

Ariana Ern Schmitz

**ESTUDO DOS EFEITOS DO CONSUMO DE FRUTOSE E DE  
SEU METABÓLITO METILGLIOXAL EM MODELOS  
NEURONAIS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutora em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Alcir L. Dafre

Coorientador: Prof. Dr. Rui D. Prediger

Florianópolis  
2017

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

Schmitz, Ariana Ern  
ESTUDO DOS EFEITOS DO CONSUMO DE FRUTOSE E DE  
SEU METABÓLITO METILGLIOXAL EM MODELOS NEURONAIS /  
Ariana Ern Schmitz ; orientador, Alcir Luiz  
Dafre; coorientador, Rui Daniel Prediger - SC, 2017.  
147 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

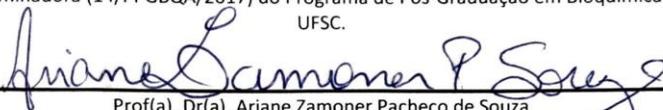
1. Bioquímica. 2. frutose. 3. metilglicoxal. 4.  
hiperlocomção. 5. autofagia. I. Dafre, Alcir Luiz .  
II. Prediger, Rui Daniel. III. Universidade Federal  
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica. IV. Título.

**“Estudo dos efeitos do consumo de frutose e de seu metabólito metilglicoxal em modelos neuronais”**

Por

**Ariana Ern Schmitz**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (14/PPGBQA/2017) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Ariane Zamoner Pacheco de Souza  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:



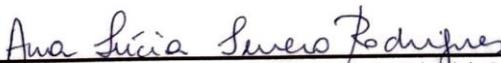
Dr(a) Alcir Luiz Daffe (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



Dr(a) Fátima Regina Mena Barreto Silva (Universidade Federal de Santa Catarina)



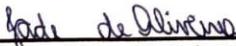
Dr(a) Everson Araújo Nunes (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Ana Lúcia Severo Rodrigues (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Francisney Pinto do Nascimento (Universidade Federal da Integração Latino-Americana)



Dr(a) Jade Oliveira (Universidade do Extremo Sul Catarinense)

Florianópolis, 10 de março de 2017.



Este trabalho é dedicado aos meus pais,  
Univaldo e Zeli, pelo seu amor e  
dedicação incondicional.



## AGRADECIMENTOS

Ao longo dos quatro anos de doutorado que se finalizaram com esta tese, muitas pessoas me ajudaram, me ensinaram e me apoiaram. Portanto, agora que essa fase tão importante da minha vida está se concretizando, não poderia deixar de registrar aqui, os meus agradecimentos.

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais, por sempre terem me motivado, por aguentarem a nossa distância desde tão cedo, por nunca terem me deixado desistir (mesmo frente as maiores dificuldades), por entenderem minhas faltas, por me ensinar a sempre tentar ser uma pessoa correta e justa, e por terem me ensinado o quanto é importante estudar, mesmo eles não tendo a mesma oportunidade no passado.

Agradeço ao meu irmão, pelo carinho, cumplicidade, amizade e pelo apoio em todos os momentos da minha vida.

A minha tia Irmtrauth e a Bettina, por terem me dado todo o apoio e incentivo para que eu chegasse até aqui.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Defesas Celulares, especialmente ao Luiz, ao Gudrian e a Bárbara, pela ajuda em todos os momentos, pelos desabafos, pela cumplicidade, pelo carinho, pelos muitos cafés, ovos cozidos, amendoins e paçocas divididos e, principalmente pelas conversas e risadas e por tornarem cada dia um presente.

Aos meus amigos queridos, pelo apoio, compreensão e companheirismo que sempre me deram forças nos momentos difíceis...

A todos os professores que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, bem como ao Lameb (especialmente a Vanessa, por sempre me receber com um sorriso).

Ao Marcelo Dietrich e a Pamela Maher, por me receberem durante o sanduíche em seus laboratórios, e por me proporcionarem a chance de vivenciar experiências únicas, que me transformaram para sempre.

Aos órgãos financeiros que permitiram a realização deste trabalho: a CAPES pela bolsa de doutorado e ao CNPq pelo financiamento.

E por fim, gostaria de agradecer especialmente ao Alcir, por ter o maior coração do mundo, pela paciência infinita, pelas orientações, pelo aprendizado, pelo incentivo, pela amizade e por me ajudar e me compreender sempre que precisei.

Obrigada!



“Life is a desire, not a meaning.”  
(Charlie Chaplin)



## RESUMO

A frutose é um monossacarídeo presente naturalmente em alimentos como frutas, cana-de-açúcar, beterraba, mel, entre outros. Por ter sabor mais doce que a glicose e a sacarose, a indústria alimentícia utiliza a frutose como um de seus principais adoçantes, fazendo com que o consumo de frutose tenha aumentado de forma alarmante nas últimas décadas. O consumo de bebidas adoçadas contendo grandes quantidades de frutose, principalmente refrigerantes, é considerado um dos principais fatores associados ao desenvolvimento de síndrome metabólica e diabetes. Além disso, por ser uma molécula mais reativa que a glicose, o consumo de frutose está associado ao aumento na formação de metabólitos intermediários tóxicos, dentre os quais, o metilglioxal (MGO). O MGO parece estar associado ao desenvolvimento e a progressão de diabetes e doença de Alzheimer, uma vez que indivíduos portadores dessas patologias apresentam concentrações aumentadas de MGO no plasma e no líquido cefalorraquidiano. Além disso, dados prévios do nosso grupo e da literatura já demonstraram que o MGO prejudica os sistemas antioxidantes da glioxalase (Glo1/Glo2) e da tiorredoxina (Trx/TRxR), levando a degradação das proteínas tiorredoxina e glioxalase 2. Porém, estes efeitos foram investigados somente em linhagens celulares, e não há dados com o uso de sistemas mais complexos, como estudos *in vitro* com tecidos ou *in vivo*. Além disso, o efeito do MGO sobre a enzima antioxidante GR ainda é desconhecido e, visto que a GR apresenta estrutura muito similar a TrxR, e também por possuir cisteínas reativas, é possível que o MGO também afete a atividade e expressão da GR. Dessa forma, no presente trabalho objetivou-se investigar os efeitos do consumo crônico de frutose *in vivo* sobre o perfil metabólico e os parâmetros comportamentais de camundongos. Além disso, foram investigados em modelos *in vitro* de fatias hipocâmpais os efeitos do MGO sobre os sistemas da glioxalase, da tiorredoxina e da glutatona redutase. E ainda, investigou-se em modelo de células neurais HT22, se as diminuições dos níveis de Trx1 e Glo2, induzidos pelo MGO, poderiam ser mediados por degradação proteossomal ou autofágica, bem como se esses efeitos são mediados pela indução da ativação da proteína cinase ativada por AMP (AMPK). Os dados obtidos demonstram que o consumo de frutose em camundongos causa diminuição do consumo alimentar, aumento do consumo calórico e do peso corporal, aumento de colesterol total e da fração LDL, aumento dos níveis de glutatona e da atividade da Glo1 no fígado, aumento da atividade da glutatona peroxidase no córtex pré-frontal, bem como induz

aumento da atividade locomotora. Com relação ao MGO, foi demonstrado que o tratamento in vitro de fatias de hipocampo com MGO compromete a atividade e o imunoconteúdo de GR em fatias hipocampais, diminui os níveis de glutathiona (GSH) e induz uma rápida e robusta resposta das proteínas GR, Glo1, Glo2, Gr e TrxR1. Além disso, nossos dados demonstram que existe um claro efeito sinérgico entre a toxicidade induzida pelo MGO e a inibição da GR e da TrxR, sugerindo a toxicidade induzida pelo MGO é mediada pela depleção de antioxidantes celulares. Com relação aos estudos in vitro com células HT22, foi demonstrado que o MGO induz autofagia via ativação de AMPK, e que a Trx1 e a Glo2 são degradadas através da autofagia. Dessa maneira, a partir dos dados apresentados neste estudo, conclui-se que o consumo de frutose está relacionado a alterações no perfil lipídico e causa alterações comportamentais relacionadas ao aumento da locomoção. Além disso, nossos dados reforçam a hipótese de que alterações no ambiente redox podem ser o principal mecanismo de toxicidade induzido pelo MGO através de sua ação sobre os sistemas redutores de tiol GSH/GR e Trx/TrxR, bem como a indução da degradação proteica através da ativação de autofagia, mediada via AMPK.

**Palavras-chave:** frutose, hiperlocomoção, metilglioxal, tiorredoxina, glioxalase, glutathiona redutase, AMPK, autofagia.

## ABSTRACT

Fructose is a monosaccharide naturally present in foods such as fruits, sugarcane, beets, honey, among others. Because it tastes sweeter than glucose and sucrose, the food industry uses fructose as one of its main sweeteners, causing fructose consumption to rise alarmingly in the last decades. The consumption of sweetened beverages containing large amounts of fructose, mainly soft drinks, is considered one of the main factors associated with the development of metabolic syndrome and diabetes. In addition, because fructose is a more reactive molecule than glucose, the consumption of fructose is associated with an increase in the formation of toxic intermediate metabolites, among them methylglyoxal (MGO). MGO appears to be associated with the development and progression of diabetes and Alzheimer's disease, since individuals with these conditions have increased concentrations of MGO in the plasma and cerebrospinal fluid. Furthermore, previous data from our group and the literature have demonstrated that MGO seems to impair the antioxidant systems of glyoxalase (Glo1/Glo2) and thioredoxin (Trx/TRxR), leading to the degradation of the proteins thioredoxin and glyoxalase 2. However, these effects were investigated only in cell lines, and there are no data with the use of more complex systems, such as in vitro studies with tissues or in vivo studies. Also, the effect of MGO on the antioxidant enzyme glutathione reductase (GR) is still unknown and, since GR has a structure very similar to TrxR, and also because it has reactive cysteines, it is possible that MGO also affects the activity and expression of GR. Thus, the present work aimed to investigate the effects of chronic consumption of fructose in vivo on the metabolic profile and behavioral parameters of mice. In addition, the effects of MGO on the glyoxalase, thioredoxin and glutathione reductase systems were investigated in in vitro models of hippocampal slices. Furthermore, it was investigated in a neural HT22 cell model if the MGO-induced decreases in the levels of Trx1 and Glo2 was mediated by proteasomal or autophagic degradation, as well as whether those effects were mediated by the induction of the AMP-activated protein kinase (AMPK) activation. The data obtained demonstrate that the consumption of fructose in mice causes a decrease in food consumption, an increase in caloric intake and body weight, increase in total cholesterol and LDL fraction, increase of glutathione (GSH) levels and Glo1 activity in the liver, increase in the activity of the glutathione peroxidase in the prefrontal cortex, as well as an increase in locomotor activity. With respect to MGO, we found that in vitro treatment of hippocampal slices with MGO has compromised the activity and

immunocontent of GR, decreased GSH levels and induced a rapid and robust response of GR, Glo1, Glo2, and TrxR1. In addition, our data demonstrate that there is a clear synergistic effect between MGO-induced toxicity and inhibition of GR and TrxR, suggesting that MGO-induced toxicity is mediated by depletion of cellular antioxidants. With respect to in vitro studies with HT22 cells, it has been shown that MGO induces autophagy via AMPK activation, and that Trx1 and Glo2 are degraded through autophagy. Thus, from the data presented in this study, it is concluded that the consumption of fructose is related to changes in the lipid profile and causes behavioral changes related to increased locomotion. In addition, our data reinforce the hypothesis that changes in the redox environment may be the main mechanism of toxicity induced by MGO through its action on GSH / GR and Trx / TrxR thiol reducing systems, as well as the induction of protein degradation through autophagy activation, mediated through AMPK activation.

**Keywords:** fructose, hyperlocomotion, methylglyoxal, thioredoxin, glyoxalase, glutathione reductase, AMPK, autophagy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Índice mundial de consumo <i>per capita</i> de açúcar..	24
Figura 2 –	Representação esquemática da estrutura da glicose e da frutose.....	30
Figura 3 –	Metabolismo hepático da frutose.....	33
Figura 4 –	Representação da estrutura química do metilglioxal.....	35
Figura 5 –	Representação das principais rotas de formação do metilglioxal.....	36
Figura 6 –	Esquema das reações enzimáticas do sistema da glioxalase.....	39
Figura 7 –	Representação esquemática das proteínas envolvidas no processo de autofagia.....	43
Figura 8 –	Variação do peso e consumo alimentar e calórico.	63
Figura 9 –	Efeitos do consumo de frutose sobre o perfil metabólico plasmático de camundongos.....	64
Figura 10 –	Efeitos do consumo de frutose sobre os níveis de GSH total no fígado e no córtex de camundongos.....	65
Figura 11 –	Efeito do consumo de frutose sobre a atividade de enzimas antioxidantes.....	66
Figura 12 –	Efeito do consumo de frutose sobre a atividade da Glo1.....	67
Figura 13 –	Efeitos do consumo de frutose sobre o comportamento locomotor e exploratório no teste do campo aberto.....	68
Figura 14 –	Avaliação do consumo de frutose sobre o comportamento do tipo ansioso no teste da caixa claro/escuro.....	69
Figura 15 –	Efeitos do consumo de frutose sobre o comportamento do tipo ansioso e locomotor no teste do labirinto em cruz elevado.....	70
Figura 16 –	Efeitos do consumo de frutose sobre capacidade motora de camundongos.....	71
Figura 17 –	Efeitos do consumo de frutose sobre a memória e a atividade locomotora no teste do labirinto em Y.....	72
Figura 18 –	Efeitos do consumo de frutose sobre a cognição e memória no teste da realocação do objeto.....	73

Figura 19 – Efeitos do consumo de frutose sobre o comportamento do tipo depressivo de camundongos.....	74
Figura 20 – MGO não causa diminuição significativa da viabilidade em fatias de hipocampo.....	88
Figura 21 – Efeito do MGO sobre a concentração total de GSH e atividade e imunoconteúdos de GR em fatias de hipocampo.....	89
Figura 22 – Efeito do MGO sobre a atividade e imunoconteúdos de TrxR1 em fatias de hipocampo.....	91
Figura 23 – Efeito do MGO sobre o sistema da glioxalase em fatias de hipocampo.....	92
Figura 24 – Níveis relativos de Trx1 e Glo2 em células HT22 tratadas com MGO.....	102
Figura 25 – Adutos entre proteínas e MGO em células HT22....	104
Figura 26 – Proteínas ubiquitinadas em células HT22 tratadas com MGO.....	106
Figura 27 – Efeito dos inibidores de autofagia e proteassoma sobre a ubiquitinação de proteínas.....	108
Figura 28 – Efeitos do MGO sobre marcadores e autofagia.....	110
Figura 29 – Efeito dos inibidores de autofagia e proteassomal sobre os níveis proteicos de Trx1 e Glo2.....	111
Figura 30 – Efeito do siRNA contra Atg5 sobre a expressão de Trx1 e Glo2 em células HT22 tratadas com MGO.....	113
Figura 31 – Efeitos do MGO sobre a via da AMPK/mTOR.....	115
Figura 32 – Expressão de Trx1 e Glo2 em MEFs selvagens e MEFs deficientes em AMPK tratadas com MGO.....	116

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs – Produtos de glicação avançada  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
AMP – Adenosina monofosfato  
AMPK – Proteína cinase dependente de AMP  
ASK1 – Cinase reguladora de apoptose 1  
ATP – Adenosina trifosfato  
BSA – Albumina do soro bovino  
DCNT – Doenças crônicas não-transmissíveis  
DMSO – Dimetil-sulfóxido  
DTNB – Ácido 55'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)  
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético  
ERN – Espécies reativas de nitrogênio  
ERO – Espécies reativas de oxigênio  
FADH<sub>2</sub> – Flavina adenina dinucleotídeo  
FDA – *Food and Drug Administration*  
GABA – Ácido gama aminobutírico  
GCL –  $\gamma$ -Glutamil-cisteína sintetase  
Glo1 – Glioxalase I  
Glo2 – Glioxalase II  
GLUT – Transportador de glicose  
GLP-1 – Peptídeo semelhante ao glucagon-1  
GR – Glutaciona redutase  
GPx – Glutaciona peroxidase  
GSH – Glutaciona  
GSSG – Glutaciona oxidada  
GST – Glutaciona S-transferase  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio  
HDL – Lipoproteína de alta densidade  
HEPES – Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2-Etanossulfônico  
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 $\beta$   
IMP – Inosina monofosfato  
LC3 – cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos  
LDL – Lipoproteína de baixa densidade  
NADH – Nicotinamina adenina dinucleotídeo  
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
NF- $\kappa$ B – Fator de transcrição nuclear kappa B  
MGO – Metilglioxal  
mTOR – Proteína alvo da rapamicina de mamíferos

MTT – 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium brometo  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> – Radical superóxido  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
ON – Óxido nítrico  
ONOO<sup>-</sup> – Radical peroxinitrito  
PFK-1 – Fosfofrutocinase 1  
Prx – Peroxirredoxina  
RAGE – Receptor de AGE  
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada  
-SH – Grupamento sulfidril ou tiol  
SDS – Dodecil sulfato de sódio  
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS  
SGLT-1 – Transportador de glicose dependente de sódio  
SNC – Sistema Nervoso Central  
STAT-3 – Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3  
TNB – Ácido 5'-tionitrobenzóico  
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa  
Trx – Tiorredoxina  
TrxR – Tiorredoxina redutase  
Txnip – Proteína de interação com a tiorredoxina  
VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
1.1	Relação entre o consumo de açúcar e doenças crônicas não-transmissíveis.....	23
1.2	Visão geral sobre o papel da glicose no metabolismo...	25
1.3	Relevância do consumo de frutose.....	26
1.4	Efeitos do consumo de frutose sobre vias de saciedade.	28
1.5	Diferenças entre o metabolismo da frutose e da glicose	29
1.6	Patologias associadas ao consumo de frutose.....	33
1.7	Compostos dicarbonila provenientes do metabolismo da frutose.....	35
1.8	Sistema da glicoxalase.....	38
1.9	Papel dos tióis e de sistemas antioxidantes na homeostase celular.....	40
1.10	Autofagia como um mecanismo de sobrevivência celular.....	42
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>47</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
3.1	Objetivo geral.....	49
3.2	Objetivos específicos.....	49
<b>4.</b>	<b>EFEITOS DO CONSUMO CRÔNICO DE FRUTOSE SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS (CAPÍTULO 1).....</b>	<b>51</b>
4.1	Contextualização.....	53
4.2	Materiais e métodos.....	54
4.2.1	Animais.....	54
4.2.2	Tratamentos.....	54
4.2.3	Testes comportamentais.....	54
4.2.3.1	Teste do campo aberto.....	55
4.2.3.2	Teste de realocação do objeto.....	55
4.2.3.3	Teste da caixa claro-escuro.....	56
4.2.3.4	Teste do labirinto em Y.....	56
4.2.3.5	Teste do labirinto elevado em cruz.....	56
4.2.3.6	<i>Pole test</i> .....	57
4.2.3.7	Teste de suspensão pela cauda.....	57
4.2.3.8	Teste do <i>Rotarod</i> .....	58
4.2.3.9	Teste do nado forçado.....	58
4.2.4	Análises bioquímicas.....	58
4.2.4.1	Análise de perfil plasmático.....	58

4.2.4.2	Atividade enzimática.....	59
4.2.4.3	Determinação da concentração de GSH-t.....	60
4.2.4.4	Extração de proteínas e Western blot.....	60
4.2.5	Análise estatística.....	60
4.3	Resultados.....	62
4.3.1	Caracterização do modelo de consumo crônico de frutose.....	62
4.3.2	Influência do consumo de frutose sobre as defesas antioxidantes.....	65
4.3.3	Efeitos do consumo crônico de frutose sobre o perfil comportamental de camundongos.....	68
4.4	Discussão.....	76
4.5	Conclusão.....	82
<b>5.</b>	<b>EFEITOS NEUROQUÍMICOS DO METILGLIOXAL EM FATIAS DE HIPOCAMPO (CAPÍTULO 2).....</b>	<b>83</b>
5.1	Contextualização.....	85
5.2	Materiais e métodos.....	86
5.2.1	Animais.....	86
5.2.2	Preparo e tratamento das fatias de hipocampo.....	86
5.2.3	Avaliação da viabilidade celular.....	86
5.2.4	Atividade enzimática.....	87
5.2.5	Determinação da concentração de GSH-t.....	87
5.2.6	Extração de proteínas e Western blot.....	87
5.2.7	Análise estatística.....	87
5.3	Resultados.....	88
5.3.1	Efeitos do MGO sobre a viabilidade celular.....	88
5.3.2	Efeitos do MGO sobre GSH e a GR.....	89
5.3.3	Efeitos do MGO sobre o sistema da tiorredoxina.....	90
5.3.4	Efeitos do MGO sobre o sistema da glicoxalase.....	91
5.4	Discussão.....	93
5.5	Conclusão.....	96
<b>6.</b>	<b>EFEITOS DO TRATAMENTO DE METILGLIOXAL SOBRE VIAS DE SINALIZAÇÃO RELACIONADAS A AUTOFAGIA EM CÉLULAS NEURAIS (CAPÍTULO 3).....</b>	<b>97</b>
6.1	Contextualização.....	99
6.2	Materiais e métodos.....	100
6.2.1	Cultura celular e tratamentos.....	100
6.2.2	Transfecção.....	100

6.2.3	Western blot.....	100
6.2.4	Análise estatística.....	100
6.3	Resultados.....	102
6.4	Discussão.....	117
6.5	Conclusão.....	120
7.	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>121</b>
	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>123</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1. 1 Relação entre o consumo de açúcar e doenças não-transmissíveis

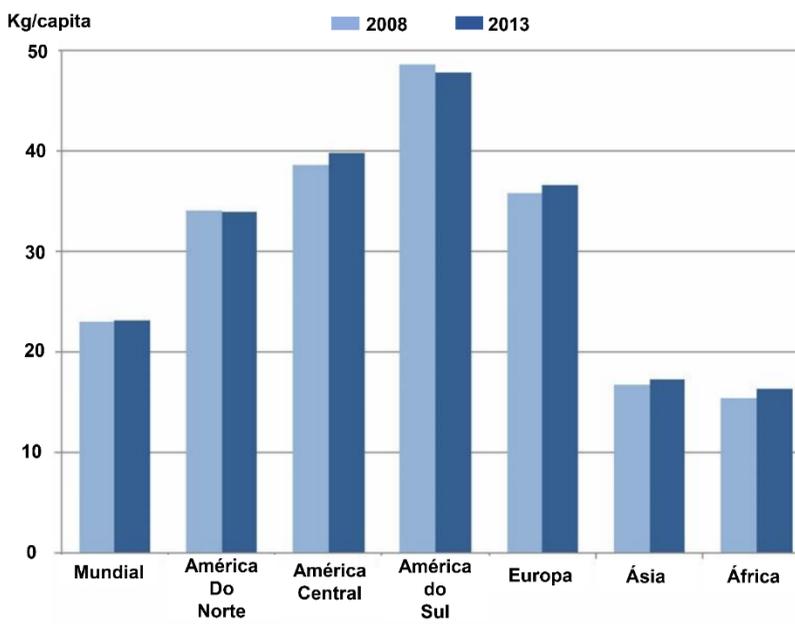
Doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT), dentre as quais disfunções cardiovasculares, hipertensão e diabetes, são as que mais causam mortes no mundo. Em 2012, as DCNT foram responsáveis por 68% de um total de 56 milhões de mortes. Mais de 40% destas (16 milhões) foram as chamadas mortes prematuras, ou seja, ocorreram em indivíduos com menos de 70 anos de idade, segundo dados de relatório oficial de 2015 realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2015).

Fatores de risco modificáveis, como dieta inadequada e falta de atividade física, são alguns dos fatores mais relacionados ao desenvolvimento de DCNT, além de serem também fatores de risco para o desenvolvimento de obesidade. É notório que a obesidade é um fator de risco independente para o desenvolvimento de DCNT, e sua frequência na população vem crescendo de forma alarmante no mundo todo, chegando a atingindo 13% da população mundial em 2014 (OMS, 2015). Segundo a OMS, o grande aumento no consumo dos chamados açúcares livres, associado a uma dieta desequilibrada, está entre as principais causas para o aumento dos casos de obesidade e DCNT.

De acordo com a OMS (2015), o termo ‘açúcar’ inclui açúcares intrínsecos, os quais são constituintes naturais de frutas e vegetais (sacarose, frutose e glicose), e açúcares do leite (lactose e galactose). Além destes, açúcares livres são definidos como “todos os monossacarídeos e dissacarídeos adicionados aos alimentos e bebidas pelo fabricante, cozinheiro ou consumidor, além daqueles naturalmente presentes no mel, xaropes e sucos de frutas naturais ou concentrados” (OMS, 2015). O consumo de açúcares livres, especialmente na forma de bebidas artificialmente adoçadas, como refrigerantes, causa aumento no consumo calórico total, podendo levar a uma diminuição do consumo de alimentos nutricionalmente adequados. Este hábito alimentar contribui para uma dieta não-saudável, podendo levar ao aumento de peso e do risco de desenvolvimento de DCNT (HAUNER et al., 2012; MALIK et al., 2010, 2013; MALIK; SCHULZE; HU, 2006; VARTANIAN; SCHWARTZ; BROWNELL, 2007).

Segundo dados divulgados por um dos maiores grupos mundiais de comércio de açúcar, o *Groupe Sucres et Denrées* ([http://www.sucden.com/statistics/4\\_world-sugar-consumption](http://www.sucden.com/statistics/4_world-sugar-consumption) - acesso

em 10 de julho de 2016), o consumo mundial bruto de açúcar, no período 2013/2014, foi de 173 milhões de toneladas. Considerando que a população mundial é composta atualmente por 7 bilhões de pessoas, isso gera uma média de 24 kg de açúcar *per capita* por ano. E, apesar de cerca de 75% da população mundial (5,5 bilhões) se concentrar na Ásia (4,4 bilhões) e África (1,1 bilhão), estes continentes têm os menores índices de consumo anual de açúcar (17,3 e 16,8 kg *per capita*, respectivamente). Os maiores índices são encontrados na América e Europa (43,8 e 36,7 kg *per capita*, respectivamente) (Fig. 01).



**Figura 1 – Índice mundial de consumo *per capita* de açúcar.**  
Adaptado de: *Groupe Sucres et Denrées*  
[http://www.sucden.com/statistics/4\\_world-sugar-consumption](http://www.sucden.com/statistics/4_world-sugar-consumption) - acessado em 10 de julho de 2016.

O aumento no consumo de açúcar deve-se as mudanças nos padrões de vida da população mundial. Em 1900 apenas 10% das pessoas moravam em cidades, mas atualmente mais de 50% da população mundial encontra-se nos centros urbanos (KEARNEY, 2010). Essas mudanças rápidas no processo de urbanização tiveram, e continuam tendo, um efeito intenso sobre os padrões alimentares (POPKIN, 1999). A vida nas cidades geralmente está associada a uma ingestão calórica aumentada. Isso ocorre pelo fato de haver maior oferta alimentar e menor gasto energético, o que favorece o consumo calórico excessivo e contribui para o aumento dos índices de diabetes e obesidade nas áreas urbanas (KEARNEY, 2010). Além disso, o nicho urbano favoreceu o desenvolvimento de redes de *fast food*, que oferecem comidas rápidas, baratas e de fácil acesso. No entanto, as refeições oferecidas por essas redes de *fast food* são ricas em açúcares, gorduras e sal, contribuindo para o aumento do consumo de alimentos de alta densidade energética, em detrimento aos alimentos ricos em fibras, minerais e vitaminas e de menor densidade energética (OMS, 2015).

## 1.2 Visão geral sobre o papel da glicose no metabolismo

A glicose é uma das principais moléculas no metabolismo de mamíferos. Além de ser substrato energético para as células, ela serve ainda como fonte de carbono para a síntese de outras moléculas como aminoácidos, ácidos graxos e ácidos nucleicos (ARONOFF et al., 2004; GIUGLIANO; CERIELLO; ESPOSITO, 2008).

Em mamíferos a glicose é obtida através da dieta e sua entrada nas células é feita por meio dos múltiplos transportadores de glicose chamados de GLUT. Até o presente momento, 14 isoformas de transportadores GLUT já foram identificadas em humanos (THORENS; MUECKLER, 2010). Dentro das células, a glicose é fosforilada à glicose-6-fosfato pela enzima hexocinase e, a partir de então, pode seguir por diferentes vias metabólicas, de acordo com a necessidade energética celular. O excesso de glicose pode seguir várias rotas, incluindo a formação de glicogênio como um polímero de reserva. Células com reserva de glicogênio podem recorrer a sua quebra (glicogenólise) para obtenção de glicose. Ainda, em períodos de jejum os tecidos neoglicogênicos (fígado, rim e intestino) obtêm glicose através da desaminação de alguns aminoácidos e da degradação do glicerol derivado de lipídeos. Este processo, conhecido como gliconeogênese, permite que estes órgãos liberem glicose, mantendo os níveis plasmáticos deste monossacarídeo bastante estáveis (ARONOFF et al., 2004; GIUGLIANO; CERIELLO; ESPOSITO, 2008).

A glicólise é a rota central no metabolismo da glicose e tem como produto final o piruvato. Este, pode seguir pela via anaeróbica de forma bastante rápida, formando apenas 2 ATPs, ou pode seguir para a via do ácido tricarboxílico, cujos produtos alimentam a fosforilação oxidativa. Ao final da metabolização oxidativa, a glicose é totalmente convertida a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . Esta rota gera de 30 a 32 ATPs, NADH e  $\text{FADH}_2$ . Alternativamente, a glicose-6-fosfato pode ainda ser direcionada para a via oxidativa das pentoses-fosfato formando NADPH, que é um doador de elétrons para reações de biossíntese ou de degradação de peróxidos. A via não oxidativa da rota das pentoses-fosfato gera ribose, que é um açúcar necessário para a síntese de ácidos nucleicos (STANTON, 2012).

A regulação dos mecanismos responsáveis pela manutenção da homeostase da glicose é feita pela contribuição de vários fatores, incluindo a participação dos hormônios insulina e glucagon. A insulina estimula a captação de glicose pelos tecidos periféricos quando a relação insulina/glucagon está elevada na corrente sanguínea. Quando a relação é baixa, o glucagon estimula a mobilização das reservas de glicose. Falhas na sinalização celular da insulina (resistência à insulina) são o principal fator de risco para o desenvolvimento de obesidade e diabetes tipo 2 (CHOI; KIM, 2010).

### 1.3 Relevância do consumo de frutose

A frutose é um monossacarídeo presente naturalmente em alimentos como frutas, cana-de-açúcar, beterraba, mel, entre outros. Por ter sabor mais doce que a glicose e a sacarose, a indústria alimentícia utiliza a frutose como um de seus principais adoçantes. Formulações com alto teor de frutose, vendidas na forma de xarope de glicose rico em frutose (*high fructose corn syrup*, HFCS), são a principal forma empregada para adicionar frutose aos alimentos.

Em meados dos anos 60, a indústria de alimentos desenvolveu tecnologias que permitiram a extração do amido do milho, sua hidrólise à glicose, e a conversão de parte desta em frutose por reações enzimáticas de isomerização (MARSHALL; KOOI, 1957). A partir do surgimento desta tecnologia, foram desenvolvidos novos adoçantes derivados do milho, sendo o principal deles o xarope de glicose rico em frutose (HANOVER; WHITE, 1993; WHITE, 2008). Diferentes concentrações de frutose podem ser encontradas no HFCS, sendo a forma mais comum o HFCS-55, que contém 55% de frutose e é a mais utilizada na fabricação de bebidas artificialmente adoçadas (BRAY; NIELSEN; POPKIN, 2004). O HFCS é amplamente utilizado pela indústria de alimentos devido as

suas características organolépticas, seu poder de aumentar o chamado “tempo de prateleira”, e sua habilidade em dar cremosidade e cor as preparações. Além disso, por ter um custo menor, o uso industrial de HFCS cresceu rapidamente, em detrimento ao uso de sacarose e glicose (DUFFEY; POPKIN, 2008).

No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 271, de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA - <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao/#/> - acessado em 24 de julho de 2016) estabelece o "Regulamento técnico para açúcares e produtos para adoçar", que define como açúcar “a sacarose obtida a partir do caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) ou de beterraba (*Beta alba* L.), sendo também considerados açúcares os monossacarídeos e demais dissacarídeos, podendo se apresentar em diversas granulometrias e formas de apresentação” (ANVISA, 2016). Dessa maneira, a indústria alimentícia brasileira não precisa especificar nos rótulos de seus produtos se eles contêm HFCS ou não, já que este se enquadra na definição geral de açúcar.

