive rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v.32, p.807–818, 1998.

Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v.384, p.766-81, 2014.

Ng SW, Slining MM, Popkin BM. Use of caloric and noncaloric sweeteners in US consumer packaged foods, 2005-2009. **J Acad Nutr Diet**, v.112(11), p.1828-34, 2012.

Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nat Rev Neurosci**, v.7(9), p.697-709, 2006.

Nolan, M.F., Malleret, G., Dudman, J.T., Buhl, DL, Santoro, B., Gibbs, E., Vronskaya, S., Buzsáki, G., Siegelbaum, S.A., Kandel, E.R., Morozov, A. A behavioral role for dendritic integration: HCN1 channels constrain spatial memory and plasticity at inputs to distal dendrites of CA1 pyramidal neurons. **Cell**, v. 119(5), p.719-732, 2004.

Palanza P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? **Neurosci Biobehav Rev**, v.25, p.219-233, 2001.

Pan A, Sun Q, Czernichow S, Kivimaki M, Okereke OI, Lucas M, et al. Bidirectional association between depression and obesity in middle-aged and older women. **Int J Obes (Lond)**, v.36, p.595—602, 2012.

Pariante CM, Lightman SL. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. **Trends Neurosci**, v.31(9), p.464–8, 2008.

Park CR. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. **Neurosci Biobehav Rev**, v.25(4), p.311-23, 2001.

Parks EJ, Skokan LE, Timlin MT, Dingfelder CS. Dietary sugars

stimulate fatty acid synthesis in adults. **J Nutr**, v.138, p.1039–1046, 2008.

Pektas MB, Koca HB, Sadi G, Akar F. Dietary Fructose Activates Insulin Signaling and Inflammation in Adipose Tissue: Modulatory Role of Resveratrol. **Biomed Res Int**, v.8014252, 2016.

Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. - Rio de Janeiro: **IBGE**, p.150, 2011.

Pinheiro AR, Freitas SF, Titonni AC. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 523-533, Dec. 2004.

Porsolt RD. Behavioral despair. In: Enna SJ, Malick JB, Richelson E (eds) *Antidepressants: Neurochemical, behavioral and clinical perspectives*. Raven Press, New York, pp 121–139, 1981.

Rafati A, Anvari E, Noorafshan A. High fructose solution induces neuronal loss in the nucleus of the solitary tract of rats. **Folia Neuropathol**, v.51(3), p.214-21, 2013.

Rattigan S, Clark MG, Barrett EJ. Acute vasoconstriction-induced insulin resistance in rat muscle in vivo. **Diabetes**, v.48(3), p.564–569, 1999.

Reaven GM, Lithell H, Landsberg L. Hypertension and associated metabolic abnormalities—the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system. **New England Journal of Medicine**, v.334(6), p.374–381, 1996.

Reddy, B. R., Maitra, S., Jhelum, P., Kumar, K. P., Bagul, P. K., Kaur, G., Chakravarty, S. Sirtuin 1 and 7 mediate resveratrol-induced recovery from hyper-anxiety in high-fructose-fed prediabetic rats. **Journal of Biosciences**, v.41(3), p.407–417, 2016.

Reiser S. Effect of dietary sugars on metabolic risk factors associated with heart disease. **Nutr Health**, v.3, p.203–216, 1985.

Remondes, M., Schuman, E.M. Role for a cortical input to hippocampal area CA1 in the consolidation of a long-term memory. **Nature**, v.431(7009), p.699- 70, 2004.

Richardson, V.R., Smith, K.A., Carter, A.M. Adipose tissue inflammation: feeding the development of type 2 diabetes mellitus. **Immunobiology**, v. 218, 2013.

- Ross AP, Bartness TJ, Mielke JG, Parent MB. A high fructose diet impairs spatial memory in male rats. **Neurobiol Learn Mem**, v.92(3), p.410-6, 2009.
- Ross AP, Bruggeman EC, Kasumu AW, Mielke JG, Parent MB. Non-alcoholic fatty liver disease impairs hippocampal-dependent memory in male rats. **Physiol Behav**, v.106(2), p.133-41, 2012.
- Rutledge AC, Adeli K. Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms. **Nutr Rev**, v.65, p. S13-23, 2007.
- Saad MF, Khan A, Sharma A, Michael R, Riad-Gabriel MG, Boyadjian R, Jinagouda SD, Steil GM, Kamdar V. Physiological insulinemia acutely modulates plasma leptin. **Diabetes**, v.47, p.544-9, 1998.
- Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. **J Biol Chem**, v. 274, p.30028-30032, 1999.
- Shinozaki K, Ayajiki K, Nishio Y, Sugaya T, Kashiwagi A, Okamura T. Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in vascular dysfunction associated with insulin resistance. **Hypertension**, v.43(2), p.255-262, 2004.
- Shinozaki K, Nishio Y, Okamura T, et al. Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats. **Circulation Research**, v.87(7), p.566-573, 2000.
- Shoji, H., Hagihara, H., Takao, K., Hattori, S., Miyakawa, T. T-maze Forced Alternation and Left-right Discrimination Tasks for Assessing Working and Reference Memory in Mice. **J. Vis. Exp.** v60, 2012.
- Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. **J Clin Invest**, v.106, p.171-176, 2000.
- Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and Impact and Treatment of Depression in Type 2 Diabetes 585 depressive behaviour. **Nature**, v.476, p.458-61, 2011.
- Spinelli, M., Fusco, S., Mainardi, M., Scala, F., Natale, F., Lapenta, R., Grassi, C. Brain insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and memory by increasing GluA1 palmitoylation through FoxO3a. **Nature Communications**, v.8, 2017.