Os alimentos industrializados, como as bebidas artificialmente adoçadas (principalmente refrigerantes), doces, balas, molhos, massas, hambúrgueres, barras de cereal, pizza, entre outros, contêm quantidades elevadas de frutose. Os refrigerantes merecem destaque pois seu consumo mundial passou de 35,9 litros por pessoa por ano em 1997, para 43,1 litros por pessoa por ano em 2010 (BASU et al., 2013). Além disso, para cada aumento de 1% no consumo de refrigerantes, houve um aumento equivalente a 4,8% na percentagem de indivíduos adultos com sobrepeso, a 2,3% de indivíduos adultos obesos, e a 0,3% de indivíduos adultos com diabetes (BASU et al., 2013).

Dados mundiais sobre o consumo específico de frutose são escassos, sendo a única fonte oficial a Organização Mundial de Açúcar (*International Sugar Organization*). Esta organização fornece dados sobre o consumo de açúcar de modo geral, não especificando, no entanto, a quantidade de frutose. A maioria dos dados avaliando o consumo específico de frutose provém dos Estados Unidos. Estes estudos estimam que antes de 1900 a ingestão *per capita* de frutose era aproximadamente de 15 g/dia, sendo frutas e vegetais as fontes principais. Dados do *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos indicam que no período de 1977/1978 o consumo de frutose foi estimado em 37 g/dia (PARK; YETLEY, 1993), e em 2008 este consumo já chegava a 54 g/dia (10% do total de calorias diárias recomendadas) (VOS et al., 2008). Estes dados indicam também que a principal fonte dietética de frutose é

proveniente do consumo de refrigerantes (30% do total de ingesta de açúcares provém de frutose).

Infelizmente, não existem estudos que avaliem o consumo de frutose pela população brasileira. Segundo a Pesquisa Nacional da Saúde de 2013, realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2016), no Brasil, 23,4% dos indivíduos com dezoito anos ou mais consomem refrigerante pelo menos 5 dias na semana, indicando, portanto, um consumo elevado de frutose pela população brasileira. Estudos recentes da literatura têm associado o consumo elevado de frutose ao desenvolvimento de diversas condições patológicas, como diabetes e resistência à insulina (GORAN; ULJASZEK; VENTURA, 2013), síndrome metabólica (KHO et al., 2016; RODRIGUEZ LANZI et al., 2016), dislipidemia (TAPPY; LÊ, 2010), hipertensão (FERDER; FERDER; INSERRA, 2010), e doença cardiovascular (GUN et al., 2016).

#### 1.4 Efeitos do consumo de frutose sobre vias de saciedade

A frutose, ao contrário da glicose, tem um fraco efeito sobre a liberação de insulina pelo pâncreas pelo fato de ser predominantemente metabolizada no fígado (TEFF et al., 2004, 2009; STANHOPE et al., 2008). O aumento pós-prandial nos níveis de insulina ativam vias de sinalização de saciedade e recompensa no sistema nervoso central (SNC), os quais são diminuídos ou limitados após a ingestão de frutose (FIGLEWICZ; BENOIT, 2009; WOODS et al., 1996). Além disso, o consumo de glicose estimula a liberação do hormônio leptina pelo tecido adiposo, fazendo com que haja a ativação de mecanismos de saciedade e diminuição da ingesta alimentar (KLOK; JAKOBSDOTTIR; DRENT, 2007). Já após o consumo de frutose, os níveis de leptina permanecem praticamente inalterados em humanos e animais, comprometendo, dessa forma, a ativação dos mecanismos para a diminuição do consumo alimentar e de saciedade (HAVEEL et al., 1999; STANHOPE et al., 2008; TEFF et al., 2009). Outro fato importante com relação ao consumo de frutose, é que esta não diminui os níveis circulantes de peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) (KONG et al., 1999). Estes dois hormônios, leptina e GLP-1, estão relacionados à ativação e manutenção de vias de saciedade (BRAY; NIELSEN; POPKIN, 2004; KWON; KIM; KIM, 2016).

Além disso, o consumo de frutose tem um fraco efeito inibitório sobre os níveis plasmáticos de grelina, hormônio produzido pelas células do trato gastrointestinal e relacionado ao aumento do apetite e consumo

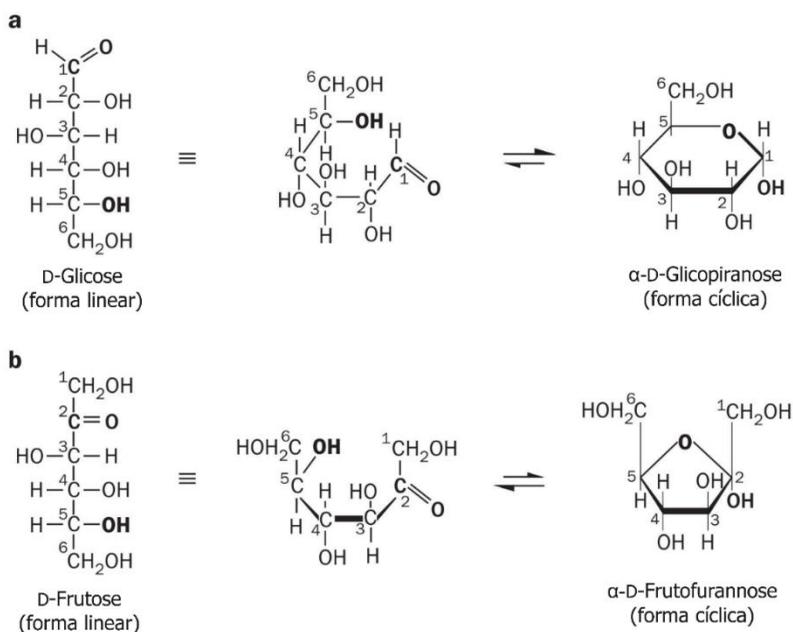
alimentar (ENGELSTOFT; SCHWARTZ, 2016; TEFF et al., 2004). Dessa maneira, o consumo de frutose, ao contrário do que acontece com a glicose, não causa estimulação de vias de saciedade, levando consequentemente ao aumento no consumo alimentar. Este comportamento contribui para o acúmulo de gordura corporal por favorecer o consumo excessivo de calorias e um balanço energético positivo (BRAY; NIELSEN; POPKIN, 2004). O aumento da gordura corporal está relacionado ao aumento da obesidade, diabetes e resistência à insulina. Nos países onde o consumo de frutose é maior, a incidência de diabetes chega a ser até 20% mais elevada, em comparação com aqueles países onde há menor consumo de frutose (GORAN; ULJASZEK; VENTURA, 2013).

### 1.5 Diferenças entre o metabolismo da frutose e da glicose

A frutose e a glicose são ambos monossacarídeos de fórmula química  $C_6H_{12}O_6$ , sendo que devido a diferenças na posição do grupamento funcional carbonila, a frutose é classificada como uma cetose (cetona) e a glicose como um aldose (aldeído) (Fig. 02). Além disso, a frutose tem sabor mais doce e é metabolizada de maneira diferente da glicose (HAVEL, 2005; JÜRGENS et al., 2005; MORTON et al., 2006). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que a frutose é mais reativa que a glicose (LAWRENCE; MAVI; MERAL, 2008; SEMCHYSHYN et al., 2014; SUÁREZ et al., 1989). Isto pode parecer controverso do ponto de vista puramente químico, pois o grupamento carbonila de aldoses (glicose, por exemplo) é mais eletrofílico e acessível, o que confere a aldeídos maior reatividade quando comparados com cetoses (frutose, por exemplo). De acordo com a literatura, uma das possíveis explicações para este fato é que a estrutura cíclica da glicose (Fig. 02a) tem grande estabilidade em solução aquosa, retardando a sua velocidade de reação. A frutose, apesar de também adquirir forma cíclica em soluções aquosas (Fig. 02b), existe em maior taxa (~500 vezes) na forma de cadeia aberta, se comparada a glicose (COCINERO et al., 2013). A proporção das formas acíclicas (cadeia aberta) de glicose e frutose em solução aquosa corresponde a 0,001– 0,002% e 0,7%, respectivamente (ROY; WILLIAMS; JENNINGS, 1984; TURK, 2010).

A glicose é absorvida no intestino delgado de mamíferos por meio de um sistema de transporte composto por duas etapas. Na primeira, a glicose é absorvida pelo transportador de glicose dependente de sódio 1 (SGLT-1), presentes nas células apicais do intestino delgado. Esse transporte dá-se por meio de um gradiente eletroquímico formado pelo

co-transporte de duas moléculas de sódio para cada molécula de glicose transportada (HEDIGER; RHOADS, 1994). Na segunda etapa, a glicose passa das células apicais intestinais para o espaço extracelular por meio de difusão facilitada mediada pelo transportador GLUT2 (THORENS, 1996). O transporte intestinal de frutose também ocorre em duas etapas, sendo que na primeira etapa ela é transportada por difusão facilitada para dentro dos enterócitos pelo transportador GLUT5 (BRAY; NIELSEN; POPKIN, 2004), e na segunda etapa, mediada pelo GLUT2, a frutose difunde para a corrente sanguínea, é captada principalmente pelo fígado, onde é metabolizada (DOUARD; FERRARIS, 2013).



**Figura 2 – Representação esquemática da estrutura da glicose e da frutose.** (a) molécula de glicose na forma linear (esquerda) e cíclica (direita); (b) molécula de frutose na forma linear (esquerda) e cíclica (direita). Adaptado de LIM et al., 2010.

O metabolismo hepático da frutose também é diferente da glicose. Uma vez dentro das células, a glicose é fosforilada à glicose-6-fosfato pela enzima hexocinase, podendo, então, seguir para a via glicolítica. O metabolismo da glicose, incluindo a glicólise, é regulado pela fosfofrutocinase-1 (PFK-1) que catalisa a conversão irreversível de frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bifosfato. A PFK-1 é alostericamente inibida por ATP e citrato quando o nível energético das células está elevado. Esta regulação limita, portanto, a captação hepática da glicose oriunda da dieta, pois o aumento nos níveis celulares de ATP e citrato fazem com que estes se liguem em sítios alostéricos específicos da PFK-1, inibindo sua atividade (HAVEL, 2005). Isso faz com que o excedente de glicose, que é absorvida pelo intestino e liberada na veia porta, contorne o metabolismo hepático e seja direcionada diretamente para a circulação sistêmica onde é captada pelos tecidos periféricos, principalmente tecido adiposo e tecido muscular esquelético. O transporte de glicose em alguns tecidos periféricos depende do transportador GLUT4, o qual é ativado pela ação da insulina. Em indivíduos adultos saudáveis, considerando os períodos de jejum e pós-prandiais, os níveis de glicose sanguíneos mantêm-se entre 4 e 7 mM (SALTIEL; KAHN, 2001).

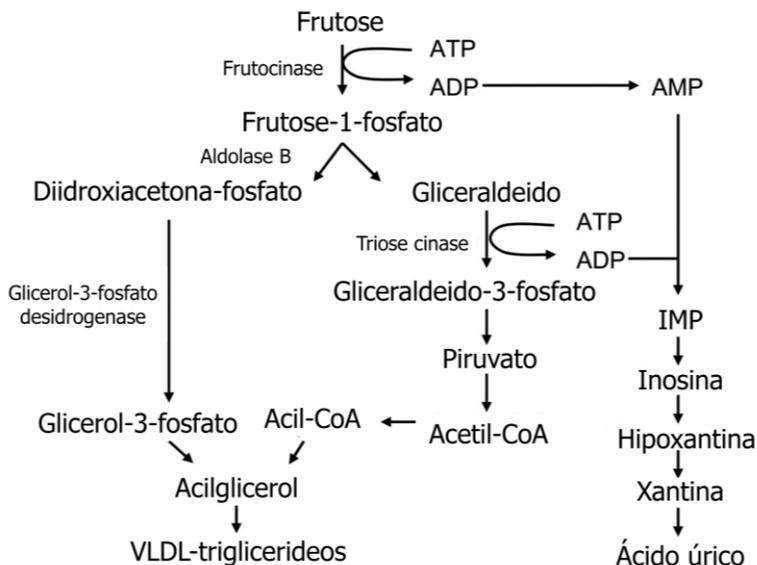
Diferentemente da glicose, a frutose é metabolizada pela enzima frutocinase à frutose-1-fosfato, a qual é então metabolizada pela enzima aldolase B em trioses intermediárias da glicólise (COX, 2002). Pelo fato da frutocinase não ser regulada pelo nível energético celular, a maior parte da frutose consumida é metabolizada no próprio fígado, e apenas uma pequena porção alcança a circulação sistêmica. A concentração plasmática de frutose em indivíduos saudáveis gira em torno de 5 - 8  $\mu$ M, cerca de 1000 vezes menor que a glicose (KAWASAKI; AKANUMA; YAMANOUCHI, 2002; LE et al., 2012).

Outro ponto importante consiste na depleção de ATP causada pelo metabolismo intracelular da frutose, o que não ocorre com a glicose. Apesar de consumir 2 moléculas de ATP na glicólise, seu saldo final ainda é favorável quando a glicose é utilizada, pois na via glicolítica a mesma produz quatro moléculas de ATP até formar piruvato. Já a fosforilação da frutose à frutose-1-fosfato pela frutocinase, consome um ATP e é bastante rápida devido à alta afinidade dessa enzima pela frutose e a falta de feedback negativo para a mesma, levando a depleção de ATP e fosfato intracelular, bem como aumento na formação de AMP (Fig. 03) (JOHNSON; SANCHEZ-LOZADA; NAKAGAWA, 2010; LANASPA et al., 2012). Devido a este fato, ocorre ativação de AMP deaminase e aumento de IMP, que é degradado a xantina e hipoxantina pela via da

xantina oxidase, formando ao final ácido úrico (JOHNSON et al., 2013; OUYANG et al., 2008; RHO; ZHU; CHOI, 2011). Após o consumo de frutose, os níveis plasmáticos de ácido úrico podem subir de 1 para 4 mg/dl em 30 minutos (STIRPE et al., 1970).

O aumento dos níveis plasmáticos de ácido úrico contribui para a progressão da síndrome metabólica (MILLER; ADELI, 2008; FERDER; FERDER; INSERRA, 2010), para o desenvolvimento de hipertensão arterial (FERDER; FERDER; INSERRA, 2010) e doença cardiovascular (GUN et al., 2016). Isso ocorre porque apesar de o ácido úrico ser considerado um antioxidante no meio extracelular, estudos realizados com diversos tipos de células demonstraram que, quando passa para o meio intracelular, o ácido úrico induz aumento do estresse oxidativo por ativar a enzima NADPH oxidase (CORRY et al., 2008; LANASPA et al., 2012; SÁNCHEZ-LOZADA et al., 2012; SAUTIN et al., 2007, 2007; YU et al., 2010). Além disso, o ácido úrico pode reagir com o radical peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) formando diferentes espécies de radicais livres, além de inativar diretamente e de forma irreversível o óxido nítrico (ON), levando a disfunções vasculares e hipertensão arterial (GERSCH et al., 2008; IMARAM et al., 2010).

A frutose-1-fosfato pode ser convertida em gliceraldeído e diidroxiacetona fosfato pela enzima aldolase B (Fig. 03). A diidroxiacetona fosfato por sua vez, pode ser convertida a glicerol-3-fosfato, fornecendo assim a porção glicerol para a síntese de triglicerídeos (HAVEL, 2005). Além disso, o glicerol-3-fosfato pode ser convertido a piruvato, e este, em acetil-CoA, gerando substratos para a síntese de ácidos graxos. Por fornecer ambos, glicerol-3-fosfato e os substratos para a síntese de ácidos graxos, a frutose leva ao aumento do processo *de novo* da lipogênese (PARKS et al., 2008; SCHWARZ et al., 2015). Quando em excesso, a diidroxiacetona e o gliceraldeído-3-fosfato são convertidos em compostos dicarbonilas, como glioxal e metilglioxal (MGO), os quais são altamente reativos e aumentam a formação de produtos de glicação avançada (*advanced glycation end products* - AGEs) (MASTERJOHN et al., 2013).



**Figura 3 – Metabolismo hepático da frutose.** Ao entrar na célula a frutose é fosforilada pela frutocinase formando frutose-1-fosfato e no processo há consumo de ATP. A frutose-1-fosfato é convertida em trioses (diidroxiacetona-fosfato e gliceraldeído) pela ação da enzima aldolase B, as quais levam ao aumento do fluxo da via glicolítica e consequentemente dos seus produtos. O excesso de Acetil-CoA, juntamente com glicerol-3-fosfato, contribui para o aumento na síntese de VLDL rica em triglicerídeos. Adaptado de ELLIOTT et al., 2002; JOHNSON et al., 2013.

### 1.6 Patologias associadas ao consumo de frutose

Por ser predominantemente metabolizada no fígado, o consumo de frutose causa aumento dos triglicerídeos plasmáticos por estimular o processo *de novo* de lipogênese (PARKS et al., 2008; SCHWARZ et al., 2015). Ao mesmo tempo que inibe a oxidação hepática de lipídios, a frutose favorece a reesterificação e a síntese de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) rica em triglicerídeos (TG), levando a

dislipidemia (TEFF et al., 2004; TOPPING; MAYES, 1972). O aumento nos níveis circulantes de lipídios pode levar ao acúmulo de gordura intra-hepática e visceral e diminuição da sensibilidade à insulina (TAPPY; LÊ, 2010), resultando no desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes.

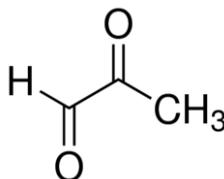
A frutose causa aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Em estudo de Nagai (1997), foi demonstrado que durante o processo de conversão dos produtos intermediários formados pela reação de Maillard (produtos de Amadori ou produtos de Heyns) em AGEs, ocorre a liberação de radical superóxido ( $O_2^-$ ) (NAGAI et al., 1997). Isso é relevante porque como a frutose é mais reativa que a glicose para a reação de Maillard, estudos mostram que ela gera até 100 vezes mais ERO que a glicose durante o processo de formação de AGEs (BOSE; CHAKRABORTI, 2008; BUNN; HIGGINS, 1981). O aumento na formação de ERO pode levar ao aparecimento de danos oxidativos em proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, caso estas moléculas não sejam neutralizadas por defesas antioxidantes. Além disso, por ser um monossacarídeo, a frutose pode sofrer auto-oxidação por um processo conhecido como via de Wolff, durante o qual, ERO também são formadas (THORNALLEY et al., 1984; WOLFF; JIANG; HUNT, 1991).

Além do aumento na formação de ERO, a frutose também favorece processos inflamatórios. A frutose aumenta a produção do fator de necrose tumoral alfa ( $TNF-\alpha$ ) (PEKTAS et al., 2016; YUAN et al., 2016), ativa o mediador inflamatório STAT-3 (ROGLANS et al., 2007), ativa o fator de transcrição nuclear kappa B ( $NF-\kappa B$ ) e aumenta os níveis da interleucina  $1\beta$  ( $IL-1\beta$ ) (KOVACEVIĆ et al., 2015; XU et al., 2016). Acredita-se que os principais mecanismos pelos quais a frutose cause resistência à insulina sejam pelo aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e nos níveis de ácidos graxos livres plasmáticos causados pelo seu metabolismo (FAEH et al., 2005; WEI; PAGLIASSOTTI, 2004), bem como pelo aumento do dano oxidativo (COUTURIER et al., 2016; LÊ; TAPPY, 2006).

Além das alterações no metabolismo periférico, estudos têm demonstrado que o consumo de frutose é também considerado um fator de risco para o desenvolvimento de demência e perda na capacidade cognitiva em humanos e animais (YE et al., 2011; AGRAWAL; GOMEZ-PINILLA, 2012). Acredita-se que um dos principais motivos relacionados aos efeitos da frutose sobre o SNC seja devido ao aumento na formação de compostos dicarbonílicos e AGEs decorrentes do seu metabolismo (HASSEL et al., 2015; LUSTIG; SCHMIDT; BRINDIS, 2012).

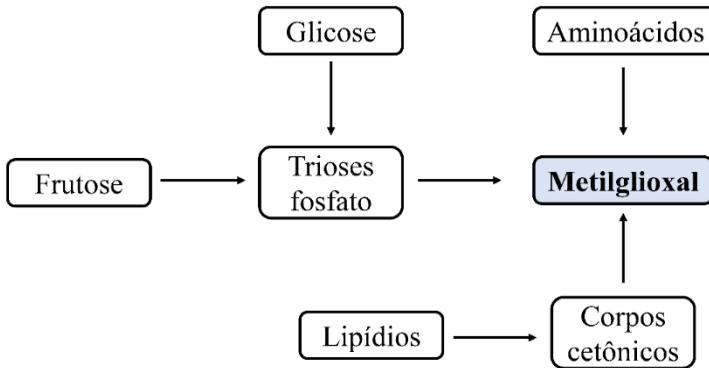
### 1.7 Compostos dicarbonila provenientes do metabolismo da frutose

Conforme ilustrado na Figura 03, a enzima aldolase B catalisa a conversão de frutose-1-fosfato a gliceraldeído e diidroxiacetona fosfato. O gliceraldeído pode ser fosforilado pela triose cinase a gliceraldeído-3-fosfato, formando assim, juntamente com a diidroxiacetona fosfato, as trioses intermediárias da via glicolítica. O acúmulo dessas trioses gera espontaneamente dicarbonilas reativas, sendo uma das principais o MGO (Fig. 04) (CHATHAM; GILBERT; RADD, 1989; ABORDO; MINHAS; THORNALLEY, 1999).



**Figura 4 – Representação da estrutura química do metilglioxal.**  
Adaptado de RABBANI; THORNALLEY, 2014b.

O MGO é um  $\alpha$ -oxoaldeído tóxico, produzido de forma ubíqua pelo metabolismo celular, estando presente em todos os tipos celulares em condições fisiológicas e patológicas (ALLAMAN; BÉLANGER; MAGISTRETTI, 2015). Apesar de o MGO ser formado como um subproduto do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (Fig. 05), a rota metabólica de maior relevância para a sua formação é a glicólise (KALAPOS, 1999; THORNALLEY, 1996; VANDER JAGT; HUNSAKER, 2003).



**Figura 5 – Representação das principais rotas de formação do metilglioxal.** A principal rota de formação do metilglioxal é através do aumento na formação de trioses fosfato que ocorre principalmente pelo aumento do consumo de açúcares, como frutose e glicose. Além disso, o metilglioxal pode ser formado também através do metabolismo de alguns aminoácidos e dos corpos cetônicos, provenientes do metabolismo de lipídios. Adaptado de BEISSWENGER et al., 2005.

Estima-se que 0,05 – 0,1 % do fluxo da via glicolítica seja desviado para a produção de MGO através da degradação de trioses fosfato (RABBANI; THORNALLEY, 2015, p. 201). O cérebro, por ser um órgão com alto fluxo glicolítico utilizado para a obtenção de energia, gera invariavelmente níveis elevados de MGO. Como consequência disso, a concentração de MGO no líquido cefalorraquidiano é muito maior que no plasma. As concentrações plasmáticas de MGO em humanos são de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  (BEISSWENGER et al., 2005, 1999) e no líquido cefalorraquidiano podem chegar a 10  $\mu\text{M}$  (KUHLA et al., 2005). Além disso, em humanos, a taxa de formação corporal total de MGO estimada é de 3 mmol por dia (RABBANI; THORNALLEY, 2014b). Em camundongos, as concentrações plasmáticas de MGO são da ordem de 0,1 a 0,5  $\mu\text{M}$  (KALAPOUS, 2013), e no líquido cefalorraquidiano em torno de 5  $\mu\text{M}$  (DISTLER et al., 2012).

O MGO pode se difundir através das membranas biológicas quando na forma livre. O tempo médio para o MGO reagir com uma

molécula da água e sofrer hidratação é de 4 minutos, perdendo sua capacidade de difusão facilitada após essa reação (RABBANI; THORNALLEY, 2014b). Em estudo *in situ* foi demonstrado que o tempo médio para a metabolização do MGO a D-lactato pelo sistema da glicoxalase é de 10 minutos, permitindo sua difusão (RABBANI; THORNALLEY, 2015).

Foi demonstrado que o tempo aproximado para o MGO se ligar de forma irreversível a proteínas plasmáticas é de 3,6 h (RABBANI; THORNALLEY, 2015). Dessa maneira, em condições normais, 90 – 99% do MGO intracelular está ligado a macromoléculas, sendo que os níveis totais de MGO (livre + ligado) podem chegar a concentrações maiores que 300  $\mu\text{M}$  (THORNALLEY, 1996).

Em indivíduos com doença de Alzheimer, por exemplo, os níveis de MGO no líquido cefalorraquidiano são até 2 vezes maiores (20  $\mu\text{M}$ ) que em indivíduos saudáveis (KUHLA et al., 2005). Além disso, estudos demonstraram aumento na concentração de MGO no sangue de indivíduos com diabetes. Em indivíduos com diabetes tipo 1 os níveis de MGP chegam a ser 5-6 vezes maiores, e em indivíduos com diabetes tipo 2, 2-3 vezes maiores, quando em comparação com indivíduos saudáveis (MCLELLAN et al., 1994; THORNALLEY et al., 1989). A hiperglicemia crônica nos indivíduos diabéticos gera acúmulo de glicose e aumento na formação de intermediários da via glicolítica, favorecendo a formação de MGO (BROWNLEE, 2001; SHEETZ MJ; KING GL, 2002; BEISSWENGER et al., 2005b).

Os açúcares redutores e seus derivados, dentre os quais o MGO, participam da reação de Maillard, formando compostos que se auto-oxidam e dão origem aos AGEs (DILLS, 1993; ZHANG et al., 2009). Por ser altamente eletrofílico, o MGO é mais reativo via reação de Maillard que os próprios açúcares redutores, favorecendo consideravelmente a formação de AGEs (DHAR et al., 2009; THORNALLEY, 2005). De forma impressionante, a taxa de reação do MGO para a reação de Maillard é 20.000 vezes maior que a taxa de reação da glicose (THORNALLEY, 2005).

O processo de formação dos AGEs é complexo e envolve múltiplas reações. Durante a reação clássica de Maillard, grupos carbonílicos eletrofílicos de açúcares redutores e seus metabólitos, como o MGO, reagem com grupamentos amino livres de aminoácidos (principalmente os resíduos básicos de lisina e arginina), formando as bases de Schiff que são bastante instáveis (PAUL; BAILEY, 1996). Rearranjos subsequentes dessas moléculas levam a formação de compostos mais estáveis chamados de produtos de Amadori (para

glicose) ou produtos de Heyns (para a frutose) (AHMED, 2005; PAUL; BAILEY, 1996). As bases de Schiff e os produtos de Amadori e Heyns são produtos que podem sofrer reações reversíveis. Mas, estes compostos podem também reagir com outros grupamentos amino de aminoácidos de proteínas, formando compostos estáveis e irreversíveis, os AGEs (PAUL; BAILEY, 1996; AHMED, 2005). Moléculas como o oxigênio, ERO e metais de transição podem acelerar o processo de formação de AGEs (THORPE; BAYNES, 2003; AHMED, 2005).

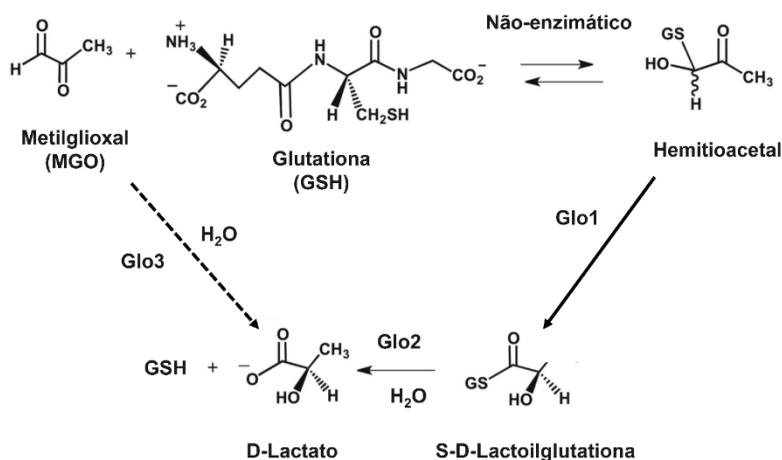
Proteínas modificadas pela formação de AGEs podem ativar receptores conhecidos como receptores de AGEs (RAGE), que levam a ativação de vias relacionadas à inflamação e aumento do estresse oxidativo (RAY; JURANEK; RAI, 2016; SORCI et al., 2013; TÓBON-VELASCO; CUEVAS; TORRES-RAMOS, 2014). Além disso, a formação de AGEs acelera o processo de envelhecimento celular e o aparecimento de complicações associadas a idade. Os AGEs, não só favorecem o aparecimento de patologias como a diabetes e as doenças cardiovasculares (GABY, 2005), mas também a neuroinflamação e o declínio da função cognitiva (FANG et al., 2010; GONZÁLEZ-REYES; GRACIELA RUBIANO, 2016).

Além de seu efeito no metabolismo, o MGO parece influenciar o comportamento, conforme demonstrado em estudos pré-clínicos. A administração de MGO tem efeito ansiolítico, diminuindo comportamentos do tipo ansiosos em animais por agir como um agonista de receptor GABA, neurotransmissor com função inibitória no SNC (DISTLER et al., 2012). Além disso, o MGO tem efeito atenuante sobre convulsões em modelos de estudo de epilepsia (DISTLER et al., 2013). Estudos têm sugerido que aumentos dos níveis de MGO estão correlacionados com a diminuição da capacidade locomotora, ataxia e hipotermia em camundongos (DISTLER et al., 2013), bem como diminuição da capacidade cognitiva (HANSEN et al., 2016).

## 1.8 Sistema da glicoxalase

Sob condições fisiológicas normais, os níveis de MGO são mantido baixos através da ação do sistema da glicoxalase, que é composto pelas enzimas glicoxalase I e II (Glo1 e Glo2) e dependente de glutathiona (GSH) (THORNALLEY, 1996). O sistema enzimático da glicoxalase é composto por um grupo de enzimas responsáveis pela conversão de  $\alpha$ -cetoaldeídos a D-hidroxiácidos (THORNALLEY, 1990; SOUSA SILVA et al., 2013). No caso específico do MGO, o produto final da reação é o D-lactato. Diversas isoformas de glicoxalases já foram identificadas. A

Glo1 converte o metabólito hemitioacetil, composto oriundo da reação espontânea entre o grupamento tiol da GSH com o  $\alpha$ -cetoaldeído do MGO, formando como produto um tioéster (Fig. 06) (ARONSSON; MARMSTÅL; MANNERVIK, 1978; MANNERVIK; RIDDERSTRÖM, 1993). Da reação entre o MGO e a GSH, é formada a S-D-lactoilglutaciona. A enzima Glo2 hidrolisa este produto em D-lactato, regenerando a grupamento tiol da GSH. Dessa maneira, a eliminação do MGO e a formação de D-lactato é feita através de maneira sincronizada e interdependente, entre as enzimas Glo1 e a Glo2. Estudos demonstraram a existência de Glo3, a qual converte diretamente MGO em D-lactato/L-lactato (Fig. 06), entretanto, esta enzima só foi encontrada em bactérias (LEE et al., 2012; CHOI et al., 2014; HASIM et al., 2014; ZHAO et al., 2014).



**Figura 6 – Esquema das reações enzimáticas do sistema da glicoxalase.** O MGO se conjuga de forma espontânea com GSH formando hemitioacetil, que é metabolizado pela Glo1 a S-D-lactoilglutaciona, e este, é metabolizado enzimaticamente pela Glo2 a D-lactato, regenerando GSH no processo. Além disso, a Glo3 pode metabolizar o MGO a D-lactato de forma direta. Adaptado de HONEK, 2015.

Estudos demonstraram que há diminuição na expressão de Glo1 na presença de hiperglicemia (diabetes) (HAMOUDANE et al., 2015; RABBANI; THORNALLEY, 2014), inflamação (HANSSSEN et al., 2014), hipóxia (HANSSSEN et al., 2014) e envelhecimento (MORCOS et al., 2008). Estas alterações são acompanhadas por aumentos nos níveis de MGO, indicando que esta via é essencial, não só nas complicações decorrentes da diabetes (HOVATTA et al., 2005; RABBANI; THORNALLEY, 2014a), mas também em outras patologias relacionadas ao envelhecimento (HANSSSEN et al., 2014).

Diversas alterações comportamentais têm sido associadas a alterações nos níveis de Glo1. Aumentos na expressão e atividade da Glo1 induzem aumento de comportamentos do tipo ansiosos em animais (HOVATTA et al., 2005; DISTLER et al., 2012). Além disso, a inibição farmacológica da Glo1 em modelo animal de estudo de epilepsia levou a atenuação da intensidade das convulsões, enquanto que aumentos na expressão da Glo1 levaram ao aumento da susceptibilidade e severidade de crises convulsivas em animais (DISTLER et al., 2013). Estudos clínicos sugerem que expressões aberrantes de Glo1 estão correlacionadas com transtorno depressivo, transtorno do pânico e esquizofrenia (HAMBSCHE, 2011). Aumentos na expressão e na atividade da Glo1 diminuem de forma significativa os níveis de MGO e AGEs no plasma de roedores (BROUWERS et al., 2011), além de diminuir os níveis de AGEs no hipocampo, e reverter o dano cognitivo de animais em modelos de diabetes (LIU et al., 2013).

A atividade da Glo1 é diretamente dependente da conjugação espontânea do MGO com a GSH (HAMOUDANE et al., 2015; KALAPOUS, 2008). Aumento nos níveis de MGO intracelular estão relacionados a diminuição nos níveis de GSH (DAFRE et al., 2015a; KALAPOUS, 2008) e de grupamentos tióis de proteínas (DAFRE et al., 2015a; EBERHARDT et al., 2012; OKOUCHI; OKAYAMA; AW, 2005). Dessa maneira, por ter alta afinidade por grupamentos tióis, os efeitos citotóxicos do MGO parecem ser mediados, ao menos em parte, pela reatividade do MGO com resíduos de cisteína reativos e pela diminuição dos níveis de GSH intracelular, fato que contribui para o aumento do dano oxidativo (KALAPOUS, 2008; DAFRE et al., 2015a).

### 1.9 Papel dos tióis e de sistemas antioxidantes na homeostase celular

O grupamento químico tiol (ou sulfidríla) (-SH) está presente em proteínas e em moléculas de baixo peso molecular como a cisteína, a GSH, e o ácido lipóico, por exemplo (POOLE, 2015). O grupo tiol é

ionizável e após sofrer desprotonação dá origem ao ânion tiolato, que é a forma reativa (POOLE, 2015; WEERAPANA et al., 2010). O ânion tiolato pode reagir com moléculas eletrofílicas, ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN), além de levar a modificações pós-translacionais de proteínas, as quais podem alterar suas funções (POOLE, 2015). Os grupamentos tióis são fundamentais nos processos de regulação redox nas células (POOLE, 2015; WEERAPANA et al., 2010).

A GSH é um dos principais tióis de baixo peso molecular e está presente de forma ubíqua nas células (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009; MASELLA et al., 2005; POOLE, 2015). A GSH é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos cisteína, glutamato e glicina e está presente de forma abundante no citosol (2-10 mM), no núcleo e na mitocôndria (SHEN et al., 2005). A GSH tem papel fundamental na manutenção do equilíbrio redox celular, pois pode participar diretamente da eliminação de radicais livres por sua ação antioxidante, conjugar-se com compostos eletrofílicos ou participar das reações enzimáticas envolvidas na redução de peróxidos. A enzima glutationa S-transferase (GST) catalisa a conjugação de moléculas eletrofílicas com a GSH e a glutationa peroxidase (GPx) utiliza os equivalentes redutores da GSH para eliminar peróxidos (MAHER, 2005). O produto resultante da oxidação da GSH, a partir da reação catalisada pela GPx, é a GSSG, que pode ser reconvertida em GSH pela ação da enzima glutationa redutase (GR), em uma reação depende da presença de NADPH como doador de elétrons (COUTO; WOOD; BARBER, 2016; MAHER, 2005). Além disso, o sistema GSH/GSSG, atua na manutenção do estado redox característico da célula, da mesma forma que o sistema da tiorredoxina (SCHAFER; BUETTNER, 2001).

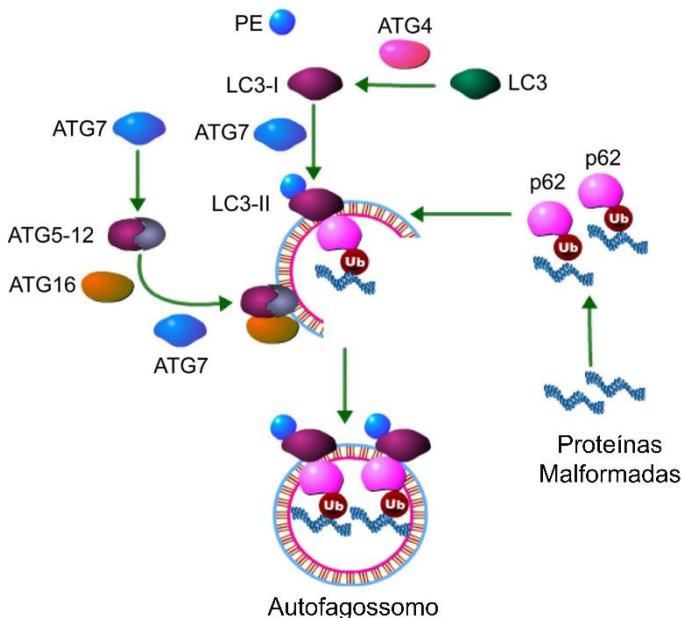
O sistema da tiorredoxina é formado pela tiorredoxina (Trx), tiorredoxina redutase (TrxR) e NADPH. Neste sistema, a Trx doa elétrons para diversas enzimas como peroxirredoxinas (Prx), ribonucleotídeo redutase e GPx (LU; HOLMGREN, 2012, 2014b). No processo, a Trx se oxida e é novamente reduzida pela ação TrxR, a qual utiliza elétrons vindos do NADPH para reduzir uma ponte dissulfeto intramolecular da Trx, regenerando sua atividade. Este sistema tem função de reduzir dissulfetos de proteínas e, juntamente com o sistema da GSH, tem papel essencial na manutenção do ambiente redox da célula. Além disso, da mesma forma que outras proteínas, ambas, Trx e TrxR, apresentam cisteínas reativas que são bastante sensíveis a estresse oxidativo (CHENG et al., 2011), podendo constituir possíveis alvos moleculares para reação com o MGO.

Um aspecto bastante relevante para a manutenção dos níveis de Trx na célula, é que esta pode sofrer inibição por uma proteína chamada de proteína de interação com a Trx (Txnip). Estudos mostram que a Txnip pode ligar-se diretamente no sítio catalítico da Trx em sua forma reduzida, inibindo tanto sua expressão quanto sua atividade (YAMANAKA et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2002). Quando inativa, a Trx não pode servir como doadora de elétrons para outras proteínas gerando acúmulo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e alteração do equilíbrio redox celular (RHEE et al., 2001). Além disso, evidências experimentais sugerem que a expressão da Txnip é modulada através dos níveis de glicose, ou seja, em estados de hiperglicemia e diabetes há aumento na expressão celular dessa proteína (SCHULZE et al., 2004; SU et al., 2013).

Além disso, estudos prévios do nosso grupo já demonstraram que em células neuronais HT22 o MGO induz diminuição na atividade e no imunocontêidos de TrxR, bem como de Glo2 (DAFRE et al., 2015a). Mas de modo interessante, esses efeitos são dependentes do tempo e da concentração de MGO presente no meio. No entanto, o mecanismo pelo qual o MGO induz a degradação da TrxR e Glo2, ainda são desconhecidos, mas acredita-se que uma possível explicação para esse fato possa ser que o MGO cause indução de mecanismos de sobrevivência celular, dentre os quais a autofagia (LEVINE; KLIONSKY, 2004).

### 1.10 Autofagia como um mecanismo de sobrevivência celular

A autofagia (Fig. 7) é um mecanismo de sobrevivência celular ativado principalmente quando há privação de nutrientes, uma vez que a utilização dos constituintes celulares como fonte de energia aumenta a sobrevivência celular (LEVINE; KLIONSKY, 2004). A autofagia consiste no sequestro de componentes citoplasmáticos (organelas e proteínas, por exemplo) dentro de membranas lipídicas para posterior digestão. O processo de autofagia inicia-se com a formação do fagóforo (ou membrana de isolamento), o qual consiste no alongamento de uma porção de bicamada lipídica, a qual então, engolfa o conteúdo celular a ser degradado, formando assim o autofagossomo. O processo de formação e maturação do fagossomo é complexo e requer ao menos a participação de dezesseis tipos diferentes de proteínas relacionadas a autofagia (Atg) (MEIJER; CODOGNO, 2011).



**Figura 7 – Representação esquemática das proteínas envolvidas no processo de autofagia.** O LC3 sofre clivagem pelo ATG4, formando LC3-I. ATG7 faz a conjugação de ATG5 e ATG12, além de conjugar o lipídio fosfoetildiletanolamina (PE) ao LC3-I convertendo-o em LC3-II. O complexo ATG5-ATG12-ATG16 é necessário para a formação do autofagossomos. O LC3-II promove a elongação da membrana através de sua associação a membrana autófagossomal. A proteína adaptadora p62 liga-se diretamente a proteína ubiquitina (Ub) agindo como um receptor de proteínas ubiquitinadas. Através de sua ligação ao LC3-II, o p62 facilita a autofagia por localizar-se em compartimentos autófágicos, transportar proteínas ubiquitinadas e organelas para a degradação. Adaptado de BANDUSEELA et al., 2013.

A elongação, maturação e fechamento do autofagossomos são dependentes da ação da proteína associada a microtúbulos de cadeia leve (LC3) (FENG et al., 2014; LEE; LEE, 2016). Uma vez iniciado o processo de autofagia, o LC3 é clivado pela protease Atg4 de modo que o resíduo de glicina de sua porção C-terminal fique exposto formando

LC3-I. Em seguida, o LC3-I é conjugado à fosfatidiletanolamina (PE) pela ação de diversas Atgs (Atg7, Atg5-12 e Atg16) formando LC3-II (ou LC3-PE), o qual é correlacionado com o número de autofagossomos presentes na célula (BANDUSEELA et al., 2013). Além disso, para que os componentes marcados para a degradação sejam direcionados para o autofagossomos, faz-se necessária a presença de uma proteína adaptadora, chamada p62, a qual faz o reconhecimento dos sítios de ubiquina (proteína de marcação para a degradação) e de LC3, direcionando portanto, a localização do autofagossomos na célula (JIANG et al., 2015; KATSURAGI; ICHIMURA; KOMATSU, 2015).

Após sua formação, a membrana externa do autofagossomo funde-se com a membrana de lisossomos formando o autolisossomo, responsável pela digestão do conteúdo intravesicular através da ação de hidrolases lisossomais (RAVIKUMAR et al., 2010; TOOZE; YOSHIMORI, 2010). As moléculas oriundas do processo de digestão lisossomal são transportadas de volta ao citosol servindo como fonte de nutrientes para o fornecimento de energia ou biossíntese de macromoléculas. Esse processo de autodigestão é altamente conservado de leveduras a humanos e tem papel essencial para o desenvolvimento, defesa imune, neurodegeneração, câncer e envelhecimento (MIZUSHIMA, 2011; NAKATOGAWA et al., 2009).

A autofagia é estritamente controlada pela via de sinalização da proteína alvo da rapamicina (mTOR), a qual é principalmente regulada por fatores de crescimento e aminoácidos (MEIJER; CODOGNO, 2009; MIZUSHIMA, 2010). Em mamíferos, a mTOR é responsável pela regulação do crescimento e metabolismo celular (WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006). A mTOR encontra-se em dois complexos funcionais e estruturais distintos denominados mTORC1 (formado por mTOR, GβL, PRAS40 e raptor) o qual é altamente sensível a rapamicina e a disponibilidade de nutrientes, e mTORC2 (composto por mTOR, GβL, mSin1 e rictor) o qual é praticamente insensível a rapamicina (WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006). A ativação da proteína raptor por fosforilação, causa alterações conformacionais no complexo mTORC1 essenciais para a fosforilação de seus substratos *downstream* como a proteína ribossomal S6 cinase (p70S6K) e o fator de iniciação 4E ligador da proteína 1 (4EBP1) responsáveis pela síntese proteica (WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006), bem como fosforilação da proteína Ulk1, levando a inibição da autofagia (GANLEY et al., 2009; HOSOKAWA et al., 2009). Além disso, a inibição do complexo mTORC1 através de tratamento farmacológico com rapamicina causa ativação da autofagia (MEIJER; CODOGNO, 2009).

A autofagia pode também ser ativada pela diminuição dos níveis energéticos da célula. Diminuições na relação celular de ATP/ADP causam ativação da proteína cinase ativada por AMP (AMPK), a qual atua como um sensor energético, controlando o metabolismo celular de acordo com as variações na disponibilidade de nutrientes e de energia (HARDIE; ROSS; HAWLEY, 2012). Além disso, a ativação da AMPK causa inativação da mTOR de forma indireta, via fosforilação da proteína TSC2, ou da fosforilação do raptor (WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006). Dessa forma, a via de sinalização AMPK – mTOR mostra ser um importante alvo para o estudo da ativação de mecanismos relacionados a autofagia.



## 2. JUSTIFICATIVA

O consumo de frutose cresceu de forma alarmante nas últimas décadas, principalmente devido ao aumento da ingestão de refrigerantes, o que está associado ao desenvolvimento de DCNT como diabetes, resistência à insulina e obesidade (BASU et al., 2013; BRAY, 2010; BRAY; NIELSEN; POPKIN, 2004, p. 200). Entretanto, os efeitos do consumo de frutose sobre o SNC são pouco investigados e pouco se sabe sobre eles. Alguns estudos têm demonstrado que o consumo de frutose está relacionado a diminuição da neurogênese hipocampal, diminuição da capacidade cognitiva, de aprendizado e de memória (CHOU et al., 2016; CISTERNAS et al., 2015; RENDEIRO et al., 2015; WU et al., 2016). No entanto, pouco se sabe sobre quais são os mecanismos relacionados a estes efeitos da frutose sobre o SNC. Dessa maneira, fica evidente a importância de se investigar os efeitos da frutose sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos.

Além disso, a metabolização da frutose gera aumento de MGO e, dessa maneira, uma hipótese que deve ser investigada é se os efeitos da frutose são mediados *per se* ou causados de forma secundária, por meio do aumento na produção endógena de MGO. Segundo a literatura, sabe-se que alterações na expressão de Glo1, enzima que detoxifica o MGO, estão relacionadas ao aumento de ansiedade (DISTLER et al., 2012; HOVATTA et al., 2005) e comportamento do tipo depressivo (BENTON et al., 2012), no entanto, pouco se sabe sobre as possíveis vias de sinalização envolvidas neste processo.

Em recente trabalho de nosso grupo (DAFRE et al., 2015), e a partir de algumas evidências da literatura (OBA et al., 2012; TATSUNAMI et al., 2009b), o MGO parece afetar o sistema da glioxalase (Glo1/Glo2) e o sistema da tiorredoxina (Trx/TRxR). Estes efeitos foram investigados somente em linhagens celulares, e não há dados com o uso de sistemas mais complexos, como estudos *in vitro* com tecidos ou *in vivo*. Sabe-se que a inibição da TrxR leva ao aumento do estresse oxidativo (ZHANG et al., 2016) e que o estresse oxidativo parece ser o principal mecanismo de toxicidade do MGO (DHAR et al., 2016; SENA et al., 2012), entretanto, até o momento, não existem dados da literatura relatando se o comprometimento do sistema da tiorredoxina aumenta a toxicidade do MGO.

Além disso, o efeito do MGO sobre a enzima antioxidante GR ainda é desconhecido. Tendo esta uma estrutura muito similar à TrxR, e também por possuir cisteínas reativas, é possível que o MGO também afete a atividade e expressão da GR. A inibição da GR como alvo da

toxicidade de vários compostos já foi demonstrado pelo nosso grupo que a GR é (FRANCO et al., 2009; TREVISAN et al., 2014; UCHOA et al., 2016), justificando a hipótese apresentada.

Os mecanismos pelos quais o MGO afeta os sistemas da glioxalase e da tioredoxina, ainda são desconhecidos. Portanto, nos questionamos se as diminuições dos níveis de Trx1 e Glo2 poderiam ser mediados por degradação proteassomal ou autofágica. Além disso, a partir de experimentos preliminares do nosso grupo, verificamos que o MGO induz a fosforilação e ativação de AMPK em células HT22. Desta forma, não são claros os mecanismos pelos quais o MGO leva a diminuição nos níveis de Trx1 e Glo2, e se estes envolvem a ativação de autofagia ou degradação via proteassoma, bem como, se estes processos são mediados via atividade da AMPK.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar os possíveis efeitos do MGO sobre os parâmetros comportamentais e neuroquímicos em um modelo *in vivo* através do consumo de frutose, bem como os efeitos do MGO sobre os sistemas GSH/GR e Trx/TrxR em fatias de hipocampo e em cultura de células.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- a. Caracterizar os efeitos do consumo crônico de frutose em camundongos sobre (Tópico 4 – Capítulo 1):
  - Marcadores metabólicos periféricos como glicose plasmática, triglicerídeos plasmáticos e colesterol plasmático;
  - Perfil antioxidante do fígado, hipocampo, estriado e córtex pré-frontal;
  - Comportamentos do tipo ansioso, depressivo, locomotor, aprendizado e memória;
- b. Avaliar os efeitos *in vitro* do MGO em modelo de fatias hipocampais sobre (Tópico 5 – Capítulo 2):
  - Os níveis de GR, TrxR, Glo1 e Glo2;
  - Correlacionar os resultados com dados obtidos em células HT22
  - Verificar se a atividade GR ou TrxR participa da toxicidade do MGO
- c. Investigar os mecanismos moleculares relacionados ao tratamento *in vitro* com MGO sobre (Tópico 6 – Capítulo 5):
  - a. A glicação e ubiquitinação de proteínas
  - b. Marcadores de autofagia (p62 e LC3)
  - c. Vias de sinalização relacionadas à AMPK
  - d. Mecanismos que controlam a degradação de Trx1 e Glo2: autofagia *versus* proteassoma
  - e. Verificar se a degradação de Trx1 e Glo2 são controlados pela AMPK em células deficientes desta cinase.



**4. EFEITOS DO CONSUMO CRÔNICO DE FRUTOSE SOBRE  
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS  
(CAPÍTULO 1)**



## 4.1 Contextualização

O aumento no consumo de frutose tem sido associado ao aumento nos índices de desenvolvimento de DCNT, como obesidade, diabetes e hipertensão (BANTLE; LAINE; THOMAS, 1986; LIM et al., 2010; TAPPY; LÊ, 2010). Estudos já demonstraram que o consumo de frutose em ratos causa piora no desempenho em testes de memória (CHENG et al., 2013; ROSS et al., 2009; WU et al., 2015). Além disso, em estudo realizado com humanos, foi demonstrado que indivíduos idosos que consomem dietas ricas em açúcar, apresentam diminuição da capacidade cognitiva (YE et al., 2011). Portanto, no presente trabalho os efeitos do consumo crônico de frutose foram caracterizados sobre o perfil comportamental, metabólico e antioxidante de camundongos.

## 4.2 Materiais e métodos

### 4.2.1 Animais

Para o tratamento com frutose foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas de 9-12 meses de idade, com peso médio de 20 – 30gr. Os animais foram mantidos em ciclos de 12h/12h de claro e escuro, com temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , água e comida *ad libidum*. Casais de camundongos C57BL/6 foram gentilmente cedidos pelo prof. Dr. Rui D. Prediger, do Departamento de Farmacologia da UFSC, e a partir destes foi instalada uma colônia própria para a reprodução e manutenção dos camundongos. Todos os procedimentos envolvendo animais foram executados de acordo com as normas do Comitê de Ética da UFSC, sob aprovação do protocolo PP00735.

### 4.2.2 Tratamentos

Para o tratamento com frutose, os animais foram divididos em grupo controle e grupo frutose. O grupo controle recebeu apenas água e o grupo frutose recebeu uma solução contendo 10% de frutose diluída em água por 12 semanas *ad libitum*, conforme dados prévios da literatura (DE ANGELIS et al., 2012; WU et al., 2015). Ambos os grupos receberam ração peletizada padrão (26% proteína, 74% carboidrato e 4% lipídio) *ad libitum*. O consumo de líquido e de ração foi monitorado semanalmente durante todo o tratamento, bem como o peso corporal dos animais. Os testes de comportamento foram realizados ao longo da última semana de tratamento (11<sup>o</sup> semana). 48h após o final dos testes de comportamento, os animais foram anestesiados com isoflurano e mortos por punção cardíaca. Após a eutanásia dos animais, houve a rápida dissecação do córtex pré-frontal, do estriado e do hipocampo, em placa de Petri invertida sobre o gelo. Em seguida, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para as análises bioquímicas.

### 4.2.3 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados durante o ciclo claro dos animais, entre 10h da manhã e 15h da tarde. Como o número de comportamentos realizados foi bastante abrangente, diversos grupos experimentais foram utilizados. Para cada nova bateria de testes, os animais eram primeiramente submetidos ao teste do campo aberto, e em

seguida, os testes eram aplicados sempre na ordem do menos aversivo para o mais aversivo. Para a iluminação da sala na qual os comportamentos foram realizados, utilizou-se uma lâmpada de cor vermelha para que o ambiente se tornasse menos aversivo para os camundongos. A limpeza dos aparatos foi feita com álcool 10%, sendo que estes foram limpos a cada troca de animal. Todos os testes foram filmados para posterior análise dos dados.

#### 4.2.3.1 Teste do campo aberto

O teste do campo aberto permite a avaliação da atividade locomotora e exploratória do animal. Para a realização do teste, os animais foram colocados individualmente, em uma caixa de acrílico medindo 40 cm de largura, por 40 cm de comprimento e 30 cm de altura. Os animais foram colocados em um dos cantos da caixa, de frente para a arena. A atividade locomotora dos animais foi filmada por um período de 5 minutos e posteriormente analisada pelo software ANY-maze (CAPRA et al., 2010; GONÇALVES et al., 2011).

#### 4.2.3.2 Teste de realocação do objeto

O teste de realocação do objeto foi realizado de acordo com o método previamente descrito na literatura (ASSINI; DUZZIONI; TAKAHASHI, 2009). Os animais foram colocados no centro do campo aberto, diante de dois objetos idênticos, afastados 7 cm das paredes e o tempo de exploração dos objetos foi avaliado durante cinco minutos. Para que o animal pudesse se localizar na arena, pistas foram coladas nas paredes do aparato. Os animais foram reexpostos ao aparato para a sessão de teste 90 minutos após a sessão de treino. Para o teste, um dos objetos foi trocado de lugar e o tempo de exploração de cada objeto foi avaliado novamente durante 5 minutos. Eram considerados parâmetros de exploração quando o animal olhava, cheirava ou estava perto do objeto investigando-o com menos de 1 cm de distância. O desempenho cognitivo dos animais foi analisado por meio do índice de localização descrito por (MURAI et al., 2007):  $(T \text{ novo} \times 100) / (T \text{ novo} + T \text{ familiar})$ , onde T novo é o tempo de exploração do objeto novo (trocado) e T familiar é o tempo gasto explorando o objeto familiar (não-trocado).

#### 4.2.3.3 Teste caixa claro-escuro

Este teste comportamental baseia-se na aversão natural de camundongos a ambientes claros, avaliando, portanto, comportamentos do tipo ansiogênicos e ansiolíticos (BOURIN; HASCOËT, 2003; TAKAO; MIYAKAWA, 2006). O aparato para a realização do teste consiste em uma caixa feita de acrílico (46 cm de comprimento, 20 cm de largura e 30 cm de altura), sendo o comprimento da parte clara de 30 cm e o da parte escura de 15 cm. Os compartimentos foram separados por uma abertura de 7 cm de largura por 1 cm de comprimento. Os animais foram colocados individualmente no compartimento claro, podendo circular livremente por todo o aparato durante 5 minutos. O tempo de permanência no compartimento claro é contabilizado, bem como o número de cruzamentos entre as áreas.

#### 4.2.3.4 Teste do labirinto em Y

O teste do labirinto em Y tem por finalidade avaliar a memória de trabalho do animal (HUGHES, 2004). O aparato utilizado é feito de madeira, pintado de preto, e consiste em três braços de igual tamanho (28 cm de comprimento, 25 cm de altura e 5 cm de largura) posicionados em ângulos iguais, e a 30 cm de altura do chão. Os camundongos foram colocados no final de um dos braços, podendo se mover livremente por todo o labirinto durante 8 minutos. Considera-se o animal dentro do braço quando este entra com as quatro patas no mesmo. Neste teste avalia-se o número de alternâncias que o animal faz entre os três braços. A alternância é definida como sendo a exploração sequencial dos três braços e contada somente se o animal entrar nos três braços do labirinto sem repetir a primeira e a terceira entrada. A porcentagem de alternância espontânea foi calculada como sendo a relação das sequências corretas dividido pelo total de sequências possíveis (definido como o número total de entradas menos 2) multiplicado por 100. Considera-se bons parâmetros de memória se o animal não repetir as entradas em braços previamente visitados.

#### 4.2.3.5 Teste do labirinto elevado em cruz

Este teste foi utilizado com o objetivo de detectar tanto comportamentos do tipo ansiolítico como ansiogênicos em camundongos (LISTER, 1987). O aparato consiste em quatro braços de madeira cobertos com material impermeável, com dimensões de 36 cm de

comprimento e 5 cm de largura. Os braços foram mantidos a uma altura de 40cm do chão, dois deles, em direções opostas são cercados por elevações laterais com 15 cm de altura (braços fechados), e os outros dois braços não apresentam qualquer proteção lateral (braços abertos). Os quatro braços foram conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). O teste consiste em colocar o animal no centro do labirinto com a cabeça virada para os braços fechados, e monitorar o seu comportamento por cinco minutos. São considerados comportamentos do tipo ansiogênico, quando a proporção de entradas nos braços abertos é menor em relação as entradas nos braços fechados dividido pelo número total de entradas, bem como o tempo de permanência nos braços abertos em relação ao tempo total explorando ambos os braços. O tempo de permanência em qualquer dos braços foi contado a partir do momento em que o animal entrava com as quatro patas em um dos braços. O número total de entradas nos braços abertos e fechados foi utilizado como um parâmetro de aferição da atividade locomotora.

#### 4.2.3.6 *Pole test*

O objetivo do desse teste é avaliar a agilidade e a bradicinesia do animal, sendo, portanto, um teste que visa a avaliação motora. Neste teste, uma barra vertical rugosa (50 cm de altura e 1 cm de diâmetro) foi colocada na caixa do animal. O mesmo foi colocado com a cabeça virada para cima no topo da barra. Avalia-se o tempo que o animal demora para se orientar com a cabeça para baixo e o tempo de descida. Os animais são expostos a cinco tentativas e o melhor tempo é utilizado, até um limite de 120 segundos. O nível máximo de comprometimento motor foi considerado quando o animal foi incapaz de se posicionar para descida com a cabeça orientada para baixo ou quando sofreu queda da barra (FLEMING et al., 2004).

#### 4.2.3.7 Teste de suspensão pela cauda

O teste de suspensão pela cauda em camundongos, é um teste preditivo de comportamentos do tipo depressivo ou do tipo antidepressivo (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). O teste consiste em suspender o camundongo pela cauda em uma plataforma com 50 cm de altura do chão. Para prender o animal foi utilizado uma fita adesiva colocada a aproximadamente 1 cm da ponta da cauda. Considera-se que o animal apresenta comportamento do tipo depressivo quando o tempo de

imobilidade está aumentado. O tempo de duração do teste foi de 6 minutos e os camundongos foram submetidos individualmente ao teste.

#### 4.2.3.8 Teste do *Rotarod*

O teste do *rotarod* tem por finalidade a avaliação da integridade do sistema motor dos animais. O aparato é composto por um cilindro giratório medindo 30 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro. Este aparato permite o teste de 4 animais ao mesmo tempo por apresentar compartimentos individualizados (*Insight®*). O protocolo adotado foi o de aceleração contínua, onde os animais foram colocados sobre a barra numa velocidade inicial de 4 rpm. Ao longo de um período de 5 minutos a velocidade foi progressivamente aumentada até no máximo 40 rpm (RIAL et al., 2014; SANTOS et al., 2016). Para avaliar o tempo de permanência do animal, o tempo para queda foi aferido em 4 tentativas, com 1 minuto de intervalo cada. O menor tempo de queda foi registrado.

#### 4.2.3.9 Teste do nado forçado

O teste do nado forçado foi realizado conforme descrito previamente na literatura (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977). Neste teste os animais são colocados em um tanque cilíndrico (15 cm de diâmetro x 20 cm de altura) contendo água na temperatura de  $25 \pm 1$  °C, por 5 minutos e o tempo de imobilidade do animal é avaliado. Nesta situação, os animais se defrontam com uma situação inescapável, quanto maior for o tempo que o animal permanece sem tentar escapar (tempo de imobilidade) maior será o comportamento tipo-depressivo. Este teste é um teste preditivo, uma vez que várias drogas com efeitos antidepressivos em humanos diminuem o tempo de imobilidade neste teste.

### 4.2.4 Análises bioquímicas

#### 4.2.4.1 Análise de perfil plasmático

O sangue foi coletado por punção cardíaca, mantido em tubos heparinizados e o plasma isolado. Os níveis plasmáticos de glicose, colesterol total, HDL-colesterol e triglicerídeos foram determinados por métodos enzimáticos através do uso de kits comerciais da marca Labtest Diagnóstica ® (Lagoa Santa MG, Brasil). Para esta análise, foi feita a retirada da ração dos animais 12 h antes da coleta de sangue. O VLDL-colesterol foi estimado dividindo-se o valor do triglicerídeo por 5, e o

LDL-colesterol foi calculado através da fórmula de Anandaraja (ANANDARAJA et al., 2005; KRISHNAVENI; GOWDA, 2015)

#### 4.2.4.2 Atividade enzimática

Para a medição da atividade enzimática, as amostras foram homogeneizadas em solução HEPES 20 mM pH 7,4 (1:10; peso: volume) e centrifugadas a 20.000 g x 30 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para as análises.

*Glutathione reductase (GR)*: A atividade da GR foi medida pelo método de (CARLBERG; MANNERVIK, 1985)(CARLBERG; MANNERVIK, 1985), onde o meio de reação contém tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, 1,0 mM de EDTA e NADPH 0,225 mM. Ao adicionar GSSG, 1,0 mM, concentração final. A GR presente na amostra reduz a GSSG para GSH, consumindo NADPH. A taxa de consumo de NADPH foi utilizada como atividade GR a partir da leitura em 340 nm em espectrofotômetro. A perda de absorbância sem adição de GSSG foi descontada das leituras.

*Tiorredoxina reductase (TrxR)*: A atividade da TrxR foi medida através do método de redução do DTNB a TNB (HOLMGREN; BJORNSTEDT, 1995). As amostras foram adicionadas ao meio de reação (tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, EDTA 10 mM, DTNB 5 mM e BSA 2 mg/ml) e incubadas por 10 minutos a 37°C. Em seguida foi adicionado 0,2 µM NADPH e a taxa de aumento da absorbância foi medida por 5 minutos a 421 nm em espectrofotômetro. O aumento de absorbância sem adição de NADPH foi descontado das leituras.

*Glioxalase I (Glo1)*: A atividade da Glo1 foi medida através da formação de S-D-lactoilglutathione (ALLEN; LO; THORNALLEY, 1993; RACKER, 1951). Antes do ensaio GSH e MG foram incubados em tampão fosfato 50 mM pH 6,6, GSH 100 mM e MG 100 mM a 37°C por 10 minutos. Esta solução foi adicionada ao meio de reação com as seguintes concentrações finais: 0, 5 e 10 mM de MG. Ao meio de reação foi acrescentada a amostra e a taxa de aumento da absorbância foi medida durante 1 minuto a 240 nm em espectrofotômetro. A variação de absorbância sem adição da amostra foi descontada das leituras.

*Dosagem de proteína*: A atividade enzimática foi relativizada à concentração de proteína. A dosagem de proteína foi efetuada de acordo com o método de (BRADFORD, 1976), usando a albumina do soro bovino como proteína-padrão.

#### 4.2.4.3 Determinação da concentração de GSH-t

Os níveis de GSH total foram avaliados de acordo com o método de (TIETZE, 1969). As amostras foram homogeneizadas em ácido perclórico 0,5% e centrifugadas a 5.000g por 5 minutos em centrifuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi utilizado e o pellet descartado. As amostras foram neutralizadas e adicionadas em um meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, EDTA 1mM, NADPH 0,2 mM, DTNB 0,1 mM e 0,05 unidades de glutatona redutase. A taxa de formação de TNB foi determinada no comprimento de onda de 412 nm por 5 minutos. Os valores de absorbância encontrados foram comparados a valores de GSH padrão.