Spowart-Manning L, van der Staay FJ. The T-maze continuous alternation task for assessing the effects of putative cognition enhancers in the mouse. **Behav Brain Res**, v.151(1-2), p.37-46, 2004.

Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, Hatcher B, Cox CL, Dyachenko A, Zhang W, McGahan JP, Seibert A, Krauss RM, Chiu S, Schaefer EJ, Ai M, Otokozawa S, Nakajima K, Nakano T, Beyesen C, Hellerstein MK, Berglund L, Havel PJ.

Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. **J Clin Invest**, v.119, p.1322-1334, 2009.

Stapleton P. A., James M. E., Goodwill A. G., Frisbee J. C. Obesity and vascular dysfunction. **Pathophysiology**, v.15(2), p.79-89, 2008.

Stéru L, Thierry B, Chermat R, Simon P. Animal modeling of depression: an ethological approach and its relevance to psychopharmacology. Presented at the 13th CINP Congress, Jerusalem, Israel, June 20-25, 1982.

Strachan, M.W., Reynolds, R.M., Marioni, R.E., Price, J.F. Cognitive function, dementia and type 2 diabetes mellitus in the elderly. **Nat. Rev. Endocrinol**, v.7, p.108-114, 2011.

Strekalova, T., Evans, M., Costa-Nunes, J., Bachurin, S., Yeritsyan, N., Couch, Y., Anthony, D. C. Tlr4 upregulation in the brain accompanies depression- and anxiety-like behaviors induced by a high-cholesterol diet. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.48, p.42-47, 2015.

Takagawa Y, Berger ME, Hori MT, Tuck ML, Golub MS. Long-term fructose feeding impairs vascular relaxation in rat mesenteric arteries. **American Journal of Hypertension**, v.14(8), p811-817, 2001.

Tappy L, Lê KA. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. **Physiol Rev**, v.90(1), p.23-46, 2010.

Taylor EN, Curhan GC. Fructose consumption and the risk of kidney stones. **Kidney Int** v.73, p.207-212, 2008.

Teff KL, Elliott SS, Tschop M, Kieffer TJ, Rader D, Heiman M, Townsend RR, Keim NL, D'Alessio D, Havel PJ. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. **J Clin Endocrinol Metab**, v.89, p.2963-72, 2004.

Thierry B, Stéru L, Chermat R, Simon P. Searching-Waiting strategy:

a candidate for an evolutionary model of depression? *Behav Neural Biol* 41:180–189, 1984.

Thuy S, Ladurner R, Volynets V, Wagner S, Strahl S, Konigsrainer A, Maier KP, Bischoff SC, Bergheim I. Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. **J Nutr**, v.138, p.1452–1455, 2008.

Tokutake, T., Kasuga, K., Yajima, R., Sekine, Y., Tezuka, T., Nishizawa, M., Ikeuchi, T. Hyperphosphorylation of Tau induced by naturally secreted amyloid-beta at nanomolar concentrations is modulated by insulin-dependent Akt-GSK3beta signaling pathway. **J. Biol. Chem**, v.2870, p .35222–35233, 2012.

Toop CR, Gentili S. Fructose Beverage Consumption Induces a Metabolic Syndrome Phenotype in the Rat: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Nutrients**, v.8(9), 2016.

Treviño, S., Vázquez-Roque, R. A., López-López, G., Perez-Cruz, C., Moran, C., Handal-Silva, A, Díaz, A. Metabolic syndrome causes recognition impairments and reduced hippocampal neuronal plasticity in rats. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v.82, p.65–75, 2017.

Tyrovolas S et al. Increased body mass and depressive symptomatology are associated with hypercholesterolemia, among elderly individuals; results from the MEDIS study. **Lipids Health Dis**. v.8, p.10, 2009.

Uher R, Mors O, Hauser J, Rietschel M, Maier W, Kozel D, et al. Body weight as a predictor of antidepressant efficacy in the GENDEP project. **J Affect Disord**, v.118, p.147–54, 2009.

Unterecker S, Deckert J, Pfulmann B. No influence of body weight on serum levels of antidepressants. **Ther Drug Monit**, v.33, p.730-4, 2011.

Verma S, Bhanot S, McNeill JH. Effect of chronic endothelin blockade in hyperinsulinemic hypertensive rats. **American Journal of Physiology**, v.269(6), p.H2017–H2021, 1995.

Verma S, Bhanot S, Yao L, McNeill JH. Defective endothelium-dependent relaxation in fructose-hypertensive rats. **American Journal of Hypertension**, v.9(4), p.370–376, 1996.

Vogelzangs N, Suthers K, Ferrucci L, Simonsick EM, Ble A, Schragger M, et al. Hypercortisolemic depression is associated with the metabolic syndrome in late-life. **Psychoneuroendocrinology**, v.32(2), p.151–9,

2007.

Vos MB, Kimmons JE, Gillespie C, Welsh J, Blanck HM. Dietary fructose consumption among US children and adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Medscape J Med**, v.10(7), p.160, 2008.

Vvan der Borgh K, Köhnke R, Göransson N, Deierborg T, Brundin P, Erlanson-Albertsson C, et al. Reduced neurogenesis in the rat hippocampus following high fructose consumption. **Regul Pept**, v.167(1), p.26-30, 2011.

Vvan Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. **Nat Rev Neurosci**, v.1(3), p.191-8, 2000.

Walker RW, Dumke KA, Goran MI. Fructose content in popular beverages made with and without thigh-fructose corn syrup. **Nutrition**, v.30, p.928–35, 2014.

Weber B, Schweiger U, Deuschle M, Heuser I. Major depression and impaired glucose tolerance. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v.108(3), p.87–90, 2000.

Weng TT, Hao JH, Qian QW, Cao H, Fu JL, Sun Y, et al. Is there any relationship between dietary patterns and depression and anxiety in Chinese adolescents? **Publ Health Nutr**, v.15, p.673- 82, 2012.

White JS, Hobbs LJ, Fernandez S. Fructose content and composition of commercial HFCS-sweetened carbonated beverages. **Int J Obes (Lond)**, v.39(1), p.176-82, 2015.

Will B, Galani R, Kelche C, Rosenzweig MR. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002). **Prog Neurobiol**, v.72(3), p.167-82, 2004.

Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v.52, p.90–110, 2005.

Wirth A, Benyó Z, Lukasova M, Leutgeb B, Wettschureck N, Gorbey S, Orsy P, Horváth B, Maser-Gluth C, Greiner E, Lemmer B, Schütz G, Gutkind JS, Offermanns S. G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. **Nat Med**, v.14, p.64–68, 2008.

Witter, M.P., Griffioen, A.W., Jorritsma-Byham, B., Krijnen, J.L. Entorhinal projections to the hippocampal CA1 region in the rat: an underestimated pathway. **Neurosci. Lett**, v.85(2), p.193-198, 1988.

Wong DT, Perry KW, Bymaster FP. The discovery of fluoxetine hydrochloride Prozac. **Nat Rev**, v.4, p.764–775, 2005.

**World Health Organization**. The Global Burden of Disease 2004 update. 2008.

Wynne BM, Chiao CW, Webb RC. Vascular smooth muscle cell signaling mechanisms for contraction to angiotensin II and endothelin-1. **J Am Soc Hypertens**, v..3, p.84–95, 2009.

Yahiro, A. M., Wingo, B. C., Kunwor, S., Parton, J., & Ellis, A. C. Classification of obesity, cardiometabolic risk, and metabolic syndrome in adults with spinal cord injury. **The Journal of Spinal Cord Medicine**, p. 1–12, 2019.

Yalcin, I., Aksu, F., Belzung, C. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. **European Journal Pharmacology**, v. 514, p. 165-74, 2005.

Yerlikaya A, Dagele T, King C, Kuwabara M, Lanaspas MA, Andres-Hernando A, et al. Dietary and commercialized fructose: Sweet or sour? **Int Urol Nephrol**. 2017.

Yudkin J. *Pure, White and Deadly*. London: **Penguin Books** (1986).

Zemančíková, A., & Török, J. Cardiovascular effects of high-fructose intake in rats with nitric oxide deficiency. **Interdisciplinary Toxicology**, v.7(3), p.159–164, 2014.

Zhao W, Chen H, Xu H, Moore E, Meiri N, Quon MJ, et al. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. **J Biol Chem**, v.274(49), p.34893-902, 1999.

Zimmet, P., Alberti, K.G., Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v.414 (6865), p.782–787, 2001.

Zucker IH, Schultz HD, Patel KP, Wang W, Gao L. Regulation of central angiotensin type 1 receptors and sympathetic outflow in heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.297, p.H1557–H1566, 2009.