#### 4.2.4.4 Extração de proteínas e Western blot

As amostras das regiões do estriado dos animais foram diluídas em glicerol 10 %, SDS 2,0 %, azul de bromofenol 0,004 %, Tris-HCl 0,106 M, pH 6,85, com 2-mercaptoetanol 5,0 %. As proteínas (25 µg/poço) foram separadas por gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) usando um aparato Miniprotein tetra (Bio-Rad, São Paulo). A eletroforese foi realizada com uma voltagem fixa de 120 volts por 90 minutos, ou até o corante ter alcançado o final do gel, utilizando-se para isso um tampão de corrida contendo 190 mM de glicina, 25 mM de Tris e 0,1 % de SDS. Após a separação, as proteínas foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose, utilizando o aparato Mini Trans-Blot (Bio-Rad, São Paulo), por 90 minutos a 100 volts e sob refrigeração. As membranas foram então bloqueadas com leite desnatado 5,0 % e incubadas *overnight* com anticorpos primários. Após a incubação com anticorpo secundário correspondente a revelação foi feita com uma solução quimioluminescente seguida da exposição em filme radiográfico ou em aparelho de fotodocumentação de membranas (ChemiDoc MP, Bio-Rad, La Jolla, USA).

#### 4.2.5 Análise estatística

No tratamento com frutose a análise estatística dos dados foi feita por meio do teste *t* de Student para dados não pareados e os valores representados como média  $\pm$  E.P.M. As análises referentes ao peso, consumo alimentar, líquido e calórico foram realizadas por regressão linear seguida por análise de variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas. Para o teste de realocação do objeto, a análise

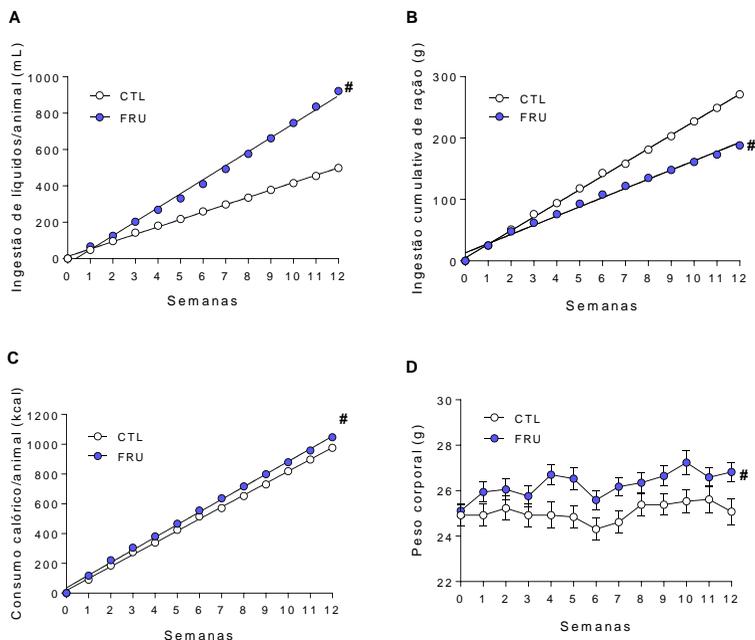
estatística foi realizada através do teste  $t$  de Student (pareado e em relação ao 50 % de chance ao acaso). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Caracterização do modelo de consumo crônico de frutose

O perfil metabólico e bioquímico foi caracterizado em camundongos C57BL/6 fêmeas de 12 meses de idade, após o consumo de frutose na água de beber por 12 semanas. Ao longo de todo o período de tratamento, mensurou-se semanalmente a ingestão líquida e sólida (ração), por meio da diferença entre a quantidade ofertada e a quantidade de sobra. A Figura 08 mostra a ingestão de líquidos (A), o consumo de ração (B), a ingestão calórica (C) e o peso corporal (D) dos animais ao longo do tratamento.

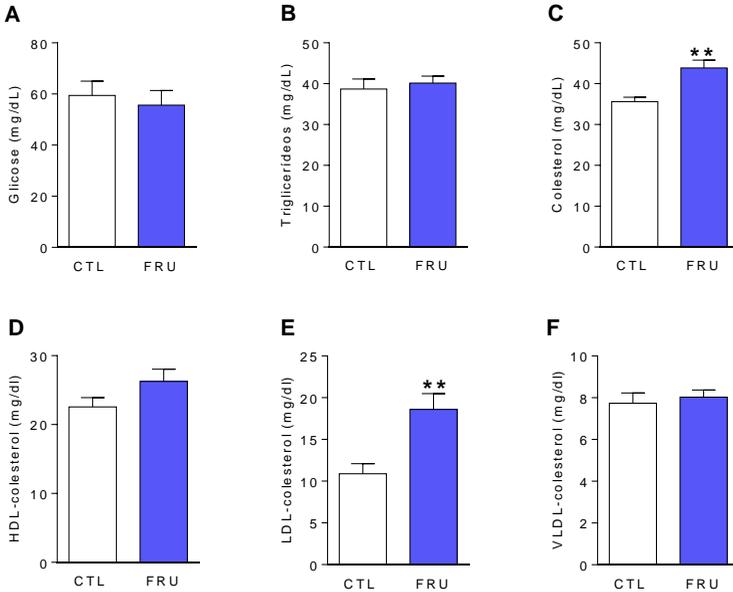
Conforme demonstrado na Figura 08A, o grupo frutose consumiu significativamente mais líquidos em relação ao grupo controle ( $R^2$  CTL = 0,7200;  $R^2$  FRU = 0,9952), e ingeriu significativamente menor massa de alimento (Fig. 08B) em relação controle ( $R^2$  CTL = 0,9914;  $R^2$  FRU = 0,9990). Além disso, a análise do consumo calórico indicou que o grupo que consumiu frutose teve, ao final do tratamento, um aumento de cerca de 7 % no consumo energético total em relação ao controle (Fig.08C). Como reflexo desse aumento calórico, ao final do tratamento houve um aumento de aproximadamente 7% no peso corporal dos animais que consumiram frutose (Fig. 08D).



**Figura 08 – Variação do peso e dos consumos líquido, alimentar e calórico induzido pelo consumo de frutose.** Ao longo de todo o tratamento, semanalmente foram coletados os dados referentes ao (A) consumo de líquidos, (B) consumo de alimentar, (C) consumo calórico e (D) peso. Os dados de A, B e C estão representados como valores individuais referentes a cada medida, e a análise estatística foi feita por regressão linear. Os valores referentes ao peso estão representados como média  $\pm$  E.P.M (N = 13-17). Diferenças significativas estão indicadas por #  $p < 0,001$ .

Após a caracterização dos efeitos da frutose sobre o perfil alimentar, foi realizada a avaliação do perfil metabólico dos camundongos por meio da análise plasmática de glicose, triglicerídeos, colesterol total e suas frações, conforme demonstrado na Figura 09. Observou-se que o consumo de frutose não altera as concentrações basais de glicose (Fig. 09A) e triglicerídeos (Fig. 09B). No entanto, os níveis plasmáticos de colesterol total (Fig. 09C) mostraram-se significativamente elevados nos animais do grupo frutose, quando

comparados ao grupo controle. A quantificação das diferentes frações de colesterol revelou que a fração LDL se apresentava significativamente aumentada no plasma (Fig. 09E) e, que as demais frações, HDL e VLDL não apresentavam alterações significativas (Fig. 09D e F).



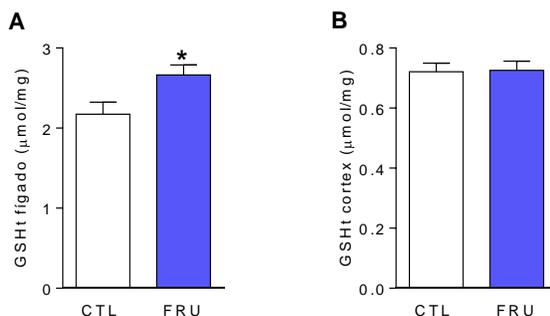
**Figura 09 – Efeitos do consumo de frutose sobre o perfil metabólico plasmático de camundongos.** (A) níveis de glicose, (B) níveis de triglicérides, (C) níveis de colesterol total, (D) níveis de colesterol HDL, (E) níveis de colesterol LDL e (F) níveis de colesterol VLDL. Os dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M (N =12). Diferenças significativas estão indicadas, \*\*  $p < 0,01$ .

Dessa forma, pode-se concluir que o consumo crônico de frutose em camundongos está associado a diminuição de 44% no consumo de alimento sólido, aumento de 85% no consumo de água com frutose, com conseqüente aumento do consumo calórico e do peso corporal. Das alterações bioquímicas analisadas, foi detectado aumento de colesterol total e da fração LDL, mas na glicemia e triglicérides totais.

### 4.3.2 Influência do consumo de frutose sobre as defesas antioxidantes

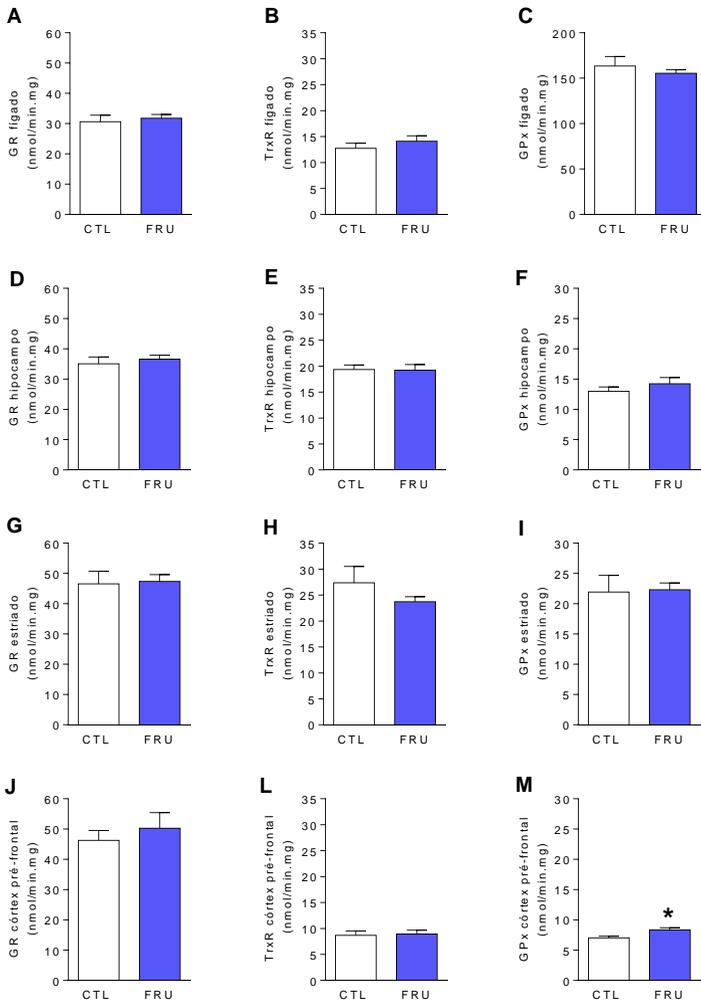
Sabe-se que o consumo de frutose está associado ao aumento nos níveis endógenos de MGO e ao aumento do estresse oxidativo (CASTRO et al., 2015.; DHAR et al., 2013; MASTERJOHN et al., 2013; SENA et al., 2012), sendo um dos possíveis mecanismos de ação da frutose. Para investigar esta hipótese foram realizadas análises das defesas antioxidantes e dos sistemas de eliminação de MGO no fígado e no SNC.

Conforme ilustrado na Figura 10, o consumo de frutose induziu a um pequeno aumento, porém significativo, nos níveis GSH no fígado (Fig. 10A). No entanto, o conteúdo de GSH total permaneceu inalterado no córtex cerebral (Fig. 10B).



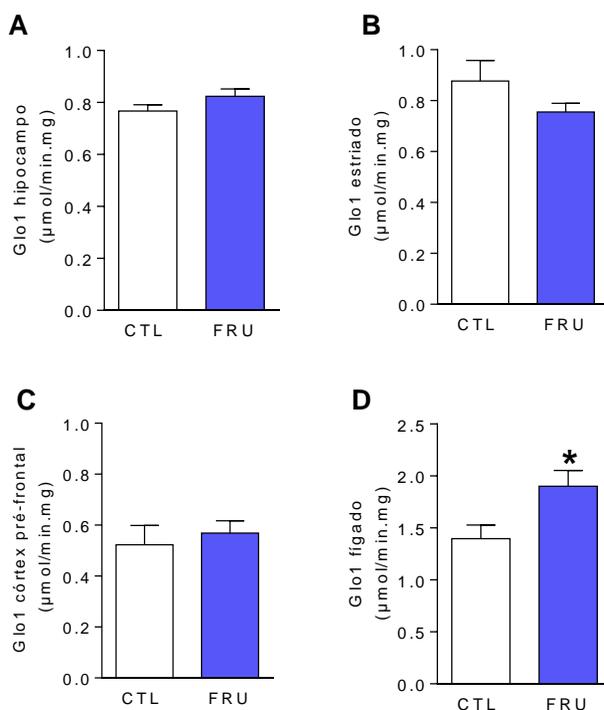
**Figura 10 – Efeitos do consumo de frutose sobre os níveis de GSH total no fígado e no córtex cerebral de camundongos.** (A) níveis de glutatona total no fígado e (B) níveis de glutatona total no córtex cerebral. Os dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M (N = 11-12). Diferenças significativas estão indicadas, \*  $p < 0,05$ .

A análise da atividade das enzimas antioxidantes GR, TrxR1 e GPx no fígado e no SNC, nas regiões do hipocampo, estriado e córtex pré-frontal (Fig. 11), indicou que o consumo de frutose não altera significativamente a atividade dessas enzimas (Fig. 11A-L), exceto pelo aumento significativo na atividade da GPx no córtex pré-frontal dos animais que consumiram frutose (Fig. 11M).



**Figura 11 – Efeito do consumo de frutose sobre a atividade de enzimas antioxidantes.** (a) atividade da GR (colunas da esquerda), TrxR (coluna central) e GPx (coluna da esquerda). As atividades destas enzimas foram avaliadas no fígado (A-C), no hipocampo (D-F), no estriado (G-I) e no córtex pré-frontal (J-M). Os dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M (N = 5-6). Diferenças significativas estão indicadas, \*  $p < 0,05$ .

Segundo dados da literatura, o consumo excessivo de frutose aumenta as concentrações dos intermediários da via glicolítica, os quais podem ser metabolizados em compostos dicarbonilas que, por sua vez, são tóxicos para a célula (MASTROCOLA et al., 2016). Dessa maneira, a atividade da Glo1, enzima que detoxifica o composto dicarbonila MGO foi avaliada no hipocampo (Fig. 12A), estriado (Fig. 12B), córtex pré-frontal (Fig. 12C) e no fígado (Fig. 12D). Apesar de não terem sido encontradas alterações na atividade da Glo1 no SNC, um aumento significativo foi encontrado no fígado (Fig. 12D).



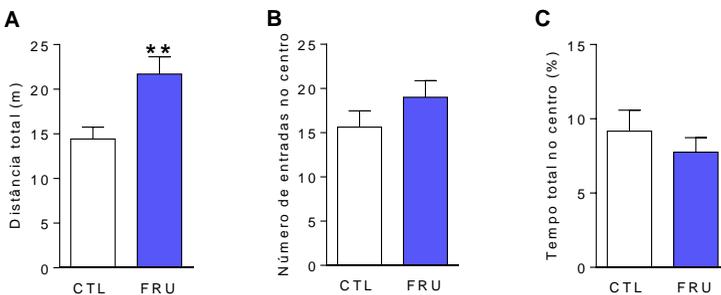
**Figura 12 – Efeito do consumo de frutose sobre a atividade da Glo1.** (A) hipocampo, (B) estriado, (C) córtex e (D) fígado. Os dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M (N = 5-6). Diferenças significativas estão indicadas, \*  $p < 0,05$ .

Dessa forma, os dados indicam que o consumo crônico de frutose em camundongos, induz à um aumento nos níveis de GSH e na atividade da enzima Glo1 no fígado, sem, no entanto, alterar a atividade das enzimas antioxidantes hepáticas. Já no SNC, a frutose não induz alterações nas concentrações de GSH total e na atividade de Glo1, mas induz ao aumento significativo na atividade da GPx no córtex pré-frontal.

#### 4.3.3 Efeitos do consumo crônico de frutose sobre o perfil comportamental de camundongos

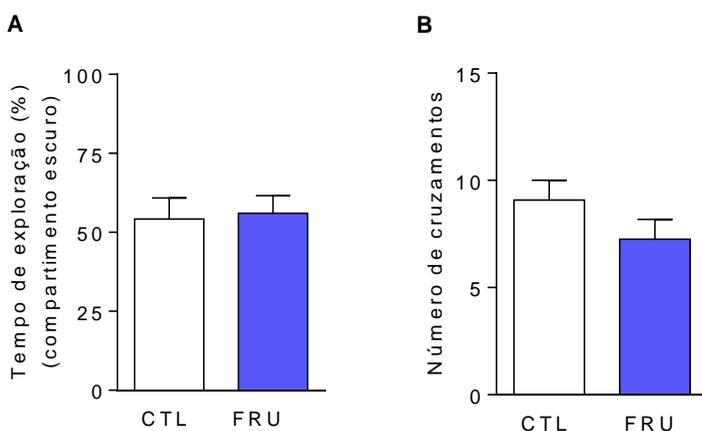
Pouco se sabe sobre os efeitos do consumo de frutose sobre os padrões comportamentais de roedores, no entanto, segundo a literatura, o consumo de frutose está associado ao comprometimento da memória em ratos jovens (ROSS et al., 2009; WU et al., 2015). Portanto, no presente trabalho foram investigados os efeitos do consumo crônico de frutose sobre padrões comportamentais de camundongos.

Após 12 semanas consumindo frutose, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto (Fig. 13). Neste, foi constatado que o consumo de frutose causa aumento significativo na distância total percorrida pelos camundongos (Fig. 13A), sem alterar o número de entradas no centro (Fig. 13B) e o tempo permanecido na área central do aparato (Fig. 13C). O aumento na distância percorrida é um indicativo que o consumo de frutose causa hiperlocomoção em camundongos, sem aparentemente alterar o perfil de ansiedade.



**Figura 13 – Efeitos do consumo de frutose sobre o comportamento locomotor e exploratório no teste do campo aberto.** (A) distância total percorrida, (B) número de entradas no centro e (C) tempo de permanência no centro do aparato. Os dados estão representados como média ± E.P.M (N = 13-17). Diferenças significativas estão indicadas, \*\* p < 0,01.

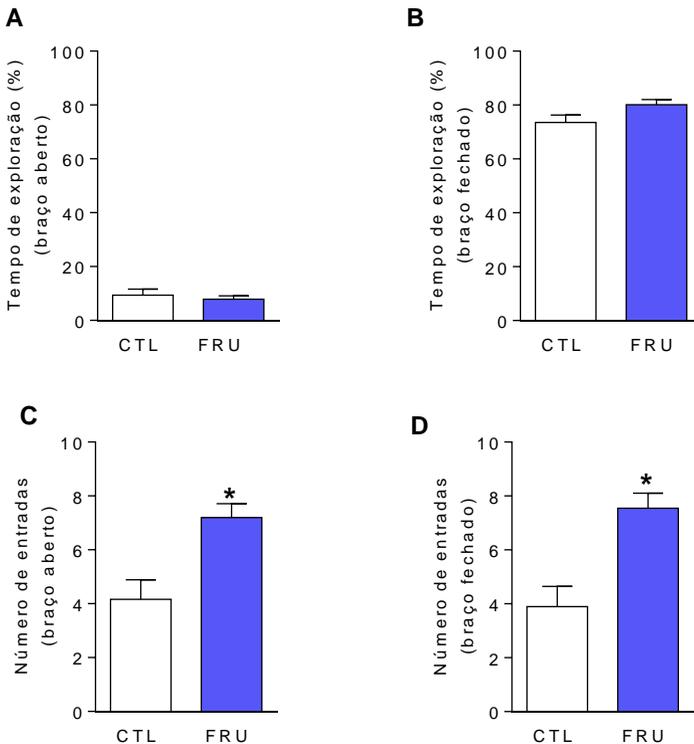
Em seguida, os efeitos do consumo de frutose sobre o comportamento do tipo ansioso de camundongos foram avaliados através do teste da caixa claro/escuro. Conforme indicado na Figura 14, não foram observadas diferenças significativas quanto ao tempo de permanência no compartimento escuro (Fig. 14A) e no número de cruzamentos entre os compartimentos (Fig. 14B), os quais são parâmetros clássicos associados ao aumento da ansiedade (BOURIN; HASCOËT, 2003). Dessa maneira, os dados obtidos no teste da caixa claro/escuro, sugerem que o consumo de frutose não altera o comportamento tipo-ansioso de camundongos.



**Figura 14 – Efeito do consumo de frutose sobre o comportamento do tipo ansioso no teste da caixa claro/escuro.** (A) tempo gasto explorando o compartimento escuro do aparato e (B) número total de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro do aparato. Os dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M (N = 13-17). Não foram encontradas diferenças significativas.

Para confirmar a validade dos dados referentes a ansiedade previamente encontrados, optou-se pela realização do teste do labirinto em cruz elevado (Fig. 15). Conforme demonstrado nas Figuras 15A e 15B, não foram encontradas diferenças significativas nos tempos de permanência nos braços abertos e fechados, corroborando, portanto, com os dados obtidos no teste da caixa claro/escuro (Fig. 14). Porém, observou-se um aumento significativo no número de cruzamentos entre

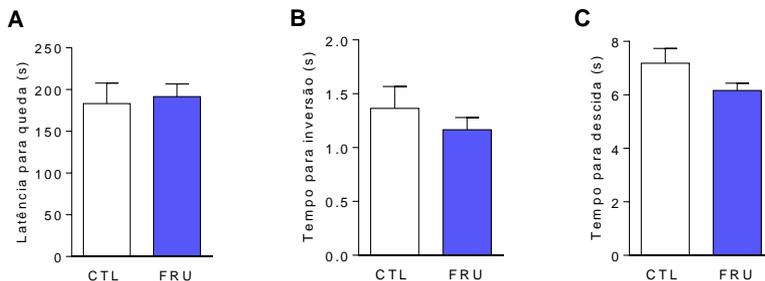
ambos os braços, abertos (Fig. 15C) e fechados (Fig. 15D), refletindo um aumento na atividade locomotora dos animais que consumiram frutose.



**Figura 15 – Efeitos do consumo de frutose sobre o comportamento tipo-ansioso e locomotor no teste do labirinto em cruz elevado.** (A) tempo gasto pelo animal explorando os braços abertos, (B) tempo gasto pelo animal explorando os braços fechados número total de entradas nos braços abertos (C) e fechados (D). Os dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M (N = 13-17). Diferenças consideradas significativas estão indicadas, \*  $p < 0,05$ .

Para investigar se o aumento da locomoção poderia estar relacionado a alterações na capacidade motora dos animais, esta foi avaliada por meio do teste do *rotarod* (Fig. 16A), e do *pole test* (Fig. 16B-C). O teste do *rotarod* avalia a coordenação motora geral por meio da

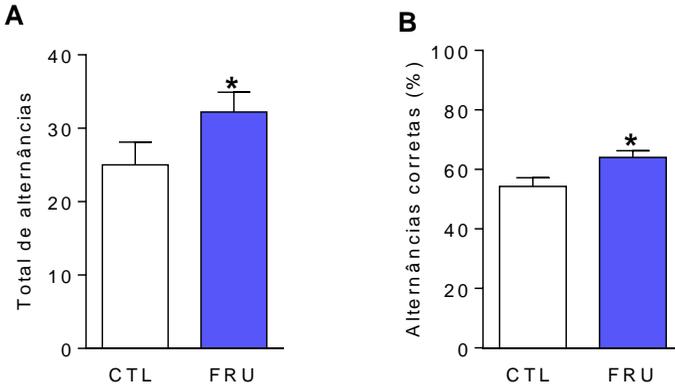
capacidade de equilíbrio dos animais (CURZON et al., 2009), enquanto que o *pole test* é utilizado para investigar a presença de alterações motoras mais leves e refinadas (FLEMING et al., 2004). Em ambos os testes, houve diferenças significativas entre os grupos controle e frutose, indicando que o consumo de frutose não compromete a capacidade motora de camundongos, nas condições experimentais utilizadas.



**Figura 16 – Efeitos do consumo de frutose sobre capacidade motora de camundongos.** (A) tempo máximo de permanência dos camundongos no teste do *rotarod*, em um total de quatro tentativas, (B) tempo necessário para que o animal invertesse sua posição no *pole test* e (C) tempo gasto para descida do animal no *pole test*. Os dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M (N = 13-17). Diferenças consideradas significativas estão indicadas, \*  $p < 0,05$ .

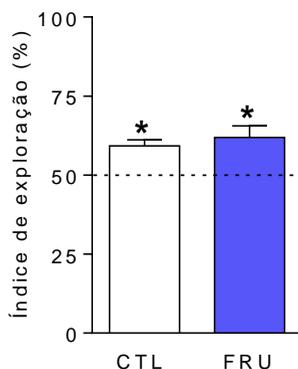
Os possíveis efeitos do consumo de frutose foram também investigados sobre parâmetros relacionados à cognição e memória. Para isso, os animais foram submetidos ao labirinto em Y e ao teste de realocação do objeto. No labirinto em Y (Fig. 17), os animais apresentaram aumento significativo no número total de alternâncias entre os braços (Fig. 17A), bem como da porcentagem de sequências corretas (Fig. 17B). Um aumento do número de braços visitados em ordem sequencial indica que o consumo de frutose não causa prejuízo relacionado a memória, pelo contrário, indicaria uma melhora desta. Entretanto, os dados mostrando aumento no número total de entradas, sugere um aumento na locomoção, e ao acaso, poderia explicar um maior número de acertos nas sequências corretas. Desta forma, o aumento no número de sequências corretas parece estar relacionado à maior atividade

locomotora. Esses dados corroboram, mais uma vez, com os dados obtidos no campo aberto (Fig. 13A) e no teste do labirinto em cruz elevado (Fig. 15C e 15D), reforçando a idéia de que a frutose induz ao aumento de locomoção.



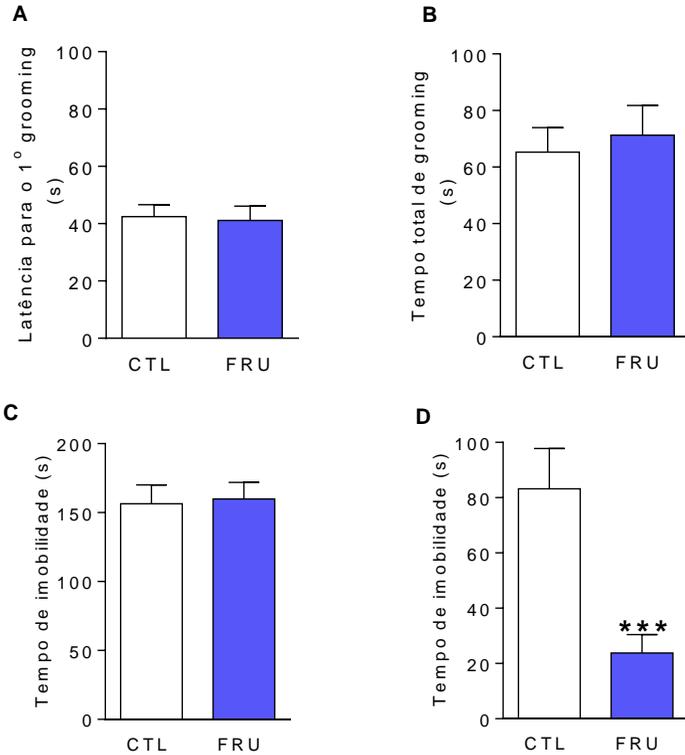
**Figura 17 – Efeitos do consumo de frutose sobre a memória e a atividade locomotora no teste do labirinto em Y.** (A) número total de entradas nos braços e (B) porcentagem de alternâncias corretas. Os dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M (N = 13-17). Diferenças consideradas significativas estão indicadas, \*  $p < 0,05$ .

Para confirmar os dados referentes a cognição e memória obtidos no teste do labirinto em Y (Fig. 17), os animais foram submetidos ao teste de realocação do objeto (Fig. 18). Neste teste, no entanto, também não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, indicando, de acordo com os dados obtidos no labirinto em Y, que o consumo de frutose não compromete as funções cognitivas e a memória em camundongos.



**Figura 18 – Efeitos do consumo de frutose sobre a cognição e memória no teste da realocação do objeto.** Os valores do gráfico indicam o índice de exploração do objeto realocado (novo). Os dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M (N = 13-17). Diferenças significativas em relação a 50% estão indicadas, \*  $p < 0,05$ .

Por fim, os efeitos do consumo de frutose foram avaliados sobre comportamentos do tipo-depressivo em camundongos. Os dados do *splash test*, utilizados para detecção de presença de comportamentos anedônicos, indicaram que não existem diferenças significativas no tempo de latência para iniciar o comportamento de *grooming* (Fig. 19A) e no tempo total de *grooming* (Fig. 19B). Além disso, no teste de suspensão pela cauda (Fig. 19C) também não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos quanto ao tempo total de imobilidade. Dessa forma, em conjunto, esses dados indicam que o consumo crônico de frutose não causa anedonia e tampouco comportamento do tipo-depressivo em camundongos.



**Figura 19 – Efeitos do consumo de frutose sobre o comportamento do tipo depressivo de camundongos.** (A) tempo de latência para início do *grooming* no *splash test*, (B) tempo total de *grooming* no *splash test*, (C) tempo total de imobilidade no teste de suspensão pela cauda e (D) tempo total de imobilidade no teste do nado forçado. Os dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M (N = 13-17). Diferenças significativas estão indicadas \*\*\*  $p < 0,001$ .

No entanto, quando submetidos ao teste do nado forçado (Fig. 19D), o grupo que consumiu frutose apresentou uma grande diminuição no tempo de imobilidade, em relação ao grupo controle. Este fato, é provavelmente um reflexo da hiperlocomção observada nos testes do campo aberto (Fig. 13), labirinto em cruz elevado (Fig. 15) e labirinto em Y (Fig. 17). Dessa forma, pode-se concluir que o consumo de frutose não induz comportamentos tipo-depressivo e anedônico, mas corroboram com

as evidências previamente mostradas de que o consumo de frutose causa hiperlocomoção nestes camundongos.

#### 4.4 Discussão

O consumo elevado de frutose está associado ao desenvolvimento de síndrome metabólica e das comorbidades a ela associadas. Isso ocorre porque a frutose causa desregulação em vias de sinalização e metabólicas em diversos tecidos, principalmente fígado e tecido adiposo (MASTROCOLA et al., 2016; MILLER; ADELI, 2008).

No entanto, estudos mostram que os efeitos da frutose não se restringem a alterações periféricas, estendendo-se ao SNC e causando, por exemplo, diminuição da neurogênese e plasticidade sináptica no hipocampo, e diminuição da capacidade cognitiva em roedores (STRANAHAN et al., 2008; VAN DER BORGHT et al., 2011). Acredita-se que os efeitos da frutose sobre SNC possam ser decorrentes da resistência periférica a insulina e da hiperlipidemia causada pelo consumo excessivo de frutose (DEKKER et al., 2010), ou ainda, pelo aumento na formação de AGEs, os quais são responsáveis pelo acúmulo de proteínas disfuncionais (MASTROCOLA et al., 2013).

Os efeitos do consumo de frutose sobre os parâmetros comportamentais de roedores são controversos. Em ratos que consumiram uma solução contendo 10% de frutose por cinco semanas, não foram observadas diferenças nos índices de locomoção e permanência na área central no teste do campo aberto (ORLANDÍ et al., 2015). Além disso, em outro estudo (HSU et al., 2015) foi visto que ratos que consumiram uma solução contendo 11% de frutose durante 30 dias também não apresentaram diferenças significativas, com relação ao grupo controle, sobre comportamentos do tipo ansioso, avaliado pelo teste do labirinto em zero. No entanto, foi demonstrado que ratos que consumiram frutose por 8 semanas apresentaram diminuição no tempo de permanência no centro do aparato, refletindo um comportamento ansiogênico (REDDY et al., 2016). Ainda no mesmo estudo, foi visto que os animais que consumiram frutose permaneceram mais tempo no compartimento escuro, quando submetidos ao teste da caixa claro/escuro.

No presente trabalho, foi demonstrado que camundongos submetidos ao consumo crônico de frutose não apresentaram diferenças em relação ao grupo controle quanto ao tempo de permanência e ao número de entradas na área central do campo aberto (Fig. 13), indicando ausência de alterações relacionadas a ansiedade. Resultado similar foi obtido no teste do labirinto em cruz elevado (Fig. 15), no qual não foram encontradas diferenças no tempo total de permanência nos braços abertos. Além disso, no teste da caixa claro/escuro, não foram encontradas diferenças significativas quanto ao tempo total de permanência nos

compartimentos. Dessa maneira, corroborando com estudos prévios da literatura realizados com ratos jovens, o consumo de frutose em camundongos adultos de 12 meses não causa alterações comportamentais relacionadas ao perfil de ansiedade.

Com relação aos efeitos do consumo de frutose sobre a capacidade cognitiva de roedores, os dados da literatura são, mais uma vez, contraditórios. Ratos que consumiram uma solução de 10% de frutose por 16 semanas apresentaram diminuição da capacidade cognitiva, evidenciada por um comprometimento na capacidade de aprendizado e memória avaliado pelo teste do labirinto aquático de Morris (YIN et al., 2013). Em outro estudo foi demonstrado que ratos que consumiram frutose por 18 meses (60% das calorias) não apresentaram prejuízos no aprendizado, mas tiveram comprometimento da retenção da memória no teste do labirinto aquático de Morris, ou seja, os ratos que consumiram frutose apresentaram aumento na latência para achar a plataforma escondida, além de ficarem menos tempo no quadrante correto (ROSS et al., 2009). Também foi constatado que o consumo de uma solução de 11% de frutose por 30 dias em ratos adultos não causa alterações na capacidade de aprendizado e memória, quando avaliados pelo teste do labirinto em Y e do Labirinto de Barnes (HSU et al., 2015). No presente trabalho, o consumo de frutose não induziu prejuízos na capacidade de aprendizado e memória, avaliadas pelos testes de relocação do objeto (Fig. 18) e no labirinto em Y (Fig 17).

Interessantemente, no teste do labirinto em Y, os animais que consumiram frutose apresentaram um aumento aparente na capacidade cognitiva e de memória, pois estes realizaram maior número de alternâncias corretas, quando comparados ao controle. Este efeito pode ter ocorrido devido ao aumento no número de braços visitados pelo grupo que consumiu frutose, pois há que se notar a proporcionalidade entre o aumento no número de braços visitados e o número de alternâncias corretas. Outra possível explicação, é que a frutose tenha efeitos diferentes sobre as regiões do SNC, pois os testes dependem de áreas distintas para a sua execução. O labirinto em Y utiliza principalmente a chamada memória de trabalho, a qual, além de depender de processamento no hipocampo, é fortemente dependente do córtex pré-frontal, local onde são processadas as informações relevantes para a execução do teste, bem como onde ocorre a tomada de decisões (BADDELEY, 2003; BRINCAT; MILLER, 2016). O teste de relocação do objeto, por outro lado, avalia predominantemente memória espacial e discriminação, a qual é processada predominantemente no hipocampo (BARKER; Warburton, 2011). Dessa maneira, o teste em Y foi

inconclusivo, necessitando de novos experimentos para esclarecer se a ingestão de frutose afeta cognição e memória.

Até o momento, não existem trabalhos na literatura que tenham avaliado o efeito do consumo de frutose sobre a locomoção de camundongos. Sabe-se, porém, que o consumo de uma solução contendo 30% de sacarose em ratas grávidas causa aumento de locomoção na prole (CHOI et al., 2015). No entanto, em ratos adultos que consumiram uma solução contendo 10% de sacarose por um período de 21 dias, não foram observadas diferenças em relação ao grupo controle quanto a locomoção (FRANKLIN et al., 2016).

No presente trabalho, foi demonstrado que o consumo crônico de frutose em camundongos induz um claro aumento na locomoção, evidenciado pelo aumento na distância percorrida no teste do campo aberto (Fig. 13A), aumento no número de alternâncias nos testes do labirinto em cruz elevado (Fig. 15C e 15D) e no teste do labirinto em Y (Fig. 17A). Esse aumento não foi acompanhado por alterações motoras, pois não foram encontradas diferenças nos testes do *rotarod* e no *pole test* (Fig. 16). O aumento da locomoção é bastante característico em modelos animais de autismo, nos quais os animais apresentam aumento da distância percorrida no teste do campo aberto, aumento de entradas nos braços em testes de labirintos (DONG et al., 2016; HAMILTON et al., 2013; HARA et al., 2015). Além disso, em modelos animais de autismo já foi relatado aumento de impulsividade e desenvolvimento de comportamentos repetitivos ou estereotipados (CRAWLEY, 2012). Outras patologias também são associadas ao aumento de locomoção, como esquizofrenia (KARGIEMAN et al., 2007), transtorno obsessivo compulsivo (KANTAK; BOBROW; NYBY, 2014) e transtornos de atenção (HAUSER et al., 2014).

O aumento de locomoção pode também estar relacionado a alterações em diversas áreas do cérebro, sendo uma das principais o córtex pré-frontal (KARGIEMAN et al., 2007). Os neurotransmissores que desempenham um papel chave nesse tipo de comportamento são o GABA, o glutamato e a dopamina (LEWIS; HASHIMOTO; VOLK, 2005; WEINBERGER et al., 2001). Dados da literatura já demonstraram efeito agonístico do MG sobre receptores de GABA<sub>A</sub> do SNC (DISTLER et al., 2012; DISTLER; PALMER, 2012). Dessa maneira, é possível que a frutose ou seus metabólitos, como o MG, causem alteração nas vias de neurotransmissão relacionadas a atividade locomotora em camundongos.

Deve-se ressaltar que o consumo de frutose aumenta a formação de MGO e AGEs, os quais, em conjunto com dietas de alto índice glicêmico, foram associados recentemente ao desenvolvimento de

comportamentos relacionados ao autismo (CURRAIS et al., 2016; MAHER, 2012). Isso ocorre porque dietas ricas em açúcar causam desregulação do sistema imune e aumento sistêmico da inflamação (MICHEL; SCHMIDT; MIRNICS, 2012; PATTERSON, 2009).

O consumo de dietas ricas em açúcar, e portanto, de alto índice glicêmico, está associado ao desenvolvimento de síndrome metabólica, na qual há a presença de um estado crônico de inflamação (BRAY, 2010; GALLAND, 2010). Uma das principais características da síndrome metabólica é o aumento de peso, causado pelo acúmulo excessivo de gordura. A frutose, diferente da glicose, quando consumida junto a refeições, causa diminuição dos níveis circulantes dos hormônios sacietogênicos leptina, insulina e aumenta os níveis de grelina, hormônio associado a sinalização de fome (TEFF et al., 2004), levando ao aumento no consumo calórico e consequentemente causando aumento de peso e obesidade.

O consumo de dietas ricas em frutose ou sacarose está associado ao desenvolvimento de resistência à insulina e distúrbios no metabolismo da glicose em roedores (BALAKUMAR et al., 2016; CHEN et al., 2016; WU et al., 2015). Ainda, segundo a literatura, camundongos C57/BL que receberam 10% de frutose na água de beber durante 3 semanas, apresentaram aumento na glicemia de jejum e nos níveis de insulina no plasma (HUANG et al., 2006). Em concordância a este, outro estudo realizado com camundongos C57/BL machos que receberam 10% de frutose na água de beber por 60 dias apresentaram aumento significativo nas concentrações plasmáticas de glicose, colesterol, triglicerídeos, insulina e leptina, além de intolerância à glicose (DE ANGELIS et al., 2012). No entanto, em estudo realizado com humanos, foi demonstrado que uma dieta contendo 1,5 g/kg de peso de frutose administrada diariamente em humanos saudáveis por 4 semanas não foi capaz de causar aumento nos triglicerídeos, alterar a glicemia de jejum, ou causar alterações na composição corporal, no fígado, musculo e perfil lipídico ou resistência à insulina (LÊ et al., 2006).

No nosso trabalho, camundongos que consumiram frutose por 12 semanas não apresentaram alterações nas concentrações plasmáticas de glicose, triglicerídeos, porém, tiveram aumento nas concentrações de colesterol total e na fração LDL. Em estudo realizado por (OHNOGI et al., 2012), ratos que consumiram uma solução contendo 15% de frutose durante 11 semanas apresentaram diminuição da expressão de genes relacionados a oxidação de ácidos graxos e a produção de colesterol HDL no fígado. Além disso, camundongos que consumiram uma solução de 15% de frutose durante 30 semanas, apresentaram acúmulo de

triglicerídeos no fígado e aumento na expressão do fator de transcrição proteína de ligação do elemento regulador de esteróis 1 (SREBP1), responsável pela regulação da de novo lipogênese (MASTROCOLA et al., 2013), quando comparados a animais que consumiram a mesma quantidade de glicose e animais controle. Nesse mesmo estudo, foi visto ainda que o consumo de frutose causa aumento significativamente nas concentrações de AGEs no fígado, e que estes, são os principais responsáveis pelas alterações causadas pela frutose no metabolismo de lipídios. Em outro estudo foi demonstrado que ratos que consumiram uma solução de 10% de frutose durante 5 semanas tiveram aumento dos triglicerídeos e do colesterol total no plasma (ORLANDI et al., 2015).

O colesterol é uma molécula essencial para o funcionamento de células de mamíferos, pois faz parte da composição celular de membranas celulares, além de ser precursor de hormônios esteroides, sais biliares e vitamina D (CERQUEIRA et al., 2016). Níveis elevados de colesterol e de sua fração LDL são associados ao aumento no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Dessa maneira, o consumo crônico de frutose pode estar associado ao aumento nos riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Nosso trabalho também encontrou níveis aumentados de GSH e de Glo1 no fígado, indicando possível aumento na metabolização de MGO, composto formado em decorrência do metabolismo de frutose, e que para ser eliminado conjuga-se com a GSH, e em seguida é metabolizado pela Glo1, enzima limitante na degradação de MGO. Aumentos de MGO no fígado também estão relacionados a alterações no metabolismo de lipídios (ORLANDI et al., 2015). Além disso, o consumo crônico de frutose pode ter causado um aumento compensatório no conteúdo de GSH hepático, através da ativação de mecanismos de que aumentem a síntese de GSH, como a indução do fator de transcrição Nrf2, o qual é responsável por aumentar a expressão da enzima glutamato cistina ligase (GCL), responsável pela síntese de GSH (NGUYEN; NIOI; PICKETT, 2009). Assim, é possível que o consumo crônico de frutose afete o metabolismo da GSH, ativando mecanismos compensatórios que levem ao aumento de sua síntese.

Já no SNC, não foram encontradas diferenças nas concentrações de GSH e na atividade da Glo1, indicando que não houve ativação das vias que controlam a expressão destas defesas celulares. Porém, de forma inesperada, dentre as enzimas antioxidantes, a GPx apresentou aumento significativo de sua atividade no córtex pré-frontal. A atividade da GPx é modulada por diversos fatores, como o aumento na produção de ROS (KUMAR; SHARMA, 2016), diminuição da ativação de mTOR

(REINKE et al., 2014) e ativação de AMPK (NGUYEN et al., 2015). Além disso, em estudos com modelos de autismo, viu-se que há aumento na ativação da mTOR (WU et al., 2016) e da ERK1/2 (KIM et al., 2011) nas regiões do córtex pré-frontal e do hipocampo, e se propõe que o MGO é um dos principais causadores desta patologia (MAHER, 2012).

## 4.5 Conclusão

Os dados apresentados neste trabalho, indicam que o consumo crônico de frutose por doze semanas em camundongos C57/BL de 9-12 meses de idade está associado ao desenvolvimento de hiperlocomoção e aumento dos níveis de colesterol total e da fração LDL, indicando que o consumo de frutose pode estar associado ao aumento de risco aterogênico.

O consumo de frutose induziu também aumento na metabolização do MGO, refletido pelo aumento nos níveis de GSH e na atividade da Glo1. No entanto, de modo interessante, o consumo de frutose não altera o metabolismo da glicose e os parâmetros de dano oxidativo analisados no SNC e no fígado.

**5. EFEITOS NEUROQUÍMICOS DO METILGLIOXAL EM  
FATIAS DE HIPOCAMPO (CAPÍTULO 2)**



## 5.1 Contextualização

O MGO é um subproduto principalmente originado pelo metabolismo de carboidratos, dentre os quais, a frutose (MASTERJOHN et al., 2013; WEI et al., 2013). Em estudo prévio, nosso grupo demonstrou que o tratamento de células neurais HT22 com MGO causa alterações no sistema da tiorredoxina e da glioxalase (DAFRE et al., 2015). No entanto, ainda não há estudos sobre os efeitos do MGO em relação ao sistema da tiorredoxina e da glioxalase em modelo de fatias de hipocampo.

Diferentemente das células, as fatias de hipocampo, mantêm a matriz extracelular natural, a conectividade neuronal, bem como as interações entre neurônios e células gliais, sendo portanto, uma metodologia mais fisiológica para estudo de modelos *in vitro* (RODNIGHT et al., 1991). Dessa maneira, no presente trabalho foram investigados os efeitos do MGO sobre os sistemas celulares antioxidantes, incluindo o sistema da TrxR, e o sistema da glioxalase em modelo de fatias hipocampais.

## 5.2 Materiais e métodos

### 5.2.1 Animais

Para os experimentos com fatias foram utilizados camundongos Swiss fêmeas com 2 - 4 meses de idade, com peso médio de 40-50gr. Os animais foram mantidos em ciclos de 12h/12h de claro e escuro, com temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , água e comida *ad libidum*. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no biotério setorial nas mesmas condições. Todos os procedimentos envolvendo animais foram executados de acordo com as normas do Comitê de Ética da UFSC, sob aprovação do protocolo PP00735.

### 5.2.2 Preparo e tratamento das fatias de hipocampo

Para os experimentos com fatias de hipocampo os camundongos foram recebidos do biotério central e mantidos por no mínimo 1 semana no biotério setorial para aclimação. Após esse período, os camundongos foram mortos por deslocamento cervical e o hipocampo rapidamente removido sob gelo. Os hipocampos foram mantidos em solução HEPES-SALINA contendo 124 mM de NaCl, 4 mM KCl, 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 25 mM de HEPES pH 7,4, 12 mM de glicose e 1 mM  $\text{CaCl}_2$ . Fatias transversais de hipocampo de 0,4 mm de espessura foram obtidas através de um fatiador de tecido McWilliam (Surrey, Inglaterra). Após esse procedimento, as fatias foram incubadas por 30 min à  $37^\circ\text{C}$  em solução HEPES-SALINA para que as células se recuperassem antes de iniciar o tratamento. Para a avaliação dos efeitos do MGO sobre a viabilidade das fatias de hipocampo, estas foram incubadas por 1h ou a  $37^\circ\text{C}$  com diferentes concentrações de MG diluído em meio HEPES-SALINA.

### 5.2.3 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular das fatias foi avaliada pelo método do iodeto de propídio (BEVENSEE; SCHWIENING; BORON, 1995). Células que apresentem membranas celulares danificadas são permeáveis ap iodeto de propídio (IP), e este, uma vez dentro das células, intercala-se ao DNA. Fatias hipocampais foram incubadas com 0, 5 ou 10 mM de MGO por 1 h e, em seguida acrescentou-se iodeto de propidio (IP) e as fatias foram incubadas por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . A fluorescência foi medida em 535 nm de excitação e 617 nm de emissão.

#### 5.2.4 Atividade enzimática

A atividade enzimática das fatias foi avaliada conforme descrito no item 4.2.4.2.

#### 5.2.5 Determinação da concentração de GSH-t

As concentrações de GSHt foram determinadas conforme descrito no item 4.2.4.3

#### 5.2.6 Extração de proteínas e Western blot

A extração das proteínas para as análises de Western blot foi realizada conforme descrito no item 4.2.4.4.

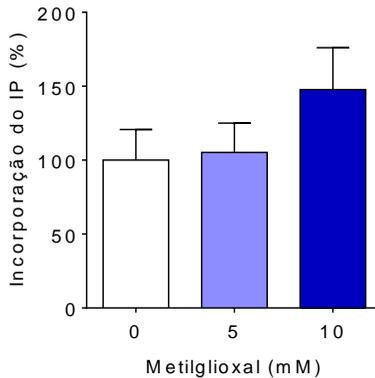
#### 5.2.7 Análise estatística

Para as análises enzimáticas, as diferenças foram avaliadas por ANOVA de uma via, seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey, quando necessário. Para as diferenças de Western blot, os grupos tratados foram comparados com o grupo controle (100 %). Os resultados foram considerados significantes quando  $p < 0,05$ . Os dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M.

### 5.3 Resultados

#### 5.3.1 Efeitos do MGO sobre a viabilidade celular

Para avaliar o efeito do MGO sobre a sobrevivência celular, fatias de hipocampo foram incubadas com diferentes concentrações de MGO por 1h. As concentrações de MGO utilizadas nos experimentos foram baseadas em dados prévios da literatura (DAFRE et al., 2015).

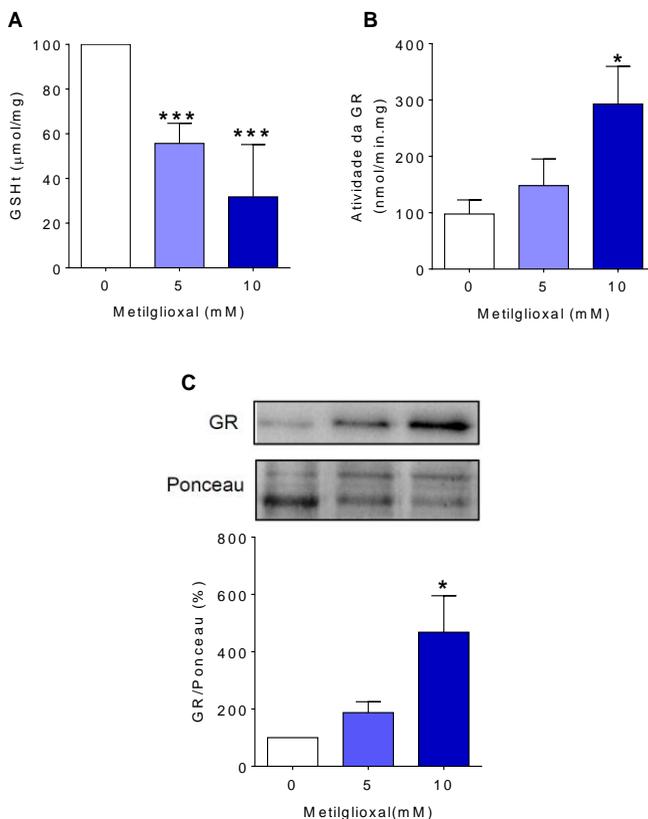


**Figura 20 – MGO não causa diminuição significativa da viabilidade em fatias de hipocampo.** As fatias foram incubadas por 60 minutos com diferentes concentrações de MGO e após esse período a viabilidade foi avaliada através do método captação do iodeto de propídio (IP). Os dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M (N = 9). As diferenças estatísticas foram avaliadas em relação ao grupo controle (0). Diferenças significativas estão indicadas em relação ao grupo controle por \* $p < 0,05$ .

Conforme demonstrado na Figura 20, o tratamento de fatias hipocampais com 5 ou 10 mM de MGO por 1 h não causou alterações significativas na permeabilidade do iodeto de propídio (CTL  $100 \pm 21$ ; 5 mM MGO  $105 \pm 20$ ; 10 mM MGO  $148 \pm 28$ ). Dessa forma, para os testes subsequentes realizados com fatias, foram utilizadas as concentrações de 5 e 10 mM.

### 5.3.2 Efeitos do MGO sobre GSH e a GR

A GSH é um alvo conhecido do MGO, sendo depletada após a exposição ao mesmo (DAFRE et al., 2015a; KALAPOUS, 2008). Em fatias de hipocampo submetidas ao tratamento com 5 e 10 mM de MGO por 1 h, houve diminuição de 45 % e 70 %, respectivamente, nas concentrações de GSH-t (Fig. 21A).

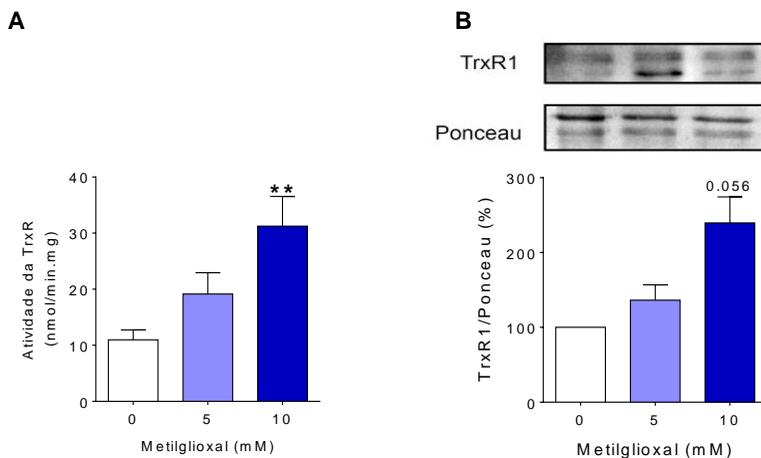


**Figura 21 – Efeito do MGO sobre a concentração total de GSH e atividade e imunocentúdos de GR em fatias de hipocampo.** Fatias de hipocampo foram expostas a 0, 5 ou 10 mM de MGO por 60 minutos e, em seguida foram avaliadas (A) as concentrações totais de GSH, (B) a atividade GR e (D) e imunocentúdos de GR. Os dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M (N = 6). Diferenças significativas estão indicadas em relação ao grupo controle \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

Ainda, de forma interessante, o tratamento com MGO induziu um forte aumento na atividade e no imunocontéudo da GR (Fig. 21B-C). Em fatias expostas a 10 mM de MGO, a GR sofreu um aumento de 2,9 vezes em sua atividade (Fig. 21B), e 4,7 vezes em seu imunocontéudo (Fig. 21C). A concentração de 5 mM de MGO, no entanto, não provocou alterações significativas na atividade da GR sendo que, uma clara tendência pode ser observada (Fig. 21B-C).

### 5.3.3 Efeitos do MGO sobre o sistema da tiorredoxina

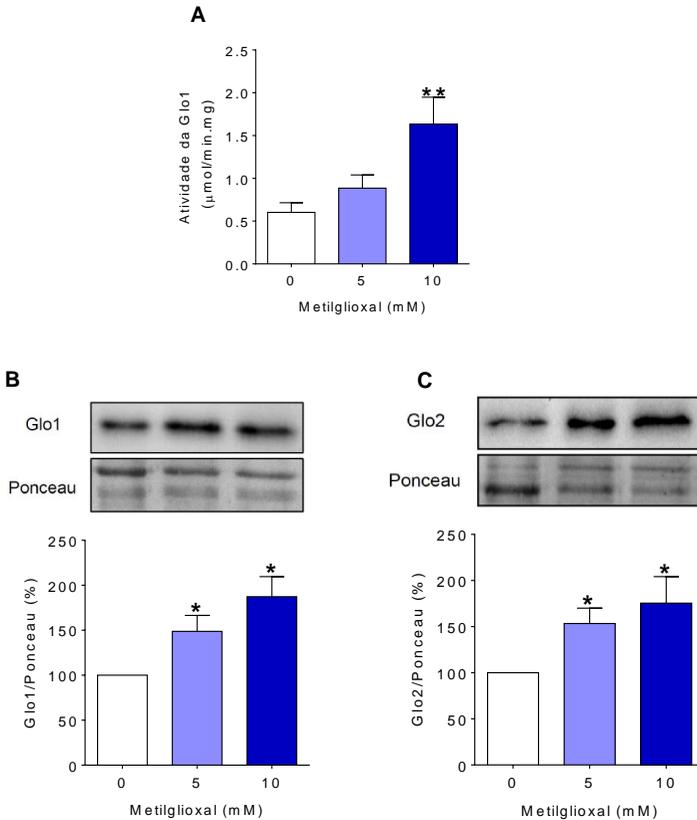
Segundo dados da literatura, o MGO pode aumentar ou inibir a atividade da TrxR, dependendo da concentração (DAFRE et al., 2015a; OBA et al., 2012; TATSUNAMI et al., 2009b). No presente trabalho, as fatias tratadas com MGO apresentaram ainda um forte aumento na atividade e no imunocontéudo da enzima TrxR (Fig. 22A-B). A atividade da TrxR (Fig. 22A) aumentou em 2,8 vezes, ao passo que seu imunocontéudo sofreu um aumento de 2,4 vezes quando a concentração de 10 mM de MGO foi utilizada. Dessa maneira, nosso trabalho demonstra que fatias de hipocampo expostas as concentrações de 10 mM de MGO, apresentam aumento na atividade e no imunocontéudo de TrxR.



**Figura 22 – Efeito do MGO sobre a atividade e imunocónteuó de TrxR1 em fatias de hipocampo.** Fatias de hipocampo foram expostas a 0, 5 ou 10 mM de MGO por 60 minutos e, em seguida foram avaliadas para (A) atividade e (B) imunocónteuó de TrxR. Os dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M (N = 6). Diferenças significativas estão indicadas em relação ao grupo controle \*\*  $p < 0,01$ .

#### 5.3.4 Efeitos do MGO sobre o sistema da glioalase

Segundo a literatura, células neuronais expostas a concentrações baixas de MGO (0,3 mM) apresentam aumento no imunocónteuó de Glo2 (DAFRE et al., 2015). No presente trabalho, o imunocónteuó de ambas as glioalases (Glo1 e Glo2) foi rapidamente induzido (1 h) pelo tratamento com MGO (Fig. 23B-C) de maneira dose-dependente. Além disso, a atividade Glo1 (Fig. 23A) e seu imunocónteuó (Fig. 23C) aumentaram 2,8 e 1,9 vezes, respectivamente, bem como os níveis da proteína Glo2 aumentaram cerca de 80% (Fig. 23C) na concentração de 10 mM de MGO.



**Figura 23 – Efeito do MGO sobre o sistema da glioxalase em fatias de hipocampo.** Fatias de hipocampo foram expostas a 0, 5 ou 10 mM de MGO por 60 minutos e, em seguida foram avaliadas para atividade Glo1 (A) e imunocntéudo da Glo1 (B) e Glo2 (C). Os dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M (N = 6). Diferenças significativas estão indicadas em relação ao grupo controle por \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ .

Dessa forma, os dados expostos no presente trabalho indicam que o tratamento de fatias de hipocampo com MGO induz uma rápida resposta de defesa aumentando as concentrações de GSH, a atividade e o imunocntéudo de GR, TrxR e Glo1 e os níveis proteicos de Glo2.

## 5.4 Discussão

De acordo com a natureza e a intensidade, o estresse celular pode desencadear vias regulatórias divergentes, as quais podem determinar o destino da célula. O uso de toxinas em concentrações farmacológicas pode ser amplamente encontrado na literatura. No presente estudo, foram utilizadas concentrações relativamente altas de MGO (5 e 10 mM), com o objetivo de ampliar os eventos iniciais (0,5 a 3 h) desencadeados pelo MGO sobre vias de sinalização celulares. Dessa forma, neste trabalho, nós confirmamos e ampliamos dados prévios já publicados em culturas celulares (DAFRE et al., 2015; OBA et al., 2012; TATSUNAMI et al., 2009b; WANG et al., 2010), visando identificar alvos moleculares relacionados a toxicidade induzida pelo MGO.

Dentre as principais respostas induzidas pelo tratamento de fatias hipocâmpais com MGO a curto prazo, estão o aumento de diversas defesas antioxidantes, dentre as quais: a) aumento na atividade e no imunoconteúdo da Glo1; b) aumento no imunoconteúdo de Glo2; c) aumento na atividade e imunoconteúdo de TrxR; e aumento na atividade e imunoconteúdo de GR. Na concentração de 5 mM, o MGO induz aumento na atividade enzimática e no conteúdo proteico das fatias de cerca de 1,4 – 1,9 vezes, quando comparado ao controle. Já a concentração de 10 mM de MGO causa uma amplificação nos sistemas de defesas celulares ainda maiores, chegando a aumentar de 2 – 4 vezes o conteúdo proteico e a atividade enzimática.

O mesmo tipo de resposta foi observado em células HT22 (0,3 – 0,75 mM de MGO), apesar de em menor intensidade. O conteúdo proteico de GR, Glo1 e Glo2 apresentou aumento de 20 – 30 % em relação ao grupo controle (dados não apresentados). De forma interessante, em células HT22 tratadas com MGO, o conteúdo proteico de TrxR apresentou diminuição (< 30%) após 30 min de tratamento. Entretanto, após 2,5 h, os valores proteicos retornaram para cerca de 90%, em relação aos níveis basais, sugerindo que a TrxR também está envolvida na resposta antioxidante dessas células (dados não apresentados). Este dado é corroborado pelo fato de que os níveis proteicos de TrxR1 estarem aumentados em células HT22, após 24 h de tratamento com MGO (DAFRE et al., 2015). Em conjunto, esses dados indicam uma indução rápida e coordenada de mecanismos protetores para combater os efeitos tóxicos do MGO. Interessantemente, em células HT22 enquanto que a atividade diminuiu de 80 para 47-70% de 0,5 para 2,5 horas, o nível proteico se recuperou, indicando que o MGO é capaz de inibir a TrxR

A diferença na indução das enzimas antioxidantes em fatias de hipocampo e células HT22 com relação ao MGO indica que a amplificação da resposta varia de acordo com o tipo celular. Sabe-se que tipos distintos de células neuronais expressam diferentes quantidades de enzimas antioxidantes e tem diferentes capacidades de eliminar ERO (DRINGEN; PAWLOWSKI; HIRRLINGER, 2005). Portanto, achamos que seria interessante estudar como diferentes tipos de células neuronais respondem a exposição ao MGO. Além disso, dados do nosso grupo demonstram uma indução consistente das defesas antioxidantes desde modelos simples (células HT22) até modelos mais complexos.

Segundo a literatura, o MGO induz a translocação do fator de transcrição nuclear Nrf2 (DAFRE et al., 2015). Essa hipótese poderia explicar a indução das defesas celulares, dentre as quais GR, TrxR1, Glo1 e Gl2. Sabe-se que a Glo1, GR, trxR1 e provavelmente a Glo2 tem sua transcrição controlada pelo Nrf2 (GUERRERO-BELTRÁN et al., 2012; HAWKES; KARLENIUS; TONISSEN, 2014; XUE et al., 2012), e isso poderia explicar a rápida indução das defesas antioxidantes após a exposição ao MGO. No entanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados objetivando investigar essa possibilidade.

A GSH é um alvo amplamente conhecido do MGO, tendo seus níveis depletados após exposição ao MGO (DAFRE et al., 2015; KALAPOUS, 2008). Nas concentrações de MGO utilizadas nos estudos previamente citados, observa-se uma rápida depleção de GSH. Uma diminuição equivalente nas concentrações de GSH foram observadas nas fatias e nas células HT22 expostas ao MGO. Diminuições nos níveis de GSH podem afetar sistemas de defesa que dependem da GSH para o funcionamento adequado. Por exemplo, a degradação de peróxido catalisada pela GPx pode ser prejudicada devido a baixas concentrações de GSH como doador de equivalentes redutores (LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2010). Níveis diminuídos de GSH também estão associados com aumento do dano causado pelo estresse oxidativo, ou seja, quanto mais elevadas as concentrações de GSH, maior a resistência ao estresse oxidativo (DRINGEN, 2000; ÖVEY; NAZIROĞLU, 2015).

A GSH é mantida na sua forma reduzida pela ação da GR (CARLBERG; MANNERVIK, 1985), a qual é uma importante defesa contra a toxicidade induzida por peróxido (DRINGEN; PAWLOWSKI; HIRRLINGER, 2005). Além disso, a inibição da GR causa aumento do estresse oxidativo e diminuição a taxa de remoção de peróxido (MITOZO et al., 2011). Já foi demonstrado que tanto a GR quanto a GSH apresentam-se diminuídas na vasculatura de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), juntamente com níveis aumentados de ERO e AGEs

(WANG et al., 2005; WU; JUURLINK, 2002), sugerindo, portanto, uma participação do MGO. A resposta protetora observada em fatias de hipocampo foi muito mais proeminente em relação a observada nas células HT22. Além disso, um aumento de 20 – 30 % no conteúdo proteico de GR foi observado, sendo que este não foi acompanhado por aumento na atividade, ao contrário a atividade diminuiu 15-25%. Isso pode indicar que a GR é inibida pelo tratamento com MGO, assim como sugerido para a TrxR, o que pode possivelmente resultar em aumento na susceptibilidade ao estresse oxidativo. Neste sentido, um estudo *in vitro* demonstrou que a GR pode ser inativada pelo MGO ou por outros aldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados (VANDER JAGT et al., 1997), uma possibilidade que deve ser futuramente investigada.

A TrxR tem papel fundamental na regulação dos níveis de peróxidos celulares (DRECHSEL; PATEL, 2010). Diminuições na atividade Trx ou comprometimento na atividade da TrxR podem ter uma ação indireta sobre a regeneração de peroxirredoxinas, afetando assim, a habilidade da célula na eliminação de peróxidos (LU; HOLMGREN, 2014a; POYNTON; HAMPTON, 2014). Dessa forma, inibições na atividade da TrxR e, portanto, inibição da redução da Trx, estão associadas a diminuição na capacidade celular de combate ao estresse oxidativo (LENNICKE et al., 2015; PERKINS et al., 2015). Os tratamentos com MGO induziram diminuição do conteúdo proteico e da atividade da TrxR. De fato, a atividade e os níveis proteicos diminuíram de 20 – 50 %, 30 minutos após o tratamento com MGO, indicando claramente que o MGO afeta a atividade TrxR, tanto por diminuir seu conteúdo proteico ou por induzir a inibição da enzima ou ainda, ambos. Além disso, o MGO causa a glicação da TrxR, o que indica que este pode ser um dos mecanismos pelo qual o MGO inibe essa enzima (DAFRE et al., 2015), de acordo algumas evidencias demonstrando que o MGO pode de fato inibir a TrxR (TATSUNAMI et al., 2009).

## 5.5 Conclusão

De modo geral, este foi o primeiro estudo que demonstrou que o MGO compromete a atividade e o imunoconteúdo de GR em fatias hipocâmpais. O MGO causa uma indução rápida e robusta de GR, Glo1, Glo2, Gr e TrxR1 em fatias de hipocampo. Esses dados reforçam a hipótese de que alterações no ambiente redox podem ser o principal mecanismo de toxicidade induzido pelo MGO. Além disso, nossos dados demonstram que existe um claro efeito sinérgico entre a toxicidade induzida pelo MGO e a inibição da GR e da TrxR, sugerindo a toxicidade induzida pelo MGO é mediada pela depleção de antioxidantes celulares. Os dados aqui apresentados sugerem que os sistemas redutores de tiol GSH/GR e Trx/TrxR podem desempenhar papéis importantes na toxicidade induzida pelo MGO, um tópico interessante para futuras investigações.

**6. EFEITOS DO TRATAMENTO DE METILGLIOXAL SOBRE  
VIAS DE SINALIZAÇÃO RELACIONADAS A AUTOFAGIA EM  
CÉLULAS NEURAIS (CAPÍTULO 3)**



## 6.1 Contextualização

Dados prévios do nosso grupo demonstraram que os sistemas da glioxalase e da tioredoxina são alvos moleculares do MGO (DAFRE et al., 2015). Nesse trabalho, foi demonstrado que células neuronais HT22 expostas ao MGO (0,3 e 0,75 mM) apresentam diminuição da atividade TrxR, bem como de seus níveis proteicos, além de induzir diminuição nos níveis de Glo2. No entanto, os mecanismos relacionados a esses efeitos ainda estão indeterminados.

Dessa forma, neste trabalho verificamos se a degradação de Trx1 e de Glo2 em células HT22 ocorre através de aumento na ativação do proteassoma ou pela indução de autofagia. Além disso, também verificamos se os efeitos observados são mediados pela ativação da proteína AMPK.

## 6.2 Materiais e métodos

### 6.2.1 Cultura celular e tratamentos

Foram utilizadas células neuronais imortalizadas de hipocampo de camundongos (HT22) ou *mouse embryonic fibroblasts* (MEFs). As células foram cultivadas em meio DMEM rico em glicose e suplementado com 10% de soro fetal bovino, conforme previamente descrito na literatura (DAFRE et al., 2015a). Para determinar as concentrações de MGO a serem utilizadas nos tratamentos,  $5 \times 10^3$  células foram semeadas em placas de 96 poços e crescidas até atingirem semi-confluência. As células foram então tratadas com diferentes concentrações de MGO (0,1 – 0,5 mM) e após 24 h a viabilidade foi avaliada pelo teste do MTT (descrito no item 10.3). Nenhuma das concentrações de MGO testadas causou diminuição significativa na sobrevivência das células conforme analisado pelo teste do MTT.

### 6.2.2 Transfecção

Para a transfecção do RNA de interferência (siRNA), células HT22 ( $5 \times 10^5$ ) foram semeadas em placas de 60 mm e 10 pmol de siRNA de ATG5 ou siRNA controle foram utilizados, bem como RNAiMAX (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

### 6.2.3 Western blot

Células HT22 ( $1.5 \times 10^5$ ) foram semeadas em placas de 60 mm. Após atingirem 80% de confluência, e então tratadas com MGO. Ao final do tratamento, as células passaram por duas lavagens em tampão Tris-salina gelado em seguida, coletadas em tampão de amostra (25 mM Tris, pH 8.0, 2% SDS, 25 mM 2-mercaptoetanol, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ).

Os demais procedimentos incluindo eletroforese, transferência e incubação com os respectivos anticorpos foram realizadas conforme descrito no item 4.2.4.4.

### 6.2.4 Análise estatística

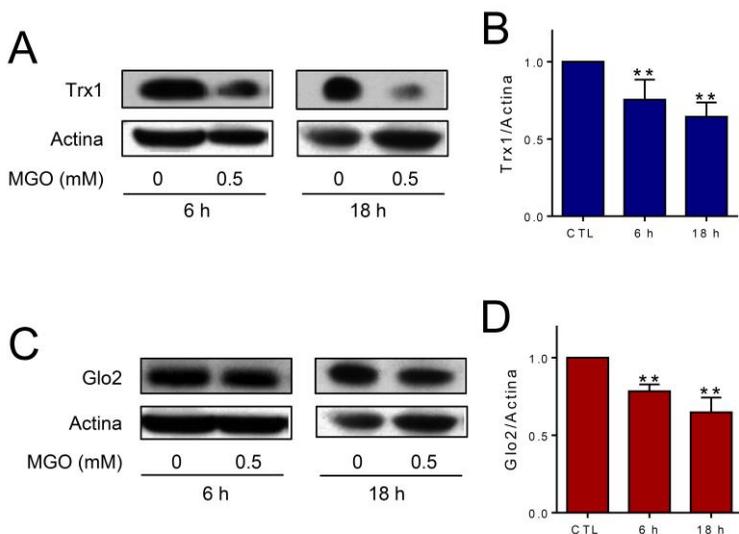
As análises estatísticas foram realizadas através de ANOVA de uma via, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Kruskal-Wallis. Nos experimentos onde foram utilizados os inibidores de autofagia (bafilomicina (BAF) e cloroquina (CQ) ou proteassomais (MG123), as

análises foram realizadas através do teste  $t$  de Student não-paramétrico, de modo a comparar os grupos tratados com os controles não tratados. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo 3 experimentos independentes e as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0.05$ .

### 6.3 Resultados

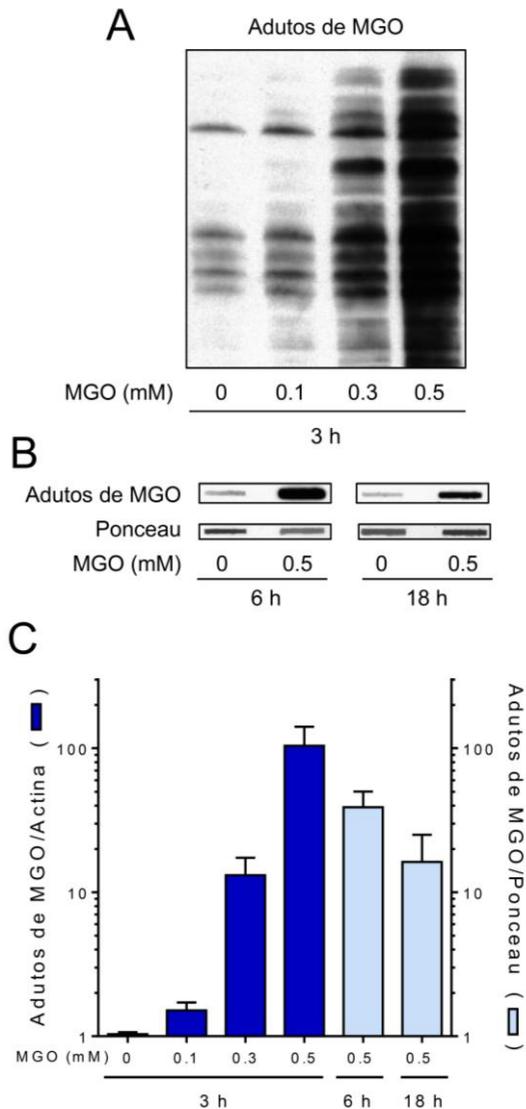
Dados prévios do nosso grupo demonstraram que os sistemas da glioxalase e da tioredoxina são alvos moleculares do MGO (DAFRE et al., 2015). No entanto, os mecanismos relacionados a esses efeitos ainda estão indeterminados. Dessa forma, neste trabalho, estudamos se os efeitos deletérios do MGO sobre a Trx1 e a Glo2 são mediados pela ativação de autofagia ou do sistema proteassomal.

Para isso, em um primeiro momento foram reproduzidos os dados do trabalho prévio, no qual foi demonstrado que quando células HT22 são tratadas com MGO, em doses que não afetam a sua viabilidade, há diminuição nos imunocontéudos das proteínas Trx1 (Fig. 24A-B) e Glo2 (Fig. 24C-D).



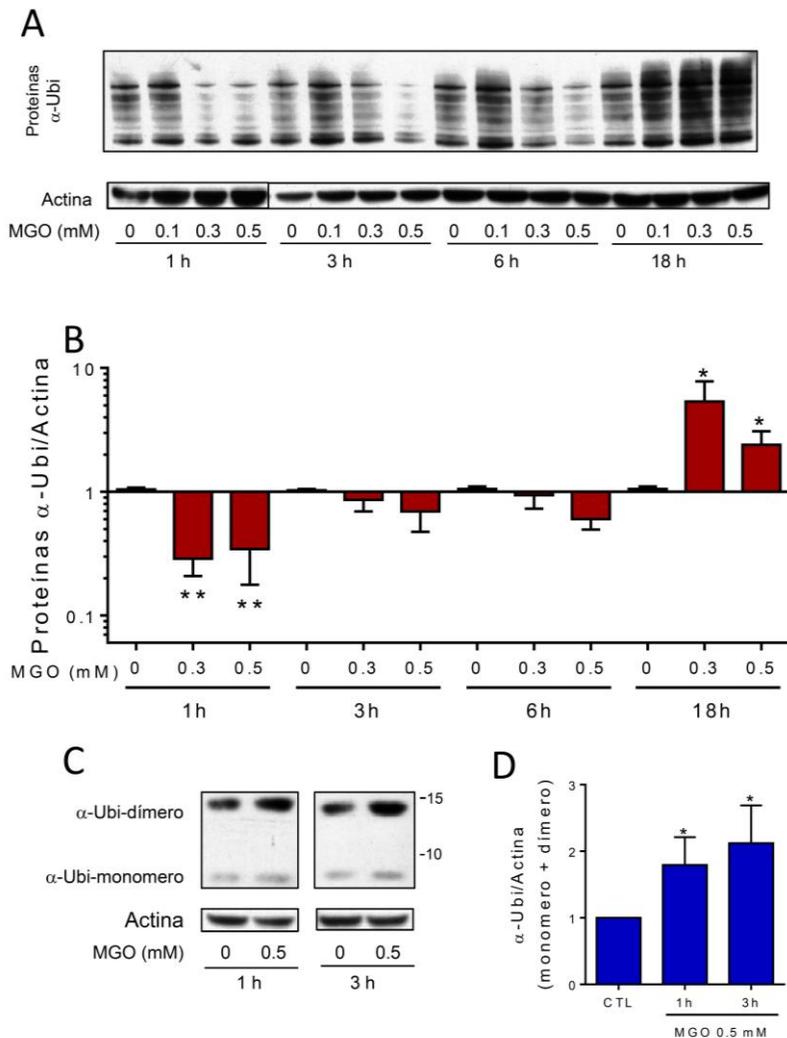
**Figura 24. Níveis relativos de Trx1 e Glo2 em células HT22 tratadas com MGO.** (A e B) Trx1 e (C e D) Glo2. Imagens representativas (A e C) e quantificação (B e D) de Western bittings. Células HT22 foram tratadas por 6 ou 18 h com 0,5 mM de MGO. Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle estão indicadas por \*\* $p < 0,01$  (N = 4-6).

O MGO pode se ligar a resíduos de aminoácidos formando adutos com proteínas, e portanto, comprometendo a função destas (OYA et al., 1999). Conforme demonstrado na Figura 25, após 3 h de tratamento, houve um aumento significativo nas proteínas modificadas pelo MGO, ou seja, das proteínas que formaram adutos com o MGO, de forma dose-dependente (Fig. 25A). Deve-se ressaltar que a formação de proteínas modificadas pelo MGO é maior nas primeiras horas de tratamento, sofrendo diminuição com o passar do tempo (Fig. 25B-C).



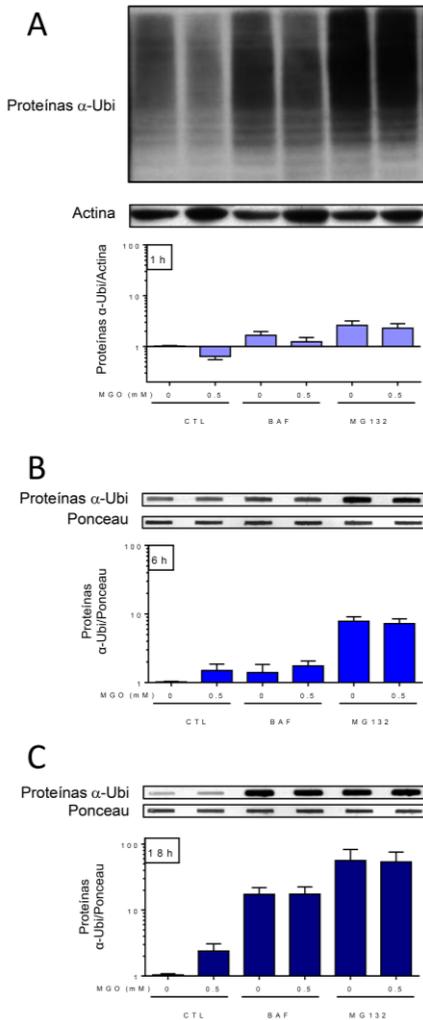
**Figura 25. Adutos entre proteínas e MGO em células HT22.** O tratamento por 3 (A), 6 ou 18 h (B) com MGO induziu, de forma dose-dependente a formação de proteínas modificadas pelo MGO (adutos MGO-proteínas), conforme demonstrado por Western blotting (3 h) ou slot blot (6 e 18 h). (C) Gráfico representativo dos dados de A e B (N = 4-5).

As proteínas danificadas são marcadas para ubiquinação e removidas por processos celulares degradativos, dentre os quais a autofagia e o sistema proteassomal (HERHAUS; DIKIC, 2015; LIPPAI et al., 2014). A ubiquinação de proteínas pode ser quantificada por análise de Western blot, conforme demonstrado na Figura 26. De modo interessante, pode-se observar que a ubiquinação das proteínas foi rapidamente diminuída (1 h) pelo tratamento com MGO, retornando aos níveis basais após 3-6 h (Fig. 26A-B). Sabe-se que o MGO pode reagir com resíduos de lisina e arginina, levando a inibição da ubiquinação das proteínas (TAKIZAWA; TAKADA; OHKAWA, 1993a; UCHIKI et al., 2012). Esse fato explicaria o aumento da  $\alpha$ -ubiquitina imediatamente após o tratamento com MGO, conforme representado pelo aumento na forma dímero/monômero da  $\alpha$ -ubiquitina na Figura 26C-D. Deve-se ressaltar que os adutos formados pelo MGO com proteínas são instáveis, favorecendo a formação de AGEs, os quais são altamente ubiquitinados (GRILLO; COLOMBATTO, 2008; JACK; WRIGHT, 2012). Essa idéia seria uma explicação condizente com o aumento observado na quantidade de proteínas ubiquinadas 18 h após o tratamento com MGO (Fig. 26A-B).



**Figura 26. Proteínas ubiquitinadas em células HT22 tratadas com MGO.** (A) Células foram tratadas com MGO nos tempos e concentrações indicados, e a ubiquinação das proteínas avaliada por Western blotting (A e B). Soma dos monômeros e dímeros de  $\alpha$ -ubiquitina (C e D). Diferenças estatísticas em relação ao controle estão indicadas por \* $p < 0,05$  ou \*\* $p < 0,01$  (N = 4-7).

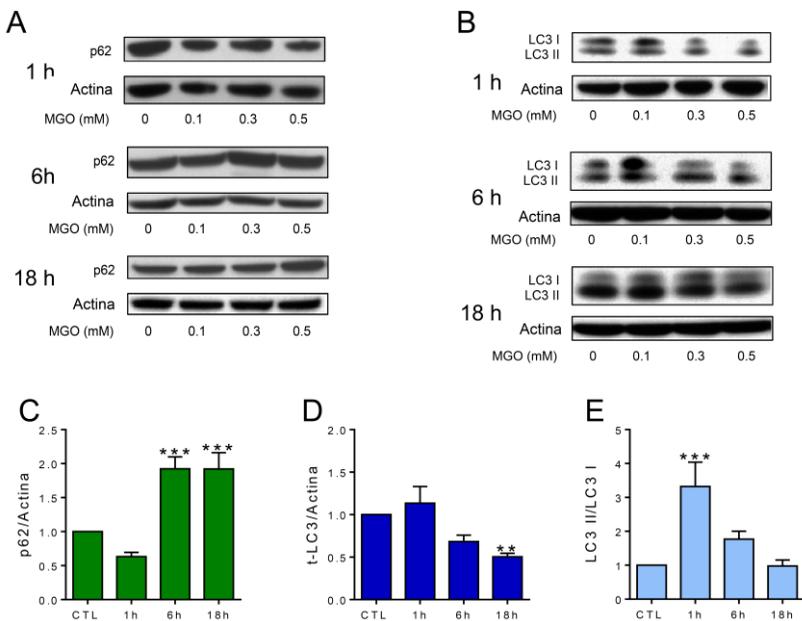
Tanto o processo de autofagia quanto a ativação do proteassoma estão associados a degradação de proteínas modificadas (BAO et al., 2016). Para investigar o funcionamento de ambos os sistemas em células HT22, as mesmas foram pré-tratadas com bafilomicina (BAF) ou MG123, os quais inibem a autofagia e o proteassoma, respectivamente. Conforme esperado, ambos os inibidores aumentam progressivamente a concentração de proteínas ubiquitinadas ao longo do tempo (Fig. 27). A quantidade de proteínas ubiquitinadas teve um aumento de 1,5 vezes em 1 h (Fig. 27A) e 6 h (Fig. 27B) após o tratamento com BAF. Além disso, 18 h após de tratamento com BAF, as proteínas ubiquitinadas aumentaram 17 vezes (Fig. 27C).



**Figura 27. Efeito dos inibidores de autofagia e proteassoma sobre a ubiquitinação de proteínas.** Após pré-tratamento com o inibidor de autofagia bafilomicina A (BAF, 1  $\mu$ M) ou do proteassoma MG123 (30  $\mu$ M) por 1 h, células HT22 foram tratadas com 0,5 mM de MGO por 1 h (A), 6 (B) ou 18 h (C). Após eletroforese (A) ou slot blot (B e C), e transferência para membranas de PVDF, o conteúdo total de proteínas foi testado para  $\alpha$ -ubiquitina e está apresentado em relação ao conteúdo de actina (A) ou Ponceau S (B e C) (N = 3-4).

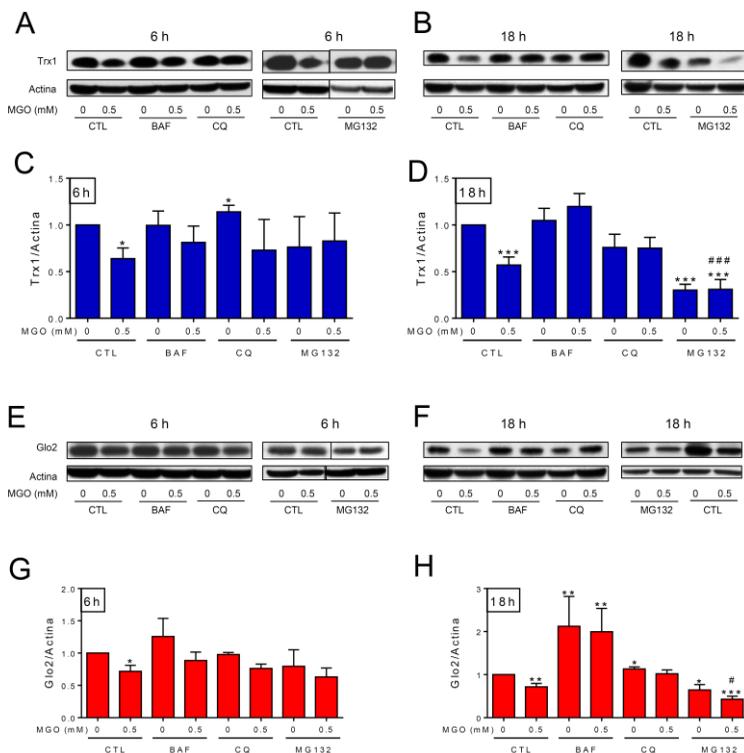
Apesar da BAF ter um efeito inibitório sobre a degradação de proteínas danificadas, o efeito do tratamento com MG123 foi mais efetivo, pois este, causou um aumento nas proteínas ubiquitinadas de 2,6 vezes em 1 h, 8 vezes em 6 h e 50 vezes em 18 h. Ainda, o MGO não foi capaz de aumentar significativamente o acúmulo de proteínas ubiquitinadas causado pelo BAF ou pelo MG123 em células HT22 (Fig. 27).

A indução da autofagia pelo MGO já foi previamente demonstrada na literatura em células endoteliais e da retina (CHANG et al., 2015; FANG et al., 2015; LIU et al., 2012), de modo que no presente trabalho foi investigado se o mesmo efeito ocorre em células HT22. Conforme indicado nas Figuras 28A-C, o tratamento com MGO induziu alterações na expressão da proteína p62, a qual é uma proteína adaptadora de autofagia, ou seja, que conecta as proteínas ubiquitinadas com o autofagossomo. Na primeira hora de tratamento com MGO (0,5 mM), a expressão de p62 apresentou leve diminuição, sofrendo um aumento de aproximadamente 2 vezes após 6 h e 18 h de tratamento. Além do p62, avaliou-se ainda outro marcador de autofagia, a proteína LC3 (Fig. 28B, D e E). O que se observou foi que após 18 h de tratamento com MGO houve uma diminuição nos níveis de LC3 (Fig. 28B-D). Após a indução da autofagia, a forma não modificada de LC3 (LC3 I) sofre adição de fosfatidiletanolamina, que apesar de ter peso molecular maior, aparece como uma banda abaixo do LC3 I em SDS-PAGE (LC3 II), provavelmente por ser uma molécula altamente hidrofóbica (MIZUSHIMA; YOSHIMORI, 2007). A formação de LC3 II é considerada como um marcador de autofagia (KIM; LEE, 2014). Células HT22 tratadas com 0,5 mM de MGO por 1 h demonstraram um claro aumento nos níveis de LC3 II (Fig. 28B e E), o qual foi decaindo progressivamente com o passar do tempo. Dessa forma, os dados obtidos demonstram que o MGO causa aumento de processos autofágicos.



**Figura 28. Efeitos do MGO sobre marcadores e autofagia.** Células HT22 foram tratadas com 0,5 mM de MGO, conforme os tempos indicados. Membranas foram testadas com anticorpos para (A) sequestosoma (p62), (B) LC3 (LC3 I + LC3 II). A quantificação dos dados está apresentada como: (C) p62; (D) LC3 total e (E) a forma lipídica e ativa de LC3 (LC3 II). Diferenças estatísticas estão indicadas em relação ao controle por  $**p < 0,01$  ou  $***p < 0,001$  (N = 5-7).

Após a caracterização dos efeitos do tratamento com os inibidores da autofagia e do proteassoma em células HT22 (dados não apresentados), avaliou-se a sua habilidade em prevenir os efeitos sobre a diminuição dos níveis de Trx1 e Glo2 após o tratamento com MGO (Fig.29). Ambos os inibidores de autofagia utilizados, BAF e cloroquina (CQ), impediram a degradação de Trx1 em 6 h (Fig. 29A e C) e 18 h (Fig. 29B e D). Além disso, preveniram ainda a diminuição da expressão de Glo2 em 6 h (Fig. 29E e G) e 18 h (Fig. 29F e H). Interessantemente, tanto a BAF quanto a CQ *per se* causaram aumento nos níveis de Glo2 em 18h.

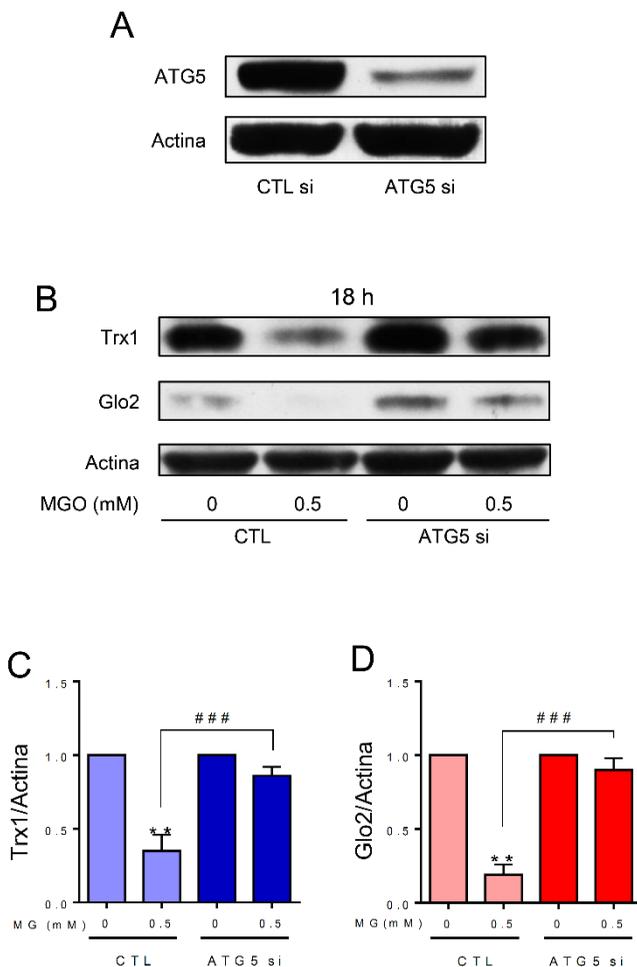


**Figura 29. Efeito dos inibidores de autofagia e proteassomal sobre os níveis proteicos de Trx1 e Glo2.** Após pré-tratamento com os inibidores de autofagia (BAF, 1  $\mu$ M ou CQ, 10  $\mu$ M) ou do proteassoma (MG132, 30  $\mu$ M), as células HT22 foram tratadas com 0,5 mM de MGO por 6 h (A, C, E e G) ou 18 h (B, D, F e H) e em seguida os níveis de Trx1 (A – D) e Glo2 (E – H) foram avaliados. Diferenças estatísticas em relação ao controle não tratado (0, CTL) estão indicadas por \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , ou em relação ao grupo tratado com MGO 0,5 mM (0,5, CTL) por #  $p < 0,05$  ou ###  $p < 0,001$  (N = 3-4 em 6 h e N = 5-8 em 18 h).

Seis horas após o tratamento com MGO, o inibidor do proteassoma MG123 também preveniu a diminuição nos níveis de Trx1 induzida pelo MGO (Fig. 29A e C) e da Glo2 (Fig. 29E e G). No entanto,

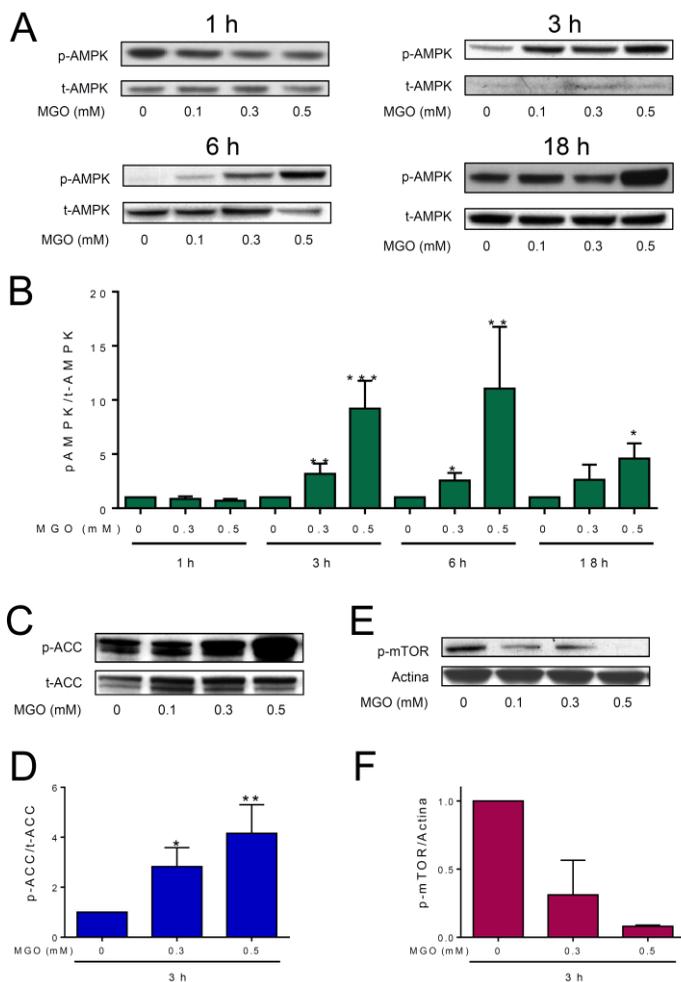
no tempo de 18 h, o MG123 causou diminuição nos níveis de Trx1 e Glo2 *per se*, e ainda, a sua combinação com MGO causou uma diminuição ainda mais forte da Trx1 e da Glo2, quando comparado ao efeito somente do MGO.

Para confirmar que a depleção de Trx1 e Glo2 causada pelo MGO é mediada por autofagia, a expressão da proteína autofágica Atg5 foi diminuída pelo uso de siRNA (Fig. 30A). A proteína Atg5 tem um papel essencial para o funcionamento do *complex ubiquitin-like conjugation systems 3*, e portanto, é essencial para a autofagia (NODA; INAGAKI, 2015). O tratamento com MGO por 18 h produziu uma diminuição nos níveis de Trx1 (Fig. 30A e B) e da Glo2 (Fig. 30B e D). No entanto, a depleção dessas proteínas induzida pelo MGO não foi observada nas células tratadas com siRNA para Atg5. Estes resultados confirmam que a diminuição nos níveis de Trx1 e Glo2 é feito através de degradação por autofagia.



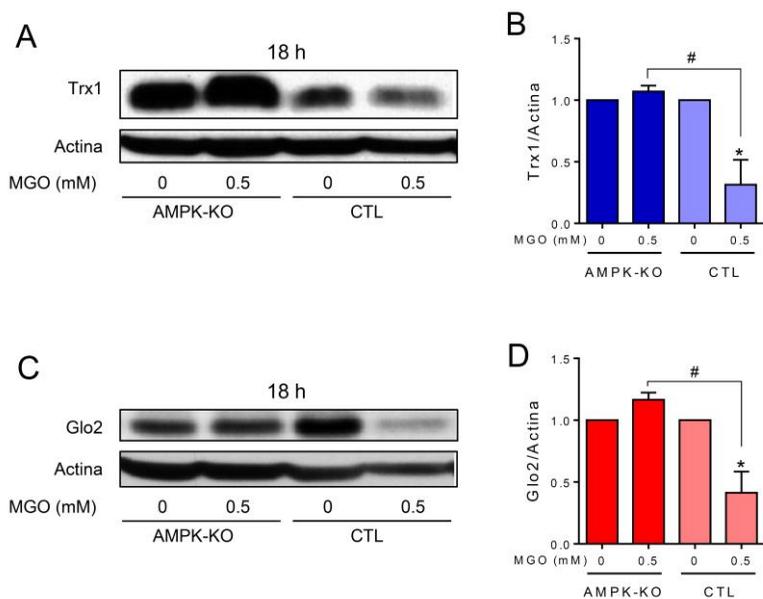
**Figura 30. Efeito do siRNA contra *Atg5* sobre a expressão de *Trx1* e *Glo2* em células HT22 tratadas com MGO.** (A) Efetividade do siRNA contra *ATG5* pode ser conferida pela diminuição de seu conteúdo proteico; O conteúdo proteico de *Trx1* (B e C) e *Glo2* (B e D) diminuíram após o tratamento de 0,5 mM de MGO por 18 h em células tratadas com siRNA controle (CTL si), mas não em células tratadas com siRNA contra *ATG5* (ATG si). Diferenças estatísticas entre o controle não tratado estão indicadas por \*\* $p < 0,01$  em relação ao CTL; ou ###  $p < 0,001$  relativo a diferença entre o siRNA controle (CTL si) e siRNA *Atg5* (ATG5 si) tratado com MGO (N = 3).

O MGO pode induzir a ativação de AMPK (CHANG et al., 2016), a qual é uma conhecida indutora de autofagia (KIM et al., 2011b). Portanto, a fosforilação da AMPK foi avaliada como um possível mecanismo mediador dos efeitos do MGO sobre a Trx1 e Glo2. O sítio de fosforilação da AMPK investigado foi o de serina 172, o qual sabe-se estar relacionado a ativação de AMPK (HARDIE, 2008; XUE; KAHN, 2006). Os níveis de p-AMPK não sofreram alteração pelo tratamento com MGO por 1 h, mas após 3 h, o tratamento com MGO induziu um aumento de 10 vezes na p-AMPK (Fig. 31A-B). Os níveis de p-AMPK permaneceram elevados em 6 h (3 vezes) e 18 h (5 vezes) após o tratamento com MGO. O efeito do MGO sobre a fosforilação da AMPK ocorreu de forma dose-dependente nos tempos de 3, 6 e 18 h. Para confirmar que a ativação da AMPK pelo tratamento com MGO, a fosforilação dependente de AMPK foi avaliada na enzima acetil coenzima A carboxilase (ACC), um conhecido alvo da AMPK. No tempo de 3 h, quando os níveis de fosforilação da AMPK foram máximos, os níveis de p-ACC aumentaram progressivamente conforme as concentrações de MGO aumentava (Fig. 31C), chegando a um aumento de 4 vezes na concentração de 0,5 mM de MGO. A ativação da AMPK normalmente está associada a inibição de mTOR e indução da autofagia (DUNLOP; TEE, 2014). Portanto, foi avaliada a fosforilação do resíduo de serina 2448, relacionado a ativação do mTOR. Conforme demonstrado na Figura 31D, a fosforilação de mTOR (p-mTOR) diminuiu drasticamente, sendo praticamente indetectável após 3 h de tratamento com a concentração de 0,5 mM de MGO. Isto indica que a atividade mTOR foi fortemente diminuída pelo tratamento com MGO, provavelmente pela ativação de AMPK.



**Figura 31. Efeitos do MGO sobre a via da AMPK/mTOR.** Células HT22 foram tratadas com MGO conforme os tempos e concentrações indicados. Membranas foram testadas com anticorpos para p-AMPK (A e B); p-ACC (C e D); ou p-mTOR (E e F). Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle estão indicadas por \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  ou \*\*\*  $p < 0.001$  (N = 4-7; p-mTOR, N = 2).

Para confirmar que o desaparecimento de Trx1 e Glo2, induzida pelo MGO, seja de fato mediado pela ativação da AMPK, o tratamento com MGO foi repetido com fibroblastos embrionias de camundongos (MEFs) deficientes em AMPK (Fig. 32). O tratamento dessas células com MGO por 18 h gerou uma diminuição de mais de 50 % nos níveis de Trx1 (Fig. 32A-B) e Glo2 (Fig. 32C-D) nas MEFs selvagens, ao passo que ambas as proteínas foram preservadas nas MEFs deficientes em AMPK. Esses resultados dão forte suporte a hipótese de que a degradação da Trx2 e da Glo2 em células HT22, induzida pelo tratamento com MGO, se dá por meio de autofagia mediada pela ativação de AMPK.



**Figura 32. Expressão de Trx1 e Glo2 em MEFs selvagens e MEFs deficientes em AMPK tratadas com MGO.** O conteúdo proteico de Trx1 (A e B) e Glo2 (C e D) mostrou-se diminuído após o tratamento com 0,5 mM de MGO por 18 h nas MEFs selvagens (CTL), mas não nas MEFs deficientes em AMPK (AMPK-KO). Diferenças estatísticas entre o controle não tratado em relação as MEFs selvagens estão indicadas por \*  $p < 0,05$ ; ou relativo à diferença entre MEFs AMPK selvagem (CTL) e deficientes em AMPK (AMPK-KO) tratadas com MGO por #  $p < 0,05$  (N = 3-4).

## 6.4 Discussão

Em estudo anterior nosso grupo já havia demonstrado que o MGO induz uma diminuição na expressão de Trx1 e Glo2 em células HT22 (DAFRE et al., 2015), fato que foi reproduzido neste estudo (Fig. 26). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar se a diminuição dessas proteínas induzida pelo MGO ocorre por degradação pela via autofágica ou proteossomal.

Para caracterizar o perfil temporal das modificações proteicas induzidas pelo MGO, foi demonstrado que a formação de adutos entre as proteínas e o MGO aumenta conforme o aumento na concentração de MGO, atingindo seu pico máximo em 3 h e, decaindo progressivamente após isso (6 e 18 h). Esse perfil é compatível com uma condensação inicial entre o grupamento carbonil do MGO e o átomo de guanidina dos resíduos de lisina/arginina de proteínas. Rearranjos subsequentes podem produzir diversos adutos modificados covalentemente em proteínas, conhecidos coletivamente pelo nome de AGEs (ALDINI et al., 2014; RABBANI; XUE; THORNALLEY, 2016; VISTOLI et al., 2013), levando a diminuição do sinal de adutos entre MGO e proteínas com o passar do tempo (Fig. 27).

Proteínas modificadas são muitas vezes marcadas para degradação por meio de ubiquitinação. Após 1 h de tratamento com o MGO, a ubiquitinação de proteínas mostrou-se significativamente diminuída, fato que não pode ser atribuído a falta de substrato ( $\square$ -ubiquitina), uma vez que seus níveis se mostraram aumentados após 1 e 3 h de tratamento com MGO. Estudos da literatura já demonstraram que a formação de adutos entre o MGO e proteínas inibe a ubiquitinação destas, o que se deve principalmente ao fato de que os resíduos de arginina e lisina modificados pelo MGO, são àqueles que sofrem ubiquitinação (TAKIZAWA; TAKADA; OHKAWA, 1993b; UCHIKI et al., 2012). No presente trabalho é demonstrado que a ubiquitinação aumenta após 18 h de tratamento com MGO, o que está de acordo com a idéia de que o proteossoma está inibido ou sobrecarregado. Dados da literatura suportam ambas as possibilidades, uma vez que as proteínas modificadas por AGEs são menos susceptíveis a degradação por tripsina e pela atividade proteossomal do tipo quimioproteína, além de haver um efeito inibitório da glicação sobre a atividade proteossomal (BULTEAU et al., 2001; KAPPAHN; BIGELOW; FERRINGTON, 2007; QUEISSER et al., 2010; UCHIKI et al., 2012).

O aumento na ubiquitinação de proteínas após o tratamento com MGO sugere um comprometimento da atividade proteossomal, fato já

previamente descrito na literatura em diversos modelos de exposição a agentes glicantes, como o MGO (BULTEAU et al., 2001; QUEISSER et al., 2010; UCHIKI et al., 2012). Por outro lado, o MGO induziu um aumento na forma ativa de LC3 e uma indução consistente de p62, ambos marcadores de ativação de autofagia. Já foi demonstrado que o MGO causa indução de Nrf2 em células HT22 (DAFRE et al., 2015b), e que o p62 é induzido via Nrf2 (ICHIMURA et al., 2013). Além disso, o MG123 é também um indutor de Nrf2 e de p62 (CUI et al., 2013). Em conjunto, esses dados sugerem que o MGO seja um bom indutor de autofagia, o que já foi comprovado em células epiteliais pigmentadas da retina e células endoteliais (CHANG et al., 2015; FANG et al., 2015; LIU et al., 2012).

Dessa forma, foi hipotetizado que um aumento no fluxo autofágico poderia ser o responsável pela diminuição de Trx1 e Glo2 após o tratamento com MGO. Para confirmar essa hipótese, células HT22 foram expostas ao MGO após o pré-tratamento com inibidores de autofagia e de proteassoma. Os resultados obtidos revelam que os inibidores de autofagia (BAF e CQ) e do proteassoma (MG123) inibem a degradação de Trx1 e Glo2 após 6 h de tratamento com MGO. Após 18 h de tratamento, tanto a BAF quanto a CQ mantiveram-se efetivas na prevenção da degradação de Trx1 e Glo2. Além disso, os níveis basais de Trx1 (6 h) e Glo2 (18 h) sofreram aumento após o tratamento com os inibidores de autofagia, principalmente a BAF. Em contraste, o tratamento com MG123 por 18 h diminuiu tanto os níveis de Trx1 quanto de Glo2. Levando em consideração que o MG123 aumenta os níveis de LC3 II, LC3 total e p62 (dados não demonstrados), além de ser considerado um indutor de autofagia (BAO et al., 2016; CUI et al., 2013; J. ZHAN, [s.d.]), parece razoável propor que a degradação de Trx1 e Glo2 seja mediada por autofagia. Em combinação com o MGO, o efeito do MG123 foi ainda maior quando comparado somente ao efeito do MGO, sugerindo assim que os efeitos estimulatórios do MGO sobre a autofagia sejam somados aos do tratamento com MG123. Além disso, o uso de siRNA para a inibição específica da proteína Atg5, essencial para a autofagia (NODA; INAGAKI, 2015), foi capaz de prevenir a diminuição da Trx1 e da Glo2 induzida pelo MGO, corroborando com a idéia de que ambas as proteínas são degradadas por autofagia.

O forte aumento ( $\geq 3x$ ) na fosforilação da AMPK nos tempos de 3, 6 e 18 h após o tratamento com 0,5 mM de MGO sugere que a autofagia foi induzida via ativação de AMPK. Esse aumento significativo na ativação da AMPK foi confirmado por um aumento na fosforilação da enzima ACC, a qual constitui um substrato conhecido da AMPK (XUE; KAHN, 2006). A AMPK ainda fosforila e ativa a proteína TSC, a qual,

por sua vez inibe a ativação de mTOR (KIM et al., 2011b). Dessa maneira, diminuições na fosforilação de mTOR podem ser consideradas como evidências indiretas da ativação de AMPK, conforme demonstrado na Figura 33C.

Para testar se a degradação de Trx1 e Glo2 é dependente de AMPK, MEFs deficientes em AMPK foram tratadas com MGO por 18 h. De maneira similar as células HT22, Trx1 e Glo2 foram degradadas pelo MGO em MEFs selvagens. No entanto, MEFs com deficiência em AMPK mostraram-se insensíveis ao MGO, mantendo níveis inalterados de Trx1 e Glo2

## 6.5 Conclusão

Os dados apresentados nesse trabalho sugerem que ao MGO induz autofagia via ativação de AMPK, e que a Trx1 e a Glo2 são degradadas através da autofagia. Essas conclusões baseiam-se em:

(a) no aumento das proteínas ubiquitinadas após 18 h de tratamento com MGO, indicando que o proteassoma sofre inibição ou sobrecarga, fatos que conhecidamente ativam a autofagia (BAO et al., 2016; CUI et al., 2013; J. ZHAN, 2016);

(b) o aumento que o MGO induz os marcadores de autofagia p62 e LC3 II;

(c) ambos os inibidores de autofagia (BAF e CQ) preveniram a diminuição da Trx1 e da Glo2 causada pelo MGO;

(d) o inibidor do proteassoma MG123, que conhecidamente ativa a autofagia (BAO et al., 2016; CUI et al., 2013; J. ZHAN, 2016), promove desaparecimento de Trx1 e Glo2;

(e) a inibição da transcrição de ATG5, proteína essencial para a autofagia, também previne a diminuição da Trx1 e Glo2;

(f) a ativação persistente de AMPK e a defosforilação da mTOR sugerem que a autofagia seja ativada via inibição da mTOR (DUNLOP; TEE, 2014);

(g) após o tratamento com MGO, MEFs deficientes em AMPK apresentam níveis inalterados de Trx1 e Glo2.

## 7. PERSPECTIVAS

Os dados apresentados neste trabalho, indicam que o consumo crônico de frutose em camundongos está associado ao desenvolvimento de alterações sistêmicas, como dislipidemias e alterações no metabolismo hepático, além de estar claramente associado ao desenvolvimento de hiperlocomoção em camundongos adultos. Foi também demonstrado *in vitro* que o provável mecanismo pelo qual o MGO induz toxicidade é através da depleção de sistemas antioxidantes dependentes de tióis como GSH/GR e Trx/TrxR. Além disso, neste trabalho foi demonstrado que o mecanismo pelo qual o MGO induz degradação de Trx e Glo2 é mediado pela indução da autofagia, mediada pela ativação da AMPK mediada pelo MGO.

Este trabalho apresenta como perspectivas futuras investigar quais os mecanismos moleculares relacionados a hiperlocomoção induzida pelo consumo de frutose, e se estes são de fato mediados pela frutose, ou por seu metabólito, o MGO. Além disso, acreditamos que a partir dos efeitos aqui demonstrados do MGO sobre o comprometimento dos sistemas antioxidantes e a indução de autofagia, parece promissor o estudo de compostos capazes de reverter ou prevenir esses efeitos danosos, de modo que sejam criadas novas possibilidades de fármacos visando o tratamento das patologias associadas ao aumento do MGO, como diabetes e doença de Alzheimer.



## REFERENCIAS

- ABORDO, E. A.; MINHAS, H. S.; THORNALLEY, P. J. Accumulation of alpha-oxoaldehydes during oxidative stress: a role in cytotoxicity. *Biochemical Pharmacology*, v. 58, n. 4, p. 641–648, 1999.
- AGRAWAL, R.; GOMEZ-PINILLA, F. “Metabolic syndrome” in the brain: deficiency in omega-3 fatty acid exacerbates dysfunctions in insulin receptor signalling and cognition. *The Journal of Physiology*, v. 590, n. 10, p. 2485–2499, 2012.
- AHMED, N. Advanced glycation end products-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 67, n. 1, p. 3–21, 2005.
- ALDINI, G. et al. Novel molecular approaches for improving enzymatic and nonenzymatic detoxification of 4-hydroxynonenal: toward the discovery of a novel class of bioactive compounds. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 69, p. 145–156, 2014.
- ALLAMAN, I.; BÉLANGER, M.; MAGISTRETTI, P. J. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. *Frontiers in Neuroscience*, v. 9, p. 23, 2015.
- ALLEN, R. E.; LO, T. W. C.; THORNALLEY, P. J. Purification and characterization of glyoxalase II from human red blood cells. *European Journal of Biochemistry*, v. 213, n. 3, p. 1261–1267, 1993.
- ANANDARAJA, S. et al. Low-density lipoprotein cholesterol estimation by a new formula in Indian population. *International Journal of Cardiology*, v. 102, n. 1, p. 117–120, 2005.
- ARONOFF, S. L. et al. Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectrum*, v. 17, n. 3, p. 183–190, 2004.
- ARONSSON, A. C.; MARMSTÅL, E.; MANNERVIK, B. Glyoxalase I, a zinc metalloenzyme of mammals and yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 81, n. 4, p. 1235–1240, 1978.
- ASSINI, F. L.; DUZZIONI, M.; TAKAHASHI, R. N. Object location memory in mice: pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. *Behavioral brain research*, v. 204, n. 1, p. 206–211, 2009.
- BADDELEY, A. Working memory: looking back and looking forward. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 4, n. 10, p. 829–839, 2003.
- BALAKUMAR, M. et al. High-fructose diet is as detrimental as high-fat diet in the induction of insulin resistance and diabetes mediated by

- hepatic/pancreatic endoplasmic reticulum (ER) stress. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 423, n. 1–2, p. 93–104, 2016.
- BANDUSEELA, V. C. et al. Impaired autophagy, chaperone expression, and protein synthesis in response to critical illness interventions in porcine skeletal muscle. *Physiological Genomics*, v. 45, n. 12, p. 477–486, 2013.
- BANTLE, J. P.; LAINE, D. C.; THOMAS, J. W. Metabolic effects of dietary fructose and sucrose in types I and II diabetic subjects. *JAMA*, v. 256, n. 23, p. 3241–3246, 1986.
- BAO, W. et al. Induction of autophagy by the MG-132 proteasome inhibitor is associated with endoplasmic reticulum stress in MCF-7 cells. *Molecular Medicine Reports*, v. 13, n. 1, p. 796–804, 2016.
- BARKER, G. R. I.; WARBURTON, E. C. When Is the Hippocampus Involved in Recognition Memory? *The Journal of Neuroscience*, v. 31, n. 29, p. 10721–10731, 2011.
- BASU, S. et al. Relationship of Soft Drink Consumption to Global Overweight, Obesity, and Diabetes: A Cross-National Analysis of 75 Countries. *American Journal of Public Health*, v. 103, n. 11, p. 2071–2077, 2013.
- BEISSWENGER, B. G. K. et al. Ketosis leads to increased methylglyoxal production on the Atkins diet. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1043, p. 201–210, 2005a.
- BEISSWENGER, P. J. et al. Susceptibility to Diabetic Nephropathy Is Related to Dicarboxyl and Oxidative Stress. *Diabetes*, v. 54, n. 11, p. 3274–3281, 2005b.
- BEISSWENGER, P. J. et al. Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes*, v. 48, n. 1, p. 198–202, 1999.
- BENTON, C. S. et al. Evaluating genetic markers and neurobiochemical analytes for fluoxetine response using a panel of mouse inbred strains. *Psychopharmacology*, v. 221, n. 2, p. 297–315, 2012.
- BEVENSEE, M. O.; SCHWIENING, C. J.; BORON, W. F. Use of BCECF and propidium iodide to assess membrane integrity of acutely isolated CA1 neurons from rat hippocampus. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 58, n. 1–2, p. 61–75, 1995.
- BOSE, T.; CHAKRABORTI, A. S. Fructose-induced structural and functional modifications of hemoglobin: Implication for oxidative stress in diabetes mellitus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1780, n. 5, p. 800–808, 2008.
- BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. *European journal of pharmacology*, v. 463, n. 1–3, p. 55–65, 2003.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRAY, G. A. Soft drink consumption and obesity: it is all about fructose. *Current Opinion in Lipidology*, v. 21, n. 1, p. 51–57, 2010.
- BRAY, G. A.; NIELSEN, S. J.; POPKIN, B. M. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 79, n. 4, p. 537–543, 2004.
- BRINCAT, S. L.; MILLER, E. K. Prefrontal Cortex Networks Shift from External to Internal Modes during Learning. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, v. 36, n. 37, p. 9739–9754, 2016.
- BROUWERS, O. et al. Overexpression of Glyoxalase-I Reduces Hyperglycemia-induced Levels of Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Diabetic Rats. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 2, p. 1374–1380, 2011.
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, v. 414, n. 6865, p. 813–820, 2001.
- BULTEAU, A. L. et al. Proteasome Inhibition in Glyoxal-treated Fibroblasts and Resistance of Glycated Glucose-6-phosphate Dehydrogenase to 20 S Proteasome Degradation in Vitro. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 49, p. 45662–45668, 2001.
- BUNN, H. F.; HIGGINS, P. J. Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science (New York, N.Y.)*, v. 213, n. 4504, p. 222–224, 1981.
- CAPRA, J. C. et al. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: evidence for the involvement of monoaminergic systems. *European Journal of Pharmacology*, v. 643, n. 2–3, p. 232–238, 2010.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*, v. 113, p. 484–490, 1985.
- CASTRO, M. C. et al. Fructose-induced inflammation, insulin resistance and oxidative stress: A liver pathological triad effectively disrupted by lipoic acid. *Life Sciences*, v. 137, p. 1–6, 2015.
- CERQUEIRA, N. M. F. S. A. et al. Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry*, 2016.
- CHANG, T. J. et al. Glucagon-like peptide-1 prevents methylglyoxal-induced apoptosis of beta cells through improving mitochondrial function and suppressing prolonged AMPK activation. *Scientific Reports*, v. 6, 2016.

- CHANG, Y. C. et al. Methylglyoxal, a reactive glucose metabolite, enhances autophagy flux and suppresses proliferation of human retinal pigment epithelial ARPE-19 cells. *Toxicology in Vitro*, v. 29, n. 7, p. 1358–1368, 2015.
- CHATHAM, J. C.; GILBERT, H. F.; RADDA, G. K. The metabolic consequences of hydroperoxide perfusion on the isolated rat heart. *European journal of biochemistry / FEBS*, v. 184, n. 3, p. 657–662, 1989.
- CHEN, T. et al. Treatment with *Rhodiola crenulata* root extract ameliorates insulin resistance in fructose-fed rats by modulating sarcolemmal and intracellular fatty acid translocase/CD36 redistribution in skeletal muscle. *BMC complementary and alternative medicine*, v. 16, p. 209, 2016.
- CHENG, Y. F. et al. Curcumin rescues aging-related loss of hippocampal synapse input specificity of long term potentiation in mice. *Neurochemical research*, v. 38, n. 1, p. 98–107, 2013.
- CHENG, Z. et al. Reactivity of thioredoxin as a protein thiol-disulfide oxidoreductase. *Chemical Reviews*, v. 111, n. 9, p. 5768–5783, 2011.
- CHOI, C. S. et al. High sucrose consumption during pregnancy induced ADHD-like behavioral phenotypes in mice offspring. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 26, n. 12, p. 1520–1526, 2015.
- CHOI, D. et al. Stereospecific mechanism of DJ-1 glyoxalases inferred from their hemithioacetal-containing crystal structures. *The FEBS journal*, v. 281, n. 24, p. 5447–5462, 2014.
- CHOI, K.; KIM, Y.-B. Molecular Mechanism of Insulin Resistance in Obesity and Type 2 Diabetes. *The Korean Journal of Internal Medicine*, v. 25, n. 2, p. 119–129, 2010.
- CHOU, L.-M. et al. A diet containing grape powder ameliorates the cognitive decline in aged rats with a long-term high-fructose-high-fat dietary pattern. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 34, p. 52–60, 2016.
- CISTERNAS, P. et al. Fructose consumption reduces hippocampal synaptic plasticity underlying cognitive performance. *Biochimica Et Biophysica Acta*, v. 1852, n. 11, p. 2379–2390, 2015.
- COCINERO, E. J. et al. Free Fructose Is Conformationally Locked. *Journal of the American Chemical Society*, v. 135, n. 7, p. 2845–2852, 2013.
- CORRY, D. B. et al. Uric acid stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and oxidative stress via the vascular renin-angiotensin system. *Journal of Hypertension*, v. 26, n. 2, p. 269–275, 2008.

- COUTO, N.; WOOD, J.; BARBER, J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 95, p. 27–42, 2016.
- COUTURIER, K. et al. Cinnamon intake alleviates the combined effects of dietary-induced insulin resistance and acute stress on brain mitochondria. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 28, p. 183–190, 2016.
- COX, T. M. The genetic consequences of our sweet tooth. *Nature Reviews Genetics*, v. 3, n. 6, p. 481–487, 2002.
- CRAWLEY, J. N. Translational animal models of autism and neurodevelopmental disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, v. 14, n. 3, p. 293–305, 2012.
- CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 29, n. 4–5, p. 571–625, 2005.
- CUI, W. et al. Preventive and Therapeutic Effects of MG132 by Activating Nrf2-ARE Signaling Pathway on Oxidative Stress-Induced Cardiovascular and Renal Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2013, p. 360-73, 2013.
- CURRAIS, A. et al. Dietary glycemic index modulates the behavioral and biochemical abnormalities associated with autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry*, v. 21, n. 3, p. 426–436, 2016.
- CURZON, P. et al. The Behavioral Assessment of Sensorimotor Processes in the Mouse: Acoustic Startle, Sensory Gating, Locomotor Activity, Rotarod, and Beam Walking. In: BUCCAFUSCO, J. J. (Ed.). *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. *Frontiers in Neuroscience*. 2nd. ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2009.
- DAFRE, A. L. et al. Methylglyoxal, the foe and friend of glyoxalase and Trx/TrxR systems in HT22 nerve cells. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 89, p. 8–19, 2015.
- DE ANGELIS, K. et al. Sympathetic overactivity precedes metabolic dysfunction in a fructose model of glucose intolerance in mice. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 302, n. 8, p. 950-957, 2012.
- DEKKER, M. J. et al. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, v. 299, n. 5, p. 685-694, 2010.

- DHAR, A. et al. Methylglyoxal, protein binding and biological samples: Are we getting the true measure? *Journal of Chromatography B*, v. 877, n. 11–12, p. 1093–1100, 2009.
- DHAR, A. et al. Alagebrium attenuates methylglyoxal induced oxidative stress and AGE formation in H9C2 cardiac myocytes. *Life Sciences*, v. 146, p. 8–14, 2016.
- DHAR, I. et al. Increased methylglyoxal formation with upregulation of renin angiotensin system in fructose fed Sprague Dawley rats. *PLoS One*, v. 8, n. 9, p. 742–12, 2013.
- DILLS, W. L. Protein fructosylation: fructose and the Maillard reaction. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 58, n. 5 Suppl, p. 779S–787S, 1993.
- DISTLER, M. G. et al. Glyoxalase 1 increases anxiety by reducing GABAA receptor agonist methylglyoxal. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 122, n. 6, p. 2306–2315, 2012.
- DISTLER, M. G. et al. Glyoxalase 1 and its substrate methylglyoxal are novel regulators of seizure susceptibility. *Epilepsia*, v. 54, n. 4, p. 649–657, 2013.
- DISTLER, M. G.; PALMER, A. A. Role of Glyoxalase 1 (Glo1) and methylglyoxal (MG) in behavior: recent advances and mechanistic insights. *Frontiers in Genetics*, v. 3, 2012.
- DONG, F. et al. Deletion of CTNBN1 in inhibitory circuitry contributes to autism-associated behavioral defects. *Human Molecular Genetics*, 2016.
- DOUARD, V.; FERRARIS, R. P. The role of fructose transporters in diseases linked to excessive fructose intake. *The Journal of Physiology*, v. 591, n. 2, p. 401–414, 2013.
- DRECHSEL, D. A.; PATEL, M. Respiration-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> removal in brain mitochondria via the thioredoxin/peroxiredoxin system. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 36, p. 27850–27858, 2010.
- DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*, v. 62, n. 6, p. 649–671, 2000.
- DRINGEN, R.; PAWLOWSKI, P. G.; HIRRLINGER, J. Peroxide detoxification by brain cells. *Journal of Neuroscience Research*, v. 79, n. 1–2, p. 157–165, 2005.
- DUFFEY, K. J.; POPKIN, B. M. High-fructose corn syrup: is this what's for dinner? *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 88, n. 6, p. 1722S–1732S, 2008.
- DUNLOP, E. A.; TEE, A. R. mTOR and autophagy: A dynamic relationship governed by nutrients and energy. *Seminars in Cell &*

- Developmental Biology, Development of the urogenital system & mTOR Signalling & Tight Junctions in Health and Disease. v. 36, p. 121–129, 2014.
- EBERHARDT, M. J. et al. Methylglyoxal activates nociceptors through transient receptor potential channel A1 (TRPA1): a possible mechanism of metabolic neuropathies. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 34, p. 28291–28306, 2012.
- ELLIOTT, S. S. et al. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 76, n. 5, p. 911–922, 2002.
- ENGELSTOFT, M. S.; SCHWARTZ, T. W. Opposite Regulation of Ghrelin and Glucagon-like Peptide-1 by Metabolite G-Protein-Coupled Receptors. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 27, n. 9, p. 665 - 75, 2016.
- FAEH, D. et al. Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. *Diabetes*, v. 54, n. 7, p. 1907–1913, 2005.
- FANG, F. et al. RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, A $\beta$  accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 24, n. 4, p. 1043–1055, 2010.
- FANG, L. et al. Autophagy protects human brain microvascular endothelial cells against methylglyoxal-induced injuries, reproducible in a cerebral ischemic model in diabetic rats. *Journal of Neurochemistry*, v. 135, p. 431–40, 2015.
- FENG, Y. et al. The machinery of macroautophagy. *Cell Research*, v. 24, n. 1, p. 24–41, 2014.
- FERDER, L.; FERDER, M. D.; INSERRA, F. The role of high-fructose corn syrup in metabolic syndrome and hypertension. *Current Hypertension Reports*, v. 12, n. 2, p. 105–112, 2010.
- FIGLEWICZ, D. P.; BENOIT, S. C. Insulin, leptin, and food reward: update 2008. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 296, n. 1, p. R9–R19, 2009.
- FLEMING, S. M. et al. Early and progressive sensorimotor anomalies in mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, v. 24, n. 42, p. 9434–9440, 2004.

- FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 30, n. 1–2, p. 1–12, 2009.
- FRANCO, J. L. et al. Zinc reverses malathion-induced impairment in antioxidant defenses. *Toxicology Letters*, v. 187, n. 3, p. 137–143, 2009.
- FRANKLIN, J. L. et al. Extended exposure to sugar and/or caffeine produces distinct behavioral and neurochemical profiles in the orbitofrontal cortex of rats: Implications for neural function. *Proteomics*, 2016.
- GABY, A. R. Adverse effects of dietary fructose. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, v. 10, n. 4, p. 294–306, 2005.
- GALLAND, L. Diet and inflammation. *Nutrition in Clinical Practice: Official Publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, v. 25, n. 6, p. 634–640, 2010.
- GANLEY, I. G. et al. ULK1.ATG13. FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 18, p. 12297–12305, 2009.
- GERSCH, C. et al. Inactivation of nitric oxide by uric acid. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, v. 27, n. 8, p. 967–978, ago. 2008.
- GIUGLIANO, D.; CERIELLO, A.; ESPOSITO, K. Glucose metabolism and hyperglycemia. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 87, n. 1, p. 217S–222S, 2008.
- GONÇALVES, A. E. et al. The antidepressant-like effect of *Hedyosmum brasiliense* and its sesquiterpene lactone, podoandin in mice: Evidence for the involvement of adrenergic, dopaminergic and serotonergic systems. *European Journal of Pharmacology*, 2011.
- GONZÁLEZ-REYES, R. E.; GRACIELA RUBIANO, M. Astrocyte's RAGE: More Than Just a Question of Mood. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 2016.
- GORAN, M. I.; ULIJASZEK, S. J.; VENTURA, E. E. High fructose corn syrup and diabetes prevalence: a global perspective. *Global Public Health*, v. 8, n. 1, p. 55–64, 2013.
- GRILLO, M. A.; COLOMBATTO, S. Advanced glycation end-products (AGEs): involvement in aging and in neurodegenerative diseases. *Amino Acids*, v. 35, n. 1, p. 29–36, 2008.
- GUERRERO-BELTRÁN, C. E. et al. Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances. *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie*, v. 64, n. 5, p. 503–508, 2012.

- GUN, A. et al. Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Vascular Damage Caused by Consumption of High Fructose Corn Syrup in Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, p. 34194-79, 2016.
- HAMBSCH, B. Altered glyoxalase 1 expression in psychiatric disorders: cause or consequence? *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 22, n. 3, p. 302–308, 2011.
- HAMILTON, P. J. et al. De novo mutation in the dopamine transporter gene associates dopamine dysfunction with autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry*, v. 18, n. 12, p. 1315–1323, 2013.
- HAMOUDANE, M. et al. Decreased blood levels of glyoxalase I and diabetic complications. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*, v. 35, n. 3, p. 496–501, 2015.
- HANOVER, L. M.; WHITE, J. S. Manufacturing, composition, and applications of fructose. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 58, n. 5 Suppl, p. 724S–732S, 1993.
- HANSEN, F. et al. Methylglyoxal can mediate behavioral and neurochemical alterations in rat brain. *Physiology & Behavior*, v. 164, Part A, p. 93–101, 2016.
- HANSEN, N. M. J. et al. Higher levels of advanced glycation end products in human carotid atherosclerotic plaques are associated with a rupture-prone phenotype. *European Heart Journal*, v. 35, n. 17, p. 1137–1146, 2014.
- HARA, Y. et al. Reduced prefrontal dopaminergic activity in valproic acid-treated mouse autism model. *Behavioral Brain Research*, v. 289, p. 39–47, 2015.
- HARDIE, D. G. AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *International Journal of Obesity (2005)*, v. 32 Suppl 4, p. S7-12, 2008.
- HARDIE, D. G.; ROSS, F. A.; HAWLEY, S. A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 13, n. 4, p. 251–262, 2012.
- HASIM, S. et al. A glutathione-independent glyoxalase of the DJ-1 superfamily plays an important role in managing metabolically generated methylglyoxal in *Candida albicans*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 3, p. 1662–1674, 2014.
- HASSEL, B. et al. Uptake and metabolism of fructose by rat neocortical cells in vivo and by isolated nerve terminals in vitro. *Journal of Neurochemistry*, v. 133, n. 4, p. 572–581, 2015.
- HAUNER, H. et al. Evidence-based guideline of the German Nutrition Society: carbohydrate intake and prevention of nutrition-related

- diseases. *Annals of Nutrition & Metabolism*, v. 60 Suppl 1, p. 1–58, 2012.
- HAUSER, J. et al. The effects of nutritional polyunsaturated fatty acids on locomotor activity in spontaneously hypertensive rats. *Attention Deficit and Hyperactivity Disorders*, v. 6, n. 2, p. 61–65, 2014.
- HAVEL, P. J. et al. High-fat meals reduce 24-h circulating leptin concentrations in women. *Diabetes*, v. 48, n. 2, p. 334–341, 1999.
- HAVEL, P. J. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutrition Reviews*, v. 63, n. 5, p. 133–157, 005.
- HAWKES, H.-J. K.; KARLENIUS, T. C.; TONISSEN, K. F. Regulation of the human thioredoxin gene promoter and its key substrates: a study of functional and putative regulatory elements. *Biochimica Et Biophysica Acta*, v. 1840, n. 1, p. 303–314, 2014.
- HEDIGER, M. A.; RHOADS, D. B. Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. *Physiological Reviews*, v. 74, n. 4, p. 993–1026, out. 1994.
- HERHAUS, L.; DIKIC, I. Expanding the ubiquitin code through post-translational modification. *EMBO reports*, v. 16, n. 9, p. 1071–1083, 2015.
- HOLMGREN, A.; BJORNSTEDT, M. [21] Thioredoxin and thioredoxin reductase. In: *Biothiols Part B: Glutathione and Thioredoxin: Thiols in Signal Transduction and Gene Regulation*. Academic Press, 252p. 199–208, 1995.
- HONEK, J. F. Glyoxalase biochemistry. *Biomolecular Concepts*, v. 6, p. 401–414, 2015.
- HOSOKAWA, N. et al. Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1–Atg13–FIP200 Complex Required for Autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, v. 20, n. 7, p. 1981–1991, 2009.
- HOVATTA, I. et al. Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. *Nature*, v. 438, n. 7068, p. 662–666, 2005.
- HSU, T. M. et al. Effects of sucrose and high fructose corn syrup consumption on spatial memory function and hippocampal neuroinflammation in adolescent rats. *Hippocampus*, v. 25, n. 2, p. 227–239, 2015.
- HUANG, D. Y. et al. Blunted hypertensive effect of combined fructose and high-salt diet in gene-targeted mice lacking functional serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 290, n. 4, p. 935–944, 2006.

- HUGHES, R. N. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 28, n. 5, p. 497–505, 2004.
- ICHIMURA, Y. et al. Phosphorylation of p62 Activates the Keap1-Nrf2 Pathway during Selective Autophagy. *Molecular Cell*, v. 51, n. 5, p. 618–631, 2013.
- IMARAM, W. et al. Radicals in the reaction between peroxyxynitrite and uric acid identified by electron spin resonance spectroscopy and liquid chromatography mass spectrometry. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 49, n. 2, p. 275–281, 2010.
- J. ZHAN, J. H. Crosstalk Between the Autophagy-Lysosome Pathway and the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Retinal Pigment Epithelial Cells. *Curr Mol Med*, v. 16, n. 15, p. 487–95, 2016.
- JACK, M.; WRIGHT, D. Role of advanced glycation end products and glyoxalase I in diabetic peripheral sensory neuropathy. *Translational Research*, v. 159, n. 5, p. 355–365, 2012.
- JIANG, T. et al. p62 links autophagy and Nrf2 signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, Nrf2 Regulated Redox Signaling and Metabolism in Physiology and Medicine. v. 88, Part B, p. 199–204, 2015.
- JOHNSON, R. J. et al. Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity. *Diabetes*, v. 62, n. 10, p. 3307–3315, 2013.
- JOHNSON, R. J.; SANCHEZ-LOZADA, L. G.; NAKAGAWA, T. The effect of fructose on renal biology and disease. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, v. 21, n. 12, p. 2036–2039, 2010.
- JÜRGENS, H. et al. Consuming Fructose-sweetened Beverages Increases Body Adiposity in Mice. *Obesity Research*, v. 13, n. 7, p. 1146–1156, 2005.
- KALAIPOS, M. P. Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicology letters*, v. 110, n. 3, p. 145–175, 1999.
- KALAIPOS, M. P. The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chemico-Biological Interactions*, v. 171, n. 3, p. 251–271, 2008.
- KALAIPOS, M. P. Where does plasma methylglyoxal originate from? *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 99, n. 3, p. 260–271, 2013.
- KANTAK, P. A.; BOBROW, D. N.; NYBY, J. G. Obsessive-compulsive-like behaviors in house mice are attenuated by a probiotic

- (*Lactobacillus rhamnosus* GG). *Behavioural Pharmacology*, v. 25, n. 1, p. 71–79, 2014.
- KAPPAHN, R. J.; BIGELOW, E. J.; FERRINGTON, D. A. Age-dependent inhibition of proteasome chymotrypsin-like activity in the retina. *Experimental Eye Research*, v. 84, n. 4, p. 646–654, 2007.
- KARGIEMAN, L. et al. Antipsychotic drugs reverse the disruption in prefrontal cortex function produced by NMDA receptor blockade with phencyclidine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 37, p. 14843–14848, 2007.
- KATSURAGI, Y.; ICHIMURA, Y.; KOMATSU, M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *The FEBS journal*, v. 282, n. 24, p. 4672–4678, 2015.
- KAWASAKI, T.; AKANUMA, H.; YAMANOUCI, T. Increased Fructose concentrations in blood and urine in patients with diabetes. *Diabetes Care*, v. 25, n. 2, p. 353–357, 2002.
- KEARNEY, J. Food consumption trends and drivers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 365, n. 1554, p. 2793–2807, 2010.
- KHO, M. C. et al. Combination with Red ginseng and *Polygoni Multiflori* ameliorates high fructose diet induced metabolic syndrome. *BMC complementary and alternative medicine*, v. 16, n. 1, p. 98, 2016.
- KIM, J. et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, v. 13, n. 2, p. 132–141, 2011.
- KIM, K. H.; LEE, M.-S. Autophagy—a key player in cellular and body metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 10, n. 6, p. 322–337, 2014.
- KLOK, M. D.; JAKOBSDOTTIR, S.; DRENT, M. L. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity Reviews*, v. 8, n. 1, p. 21–34, 2007.
- KONG, M. F. et al. Effects of oral fructose and glucose on plasma GLP-1 and appetite in normal subjects. *Peptides*, v. 20, n. 5, p. 545–551, 1999.
- KOVAČEVIĆ, S. et al. Fructose-enriched diet induces inflammation and reduces antioxidative defense in visceral adipose tissue of young female rats. *European Journal of Nutrition*, 2015.
- KRISHNAVENI, P.; GOWDA, V. M. Assessing the validity of Friedewald's formula and Anandraja's formula for serum LDL-cholesterol calculation. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, v. 9, n. 12, p. 01-04, 2015.

- KUHLA, B. et al. Methylglyoxal, glyoxal, and their detoxification in Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1043, p. 211–216, 2005.
- KUMAR, H.; SHARMA, B. Memantine ameliorates autistic behavior, biochemistry & blood brain barrier impairments in rats. *Brain Research Bulletin*, v. 124, p. 27–39, 2016.
- KWON, O.; KIM, K. W.; KIM, M.-S. Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, v. 73, n. 7, p. 1457–1477, 2016.
- LANASPA, M. A. et al. Uric acid induces hepatic steatosis by generation of mitochondrial oxidative stress: potential role in fructose-dependent and -independent fatty liver. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 48, p. 40732–40744, 2012.
- LAWRENCE, G. D.; MAVI, A.; MERAL, K. Promotion by phosphate of Fe(III)- and Cu(II)-catalyzed autoxidation of fructose. *Carbohydrate Research*, v. 343, n. 4, p. 626–635, 2008.
- LÊ, K.-A. et al. A 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 84, n. 6, p. 1374–1379, 2006.
- LÊ, K.-A.; TAPPY, L. Metabolic effects of fructose. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 9, n. 4, p. 469–475, 2006.
- LE, M. T. et al. Effects of high-fructose corn syrup and sucrose on the pharmacokinetics of fructose and acute metabolic and hemodynamic responses in healthy subjects. *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 61, n. 5, p. 641–651, 2012.
- LEE, J. et al. Human DJ-1 and its homologs are novel glyoxalases. *Human Molecular Genetics*, v. 21, n. 14, p. 3215–3225, 2012.
- LEE, Y.-K.; LEE, J.-A. Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Reports*, v. 49, n. 8, p. 424–430, 2016.
- LENNICKE, C. et al. Hydrogen peroxide – production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Communication and Signaling*: v. 13, 2015.
- LEVINE, B.; KLIONSKY, D. J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental Cell*, v. 6, n. 4, p. 463–477, 2004.
- LEWIS, D. A.; HASHIMOTO, T.; VOLK, D. W. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 6, n. 4, p. 312–324, 2005.

- LIM, J. S. et al. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, v. 7, n. 5, p. 251–264, 2010.
- LIPPAI, M. et al. The Role of the Selective Adaptor p62 and Ubiquitin-Like Proteins in Autophagy. *BioMed Research International*, v. 2014, p. e832704, 2014.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, v. 92, n. 2, p. 180–185, 1987.
- LIU, H. et al. Angiogenesis impairment in diabetes: role of methylglyoxal-induced receptor for advanced glycation end products, autophagy and vascular endothelial growth factor receptor 2. *Plos One*, v. 7, n. 10, p. 467-20, 2012.
- LIU, Y.W. et al. Suppression of methylglyoxal hyperactivity by mangiferin can prevent diabetes-associated cognitive decline in rats. *Psychopharmacology*, v. 228, n. 4, p. 585–594, 2013.
- LU, J.; HOLMGREN, A. Thioredoxin system in cell death progression. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 17, n. 12, p. 1738–1747, 2012.
- LU, J.; HOLMGREN, A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 66, p. 75–87, 2014.
- LUBOS, E.; LOSCALZO, J.; HANDY, D. E. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 15, n. 7, p. 1957–1997, 2010.
- LUSTIG, R. H.; SCHMIDT, L. A.; BRINDIS, C. D. Public health: The toxic truth about sugar. *Nature*, v. 482, n. 7383, p. 27–29, 2012.
- MAHER, P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Research Reviews*, v. 4, n. 2, p. 288–314, 2005.
- MAHER, P. Methylglyoxal, advanced glycation end products and autism: is there a connection? *Medical Hypotheses*, v. 78, n. 4, p. 548–552, 2012.
- MALIK, V. S. et al. Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care*, v. 33, n. 11, p. 2477–2483, 2010.
- MALIK, V. S. et al. Sugar-sweetened beverages and weight gain in children and adults: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 98, n. 4, p. 1084–1102, 2013.
- MALIK, V. S.; SCHULZE, M. B.; HU, F. B. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 84, n. 2, p. 274–288, 2006.

- MANNERVIK, B.; RIDDERSTRÖM, M. Catalytic and molecular properties of glyoxalase I. *Biochemical Society Transactions*, v. 21, n. 2, p. 515–517, 1993.
- MARSHALL, R. O.; KOOI, E. R. Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. *Science*, v. 125, n. 3249, p. 648–649, 1957.
- MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 16, n. 10, p. 577–586, 2005.
- MASTERJOHN, C. et al. Dietary fructose feeding increases adipose methylglyoxal accumulation in rats in association with low expression and activity of glyoxalase-2. *Nutrients*, v. 5, n. 8, p. 3311–3328, 2013.
- MASTROCOLA, R. et al. Advanced glycation end products promote hepatosteatosis by interfering with SCAP-SREBP pathway in fructose-drinking mice. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 305, n. 6, p. 398–407, 2013.
- MASTROCOLA, R. et al. Fructose-derived advanced glycation end-products drive lipogenesis and skeletal muscle reprogramming via SREBP-1c dysregulation in mice. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 91, p. 224–235, 2016.
- MCLELLAN, A. C. et al. Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clinical Science*, v. 87, n. 1, p. 21–29, 1994.
- MEIJER, A. J.; CODOGNO, P. Autophagy: regulation and role in disease. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, v. 46, n. 4, p. 210–240, 2009.
- MEIJER, A. J.; CODOGNO, P. Autophagy: regulation by energy sensing. *Current Biology*, v. 21, n. 6, p. 227–229, 2011.
- MICHEL, M.; SCHMIDT, M. J.; MIRNICS, K. Immune system gene dysregulation in autism and schizophrenia. *Developmental Neurobiology*, v. 72, n. 10, p. 1277–1287, 2012.
- MILLER, A.; ADELI, K. Dietary fructose and the metabolic syndrome. *Current Opinion in Gastroenterology*, v. 24, n. 2, p. 204–209, 2008.
- MITOZO, P. A. et al. A study of the relative importance of the peroxiredoxin-, catalase-, and glutathione-dependent systems in neural peroxide metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 51, n. 1, p. 69–77, 2011.
- MIZUSHIMA, N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 22, n. 2, p. 132–139, 2010.

- MIZUSHIMA, N. Autophagy in Protein and Organelle Turnover. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, v. 76, p. 397–402, 2011.
- MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, v. 3, n. 6, p. 542–545, 2007.
- MORCOS, M. et al. Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, v. 7, n. 2, p. 260–269, 2008.
- MORTON, G. J. et al. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, v. 443, n. 7109, p. 289–295, 2006.
- MURAI, T. et al. Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies. *Physiology & behavior*, v. 90, n. 1, p. 116–124, 2007.
- NAGAI, R. et al. Hydroxyl radical mediates N epsilon-(carboxymethyl)lysine formation from Amadori product. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 234, n. 1, p. 167–172, 1997.
- NAKATOGAWA, H. et al. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, v. 10, n. 7, p. 458–467, 2009.
- NGUYEN, T. M. D. et al. The 5'-AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Is Involved in the Augmentation of Antioxidant Defenses in Cryopreserved Chicken Sperm. *Plos One*, v. 10, n. 7, p. 134-420, 2015.
- NGUYEN, T.; NIOI, P.; PICKETT, C. B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 20, p. 13291–13295, 2009.
- NODA, N. N.; INAGAKI, F. Mechanisms of Autophagy. *Annual Review of Biophysics*, v. 44, n. 1, p. 101–122, 2015.
- OBA, T. et al. Methylglyoxal has deleterious effects on thioredoxin in human aortic endothelial cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 34, n. 2, p. 117–126, 2012.
- OHNOGI, H. et al. Angelica keiskei extract improves insulin resistance and hypertriglyceridemia in rats fed a high-fructose drink. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 76, n. 5, p. 928–932, 2012.
- OKOUCHI, M.; OKAYAMA, N.; AW, T. Y. Hyperglycemia potentiates carbonyl stress-induced apoptosis in naïve PC-12 cells: relationship to cellular redox and activator protease factor-1 expression. *Current Neurovascular Research*, v. 2, n. 5, p. 375–386, 2005.

- ORLANDI, L. et al. Sickness behavior is accentuated in rats with metabolic disorders induced by a fructose diet. *Journal of Neuroimmunology*, v. 289, p. 75–83, 2015.
- OUYANG, X. et al. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, v. 48, n. 6, p. 993–999, 2008.
- ÖVEY, İ. S.; NAZIROĞLU, M. Homocysteine and cytosolic GSH depletion induce apoptosis and oxidative toxicity through cytosolic calcium overload in the hippocampus of aged mice: Involvement of TRPM2 and TRPV1 channels. *Neuroscience*, v. 284, p. 225–233, 2015.
- OYA, T. et al. Methylglyoxal modification of protein. Chemical and immunochemical characterization of methylglyoxal-arginine adducts. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 26, p. 18492–18502, 1999.
- PARK, Y. K.; YETLEY, E. A. Intakes and food sources of fructose in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 58, n. 5 Suppl, p. 737S–747S, 1993.
- PARKS, E. J. et al. Dietary sugars stimulate fatty acid synthesis in adults. *The Journal of Nutrition*, v. 138, n. 6, p. 1039–1046, 2008.
- PATTERSON, P. H. Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models. *Behavioral Brain Research*, v. 204, n. 2, p. 313–321, 2009.
- PAUL, R. G.; BAILEY, A. J. Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 28, n. 12, p. 1297–1310, 1996.
- PEKTAS, M. B. et al. Dietary Fructose Activates Insulin Signaling and Inflammation in Adipose Tissue: Modulatory Role of Resveratrol. *BioMed Research International*, v. 2016, p. 8014-252, 2016.
- PERKINS, A. et al. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 40, n. 8, p. 435–445, 2015.
- POOLE, L. B. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 80, p. 148–157, 2015.
- POPKIN, B. M. Urbanization, lifestyle changes and the nutrition transition. *World Development*, v. 27, n. 11, p. 1905–1916, 1999.
- PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Thérapie*, v. 229, n. 2, p. 327–336, 1977.

- POYNTON, R. A.; HAMPTON, M. B. Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1840, n. 2, p. 906–912, 2014.
- QUEISSER, M. A. et al. Hyperglycemia Impairs Proteasome Function by Methylglyoxal. *Diabetes*, v. 59, n. 3, p. 670–678, 2010.
- RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J. The Critical Role of Methylglyoxal and Glyoxalase 1 in Diabetic Nephropathy. *Diabetes*, v. 63, n. 1, p. 50–52, 2014a.
- RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J. Measurement of methylglyoxal by stable isotopic dilution analysis LC-MS/MS with corroborative prediction in physiological samples. *Nature Protocols*, v. 9, n. 8, p. 1969–1979, 2014b.
- RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J. Dicarbonyl stress in cell and tissue dysfunction contributing to ageing and disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 458, n. 2, p. 221–226, 2015.
- RABBANI, N.; XUE, M.; THORNALLEY, P. J. Dicarbonyls and glyoxalase in disease mechanisms and clinical therapeutics. *Glycoconjugate Journal*, v. 33, n. 4, p. 513–525, 2016.
- RACKER, E. The mechanism of action of glyoxalase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 190, n. 2, p. 685–696, 1951.
- RAVIKUMAR, B. et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, v. 90, n. 4, p. 1383–1435, 2010.
- RAY, R.; JURANEK, J. K.; RAI, V. RAGE axis in neuroinflammation, neurodegeneration and its emerging role in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 62, p. 48–55, 2016.
- REDDY, B. R. et al. Sirtuin 1 and 7 mediate resveratrol-induced recovery from hyper-anxiety in high-fructose-fed prediabetic rats. *Journal of Biosciences*, v. 41, n. 3, p. 407–417, 2016.
- REINKE, E. N. et al. Translational regulation of GPx-1 and GPx-4 by the mTOR pathway. *Plos One*, v. 9, n. 4, p. 934–72, 2014.
- RENDEIRO, C. et al. Fructose decreases physical activity and increases body fat without affecting hippocampal neurogenesis and learning relative to an isocaloric glucose diet. *Scientific Reports*, v. 5, p. 9589, 2015.
- RHEE, S. G. et al. Peroxiredoxin, a Novel Family of Peroxidases. *IUBMB Life*, v. 52, n. 1, p. 35–41, 2001.
- RHO, Y. H.; ZHU, Y.; CHOI, H. K. The Epidemiology of Uric Acid and Fructose. *Seminars in nephrology*, v. 31, n. 5, p. 410–419, 2011.

- RIAL, D. et al. Behavioral Phenotyping of Parkin-Deficient Mice: Looking for Early Preclinical Features of Parkinson's Disease. *Plos One*, v. 9, n. 12, p. e114216, 2014.
- RODNIGHT, R. et al. Regional distribution and properties of an enzyme system in rat brain that phosphorylates ppH-47, an insoluble protein highly labelled in tissue slices from the hippocampus. *Progress in Brain Research*, v. 89, p. 157–167, 1991.
- RODRIGUEZ LANZI, C. et al. Grape pomace and grape pomace extract improve insulin signaling in high-fat-fructose fed rat-induced metabolic syndrome. *Food & Function*, v. 7, n. 3, p. 1544–1553, 2016.
- ROGLANS, N. et al. Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPAR alpha activity in fructose-fed rats. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, v. 45, n. 3, p. 778–788, 2007.
- ROSS, A. P. et al. A high fructose diet impairs spatial memory in male rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 92, n. 3, p. 410–416, 2009.
- ROY, R.; WILLIAMS, R. E.; JENNINGS, H. J. Increase in the acyclic form of sugars in the presence of borate ions, as measured by circular dichroism. *Carbohydrate Research*, v. 127, n. 1, p. 165–169, 1984.
- SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, v. 414, n. 6865, p. 799–806, 2001.
- SÁNCHEZ-LOZADA, L. G. et al. Uric acid-induced endothelial dysfunction is associated with mitochondrial alterations and decreased intracellular ATP concentrations. *Nephron. Experimental Nephrology*, v. 121, n. 3–4, p. 71-78, 2012.
- SANTOS, D. B. et al. Succinobucol, a Non-Statins Hypocholesterolemic Drug, Prevents Premotor Symptoms and Nigrostriatal Neurodegeneration in an Experimental Model of Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*, p. 1–18, 2016.
- SAUTIN, Y. Y. et al. Adverse effects of the classic antioxidant uric acid in adipocytes: NADPH oxidase-mediated oxidative/nitrosative stress. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, v. 293, n. 2, p. 584-596, 2007.
- SCHAFFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 30, n. 11, p. 1191–1212, 2001.
- SCHULZE, P. C. et al. Hyperglycemia promotes oxidative stress through inhibition of thioredoxin function by thioredoxin-interacting protein.

- The Journal of biological chemistry, v. 279, n. 29, p. 30369–30374, 2004.
- SCHWARZ, J. M. et al. Effect of a High-Fructose Weight-Maintaining Diet on Lipogenesis and Liver Fat. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 100, n. 6, p. 2434–2442, 2015.
- SEMCHYSHYN, H. M. et al. Fructose compared with glucose is more a potent glycooxidation agent in vitro, but not under carbohydrate-induced stress in vivo: potential role of antioxidant and antiglycation enzymes. *Carbohydrate Research*, v. 384, p. 61–69, 2014.
- SENA, C. M. et al. Methylglyoxal promotes oxidative stress and endothelial dysfunction. *Pharmacological Research*, v. 65, n. 5, p. 497–506, 2012.
- SHEETZ MJ; KING GL. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA*, v. 288, n. 20, p. 2579–2588, 2002.
- SHEN, D. et al. Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen production. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 27, p. 25305–25312, 2005.
- SORCI, G. et al. RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Including Special Section: Mitochondrial Dynamics and Physiology*. v. 1833, n. 1, p. 101–109, 2013.
- SOUSA SILVA, M. et al. The glyoxalase pathway: the first hundred years... and beyond. *The Biochemical Journal*, v. 453, n. 1, p. 1–15, 2013.
- STANHOPE, K. L. et al. Twenty-four-hour endocrine and metabolic profiles following consumption of high-fructose corn syrup-, sucrose-, fructose-, and glucose-sweetened beverages with meals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 87, n. 5, p. 1194–1203, 2008.
- STANTON, R. C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB life*, v. 64, n. 5, p. 362–369, 2012.
- STIRPE, F. et al. Fructose-induced hyperuricaemia. *Lancet*, v. 2, n. 7686, p. 1310–1311, 1970.
- STRANAHAN, A. M. et al. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus*, v. 18, n. 11, p. 1085–1088, 2008.
- SU, H. et al. Acute hyperglycaemia enhances oxidative stress and aggravates myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of thioredoxin-interacting protein. *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 17, n. 1, p. 181–191, 2013.

- SUÁREZ, G. et al. Nonenzymatic glycation of bovine serum albumin by fructose (fructation). Comparison with the Maillard reaction initiated by glucose. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 264, n. 7, p. 3674–3679, 1989.
- TAKAHASHI, Y. et al. Up-regulation of vitamin D3 up-regulated protein 1 gene in response to 5-fluorouracil in colon carcinoma SW620. *Oncology reports*, v. 9, n. 1, p. 75–79, 2002.
- TAKAO, K.; MIYAKAWA, T. Light/dark Transition Test for Mice. *Journal of Visualized Experiments: Jove*, n. 1, 2006.
- TAKIZAWA, N.; TAKADA, K.; OHKAWA, K. Inhibitory effect of nonenzymatic glycation on ubiquitination and ubiquitin-mediated degradation of lysozyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 192, n. 2, p. 700–706, 1993.
- TAPPY, L.; LÊ, K.-A. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiological Reviews*, v. 90, n. 1, p. 23–46, 2010.
- TATSUNAMI, R. et al. Methylglyoxal causes dysfunction of thioredoxin and thioredoxin reductase in endothelial cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 111, n. 4, p. 426–432, 2009.
- TEFF, K. L. et al. Dietary Fructose Reduces Circulating Insulin and Leptin, Attenuates Postprandial Suppression of Ghrelin, and Increases Triglycerides in Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 89, n. 6, p. 2963–2972, 2004.
- TEFF, K. L. et al. Endocrine and metabolic effects of consuming fructose- and glucose-sweetened beverages with meals in obese men and women: influence of insulin resistance on plasma triglyceride responses. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 94, n. 5, p. 1562–1569, 2009.
- THORENS, B. Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. *The American Journal of Physiology*, v. 270, n. 4 Pt 1, p. G541–553, 1996.
- THORENS, B.; MUECKLER, M. Glucose transporters in the 21st Century. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, v. 298, n. 2, p. E141–E145, 2010.
- THORNALLEY, P. et al. The autoxidation of glyceraldehyde and other simple monosaccharides under physiological conditions catalysed by buffer ions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 797, n. 2, p. 276–287, 1984.
- THORNALLEY, P. J. et al. The human red blood cell glyoxalase system in diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 7, n. 2, p. 115–120, 1989.

- THORNALLEY, P. J. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochemical Journal*, v. 269, n. 1, p. 1–11, 1990.
- THORNALLEY, P. J. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification—a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *General Pharmacology*, v. 27, n. 4, p. 565–573, 1996.
- THORNALLEY, P. J. Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1043, p. 111–117, 2005.
- THORPE, S. R.; BAYNES, J. W. Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino Acids*, v. 25, n. 3–4, p. 275–281, 2003.
- TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*, v. 27, n. 3, p. 502–522, 1969.
- TÓBON-VELASCO, J. C.; CUEVAS, E.; TORRES-RAMOS, M. A. Receptor for AGEs (RAGE) as mediator of NF- $\kappa$ B pathway activation in neuroinflammation and oxidative stress. *CNS & neurological disorders drug targets*, v. 13, n. 9, p. 1615–1626, 2014.
- TOOZE, S. A.; YOSHIMORI, T. The origin of the autophagosomal membrane. *Nature Cell Biology*, v. 12, n. 9, p. 831–835, 2010.
- TOPPING, D. L.; MAYES, P. A. The immediate effects of insulin and fructose on the metabolism of the perfused liver. Changes in lipoprotein secretion, fatty acid oxidation and esterification, lipogenesis and carbohydrate metabolism. *The Biochemical Journal*, v. 126, n. 2, p. 295–311, 1972.
- TREVISAN, R. et al. Gills are an initial target of zinc oxide nanoparticles in oysters *Crassostrea gigas*, leading to mitochondrial disruption and oxidative stress. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, v. 153, p. 27–38, 2014.
- TURK, Z. Glycotoxines, carbonyl stress and relevance to diabetes and its complications. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, v. 59, n. 2, p. 147–156, 2010.
- UCHIKI, T. et al. Glycation-altered proteolysis as a pathobiologic mechanism that links dietary glycemic index, aging, and age-related disease (in non-diabetics). *Aging Cell*, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2012.

- UCHOA, M. F. et al. Modulation of Brain Glutathione Reductase and Peroxiredoxin 2 by  $\alpha$ -Tocopheryl Phosphate. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 36, n. 6, p. 1015–1022, 2016.
- VAN DER BORGHT, K. et al. Reduced neurogenesis in the rat hippocampus following high fructose consumption. *Regulatory Peptides*, v. 167, n. 1, p. 26–30, 2011.
- VANDER JAGT, D. L. et al. Inactivation of glutathione reductase by 4-hydroxynonenal and other endogenous aldehydes. *Biochemical Pharmacology*, v. 53, n. 8, p. 1133–1140, 1997.
- VANDER JAGT, D. L.; HUNSAKER, L. A. Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. *Chemico-Biological Interactions*, v. 143–144, p. 341–351, 2003.
- VARTANIAN, L. R.; SCHWARTZ, M. B.; BROWNELL, K. D. Effects of soft drink consumption on nutrition and health: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Public Health*, v. 97, n. 4, p. 667–675, 2007.
- VISTOLI, G. et al. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radical Research*, v. 47, n. S1, p. 3–27, 2013.
- VOS, M. B. et al. Dietary fructose consumption among US children and adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Medscape Journal of Medicine*, v. 10, n. 7, p. 160, 2008.
- WANG, X. et al. Vascular methylglyoxal metabolism and the development of hypertension. *Journal of Hypertension*, v. 23, n. 8, p. 1565–1573, 2005.
- WANG, X. L. et al. Methylglyoxal increases cardiomyocyte ischemia-reperfusion injury via glycative inhibition of thioredoxin activity. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, v. 299, n. 2, p. E207–214, 2010.
- WEERAPANA, E. et al. Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature*, v. 468, n. 7325, p. 790–795, 2010.
- WEI, Y. et al. Fructose-induced stress signaling in the liver involves methylglyoxal. *Nutrition & Metabolism*, v. 10, p. 32, 2013.
- WEI, Y.; PAGLIASSOTTI, M. J. Hepatospecific effects of fructose on c-jun NH2-terminal kinase: implications for hepatic insulin resistance. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, v. 287, n. 5, p. E926–E933, 2004.
- WEINBERGER, D. R. et al. Prefrontal neurons and the genetics of schizophrenia. *Biological Psychiatry*, v. 50, n. 11, p. 825–844, 2001.

- WHITE, J. S. Straight talk about high-fructose corn syrup: what it is and what it ain't. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 88, n. 6, p. 1716S–1721S, 2008.
- WOLFF, S. P.; JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 10, n. 5, p. 339–352, 1991.
- WOODS, S. C. et al. The evaluation of insulin as a metabolic signal influencing behavior via the brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 20, n. 1, p. 139–144, 1996.
- WU, H.-W. et al. A high-fructose diet induces hippocampal insulin resistance and exacerbates memory deficits in male Sprague-Dawley rats. *Nutritional Neuroscience*, v. 18, n. 7, p. 323–328, 2015.
- WU, J. et al. Dietary interventions that reduce mTOR activity rescue autistic-like behavioral deficits in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 59, p. 273–287, 2017.
- WU, K. L. H. et al. Environmental stimulation rescues maternal high fructose intake-impaired learning and memory in female offspring: Its correlation with redistribution of histone deacetylase 4. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 130, p. 105–117, 2016.
- WU, L.; JUURLINK, B. H. J. Increased methylglyoxal and oxidative stress in hypertensive rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, v. 39, n. 3, p. 809–814, 2002.
- WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, v. 124, n. 3, p. 471–484, 2006.
- XU, M. X. et al. Up-regulated fractalkine (FKN) and its receptor CX3CR1 are involved in fructose-induced neuroinflammation: Suppression by curcumin. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 58, p. 68–81, 2016.
- XUE, B.; KAHN, B. B. AMPK integrates nutrient and hormonal signals to regulate food intake and energy balance through effects in the hypothalamus and peripheral tissues. *The Journal of Physiology*, v. 574, n. Pt 1, p. 73–83, 2006.
- XUE, M. et al. Transcriptional control of glyoxalase 1 by Nrf2 provides a stress-responsive defence against dicarbonyl glycation. *Biochemical Journal*, v. 443, n. 1, p. 213–222, 2012.
- YAMANAKA, H. et al. A possible interaction of thioredoxin with VDUP1 in HeLa cells detected in a yeast two-hybrid system. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 271, n. 3, p. 796–800, 2000.
- YE, X. et al. Habitual sugar intake and cognitive function among middle-aged and older Puerto Ricans without diabetes. *The British Journal of Nutrition*, v. 106, n. 9, p. 1423–1432, 2011.

- YIN, Q. Q. et al. Pioglitazone Improves Cognitive Function via Increasing Insulin Sensitivity and Strengthening Antioxidant Defense System in Fructose-Drinking Insulin Resistance Rats. *Plos One*, v. 8, n. 3, p. 593-13, 2013.
- YU, M. A. et al. Oxidative stress with an activation of the renin-angiotensin system in human vascular endothelial cells as a novel mechanism of uric acid-induced endothelial dysfunction. *Journal of Hypertension*, v. 28, n. 6, p. 1234–1242, 2010.
- YUAN, L. et al. Isoorientin Prevents Hyperlipidemia and Liver Injury by Regulating Lipid Metabolism, Antioxidant Capability, and Inflammatory Cytokine Release in High-Fructose-Fed Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 64, n. 13, p. 2682–2689, 2016.
- ZHANG, J. et al. Inhibition of thioredoxin reductase by alantolactone prompts oxidative stress-mediated apoptosis of HeLa cells. *Biochemical Pharmacology*, v. 102, p. 34–44, 2016.
- ZHANG, Q. et al. A Perspective on the Maillard Reaction and the Analysis of Protein Glycation by Mass Spectrometry: Probing the Pathogenesis of Chronic Disease. *Journal of Proteome Research*, v. 8, n. 2, p. 754–769, 2009.
- ZHAO, Q. et al. Identification of glutathione (GSH)-independent glyoxalase III from *Schizosaccharomyces pombe*. *BMC Evolutionary Biology*, v. 14, p. 86, 2014.