

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

KAREN VASCONCELOS CALIXTO

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE BEBIDA À BASE
DE XAROPE DE COLA NA MEMÓRIA, ESTRESSE OXIDATIVO E
NEUROINFLAMAÇÃO EM RATOS WISTAR ADULTOS E EM
PROCESSO DE ENVELHECIMENTO**

CRICIUMA

2019

KAREN VASCONCELOS CALIXTO

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE BEBIDA À BASE
DE XAROPE DE COLA NA MEMÓRIA, ESTRESSE OXIDATIVO E
NEUROINFLAMAÇÃO EM RATOS WISTAR ADULTOS E EM
PROCESSO DE ENVELHECIMENTO**

Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em ciências da saúde para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Josiane Budni

CRICIUMA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C154e Calixto, Karen Vasconcelos.

Efeito da administração crônica de bebida à base de xarope de cola na memória, estresse oxidativo e neuroinflamação em ratos wistar adultos e em processo de envelhecimento / Karen Vasconcelos Calixto. – 2019.
77 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2019.
Orientação: Josiane Budni.

1. Bebidas de cola – Consumo – Efeitos colaterais. 2. Memória. 3.
Estresse oxidativo. 4. Neuroinflamação. 5. Envelhecimento. I. Título.

CDD 23. ed. 616.83



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata Karen de Vasconcelos Calixto sob o título “EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE BEBIDA À BASE DE XAROPE DE COLA NA MEMÓRIA, ESTRESSE OXIDATIVO E NEUROINFLAMAÇÃO EM RATOS WISTAR ADULTOS E EM PROCESSO DE ENVELHECIMENTO”, para obtenção do grau de DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “APROVAÇÃO” da Tese.

Criciúma, SC, 21 de fevereiro de 2019.

Profa. Dra. JADE DE OLIVEIRA
Membro Relator – UNESC

Profa. Dra. SAMIRA DA SILVA VALVASSORI
Membro Interno – UNESC

Profa. Dra. LISIANE TUON
Membro Externo – UNESC

Profa. Dra. FABRICIA PETRONILHO
Membro Externo – UNISUL

Profa. Dra. Josiane Budni
Orientadora

Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Coordenador PPGCS
Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver modificado e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Dedico ao meu esposo, Octacílio, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades.

Quero dedicar também aos meus filhos, Henry e Nolan, que embora não tivessem conhecimento disto, iluminaram de maneira especial os meus pensamentos e me cederam bastante do tempo tão precioso que eu poderia estar com eles.

E não deixando de dedicar e agradecer de forma grata e grandiosa meus pais, Pergentino Jr. e Danuse e meus avós Pergentino e Ilária, motivadores maiores desta conquista e a quem eu rogo todas as noites a minha existência.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, quero agradecer a Deus, por ter abençoado todos os dias da minha vida, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

Ao UNESC-ES, mais especificamente ao Magnífico Reitor Pergentino Jr., que incentivou e permitiu minha liberação para o Doutorado.

À UNESC-SC por ter me recebido no curso de Doutorado.

À minha professora orientadora Josiane Budni, que me acompanha e auxilia enormemente desde o mestrado, sempre com paciência e que me ajudou bastante a concluir este doutorado.

À Tatiani Bellettini, que foi tão importante no desenvolvimento desta tese.

E a todas as outras pessoas, que direta ou indiretamente colaboraram com o sucesso deste trabalho.

RESUMO

O consumo de refrigerantes aumentou consideravelmente nas últimas décadas e, entre eles, as bebidas à base de xarope de cola. O consumo excessivo de refrigerantes à base de xarope de cola está associado a diversas doenças e pode estar ligado ao declínio cognitivo, particularmente prejuízos na memória, em função da grande quantidade de açúcares presentes nos refrigerantes. Além disso, dietas com alto índice de açúcar tendem a promover resistência à insulina, síndrome metabólica e dislipidemia. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações comportamentais, inflamatórias e oxidativas em ratos Wistar machos tratados com refrigerante à base de xarope de cola. Os animais com diferentes idades (2, 8 e 14 meses), foram tratados com refrigerante à base de xarope de cola durante um período de 67 dias e foram divididos em grupo controle (água) e grupo refrigerante. Ao final do tratamento foram avaliadas as memórias espacial, de habituação ao campo aberto e aversiva, por meio dos testes do labirinto octogonal e em Y, habituação ao campo aberto e esquiva inibitória, respectivamente. Logo após os testes comportamentais, no 68º dia, os animais foram submetidos à eutanásia para retirada das estruturas cerebrais. As estruturas do córtex frontal (CF) e hipocampo (HIP) foram utilizadas para as análises dos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6, IL-10, atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e formação de radicais livres por reação ao 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH) foram analisados somente no HIP. Além disso, foi analisado a glicemia e o peso corporal dos animais. Os resultados do presente estudo mostram que não houve diferença para a glicemia e peso corporal entre os grupos, mas o tratamento com refrigerante à base de xarope de cola causou, de forma geral, dano de memória espacial e de habituação em todas as idades, exceto na memória de habituação para animais com 14 meses. Entretanto, não foi observado dano na memória aversiva avaliada no teste de esquiva inibitória. Os animais com 2 e 8 meses administrados com refrigerante, apresentaram atividade aumentada da CAT no HIP e os animais com 8 meses que ingeriram refrigerante, apresentaram atividade diminuída no CF. Os animais com 8 e 14 meses administrados com refrigerante, apresentaram atividade reduzida da SOD no CF. Os níveis de TBARS e DCFH estavam aumentados no HIP de animais com 2 meses. Em animais com 14 meses, apenas o DCFH estava aumentado no HIP dos animais que ingeriram refrigerante. Os animais com 8 meses de idade que receberam refrigerante apresentaram níveis aumentados de TNF- α no CF e HIP. Além disso, os animais com 2, 8 e 14 meses de idade que ingeriram refrigerante apresentaram níveis reduzidos de IL-10 no CF. Somente o HIP de animais com 2 meses apresentou redução dos níveis de IL-10 induzido pelo refrigerante. Portanto, o presente estudo mostrou que o tratamento crônico com refrigerante à base de xarope de cola pode influenciar tanto nos danos de memória espacial e de habituação, como no aumento de parâmetros de estresse oxidativo e inflamatórios à nível molecular em estruturas cerebrais. É possível observar que a idade que foi mais susceptível ao dano induzido pelo refrigerante, foi a idade de 8 meses, seguido pela idade de 2 meses e por última a idade de 14 meses.

Palavras-chave: Refrigerante; memória; inflamação; estresse oxidativo; envelhecimento.

ABSTRACT

Consumption of soft drinks has increased considerably in recent decades, including syrup cola-flavored beverages. Excessive consumption of cola-based soft drinks is associated with several diseases and may be linked to cognitive decline, particularly memory impairment, due to the large amount of sugars in soft drinks. In addition, diets with high sugar content tend to promote insulin resistance, metabolic syndrome and dyslipidemia. Thus, the objective of the present study was to evaluate the behavioral, inflammatory and oxidative changes in male Wistar rats treated with cola-based soft drink. Animals with different ages (2-, 8- and 14-month-old) were subjected to ingestion cola-based soft drink for 67 days and were divided into control group (water) and soft drink group. At the end of the treatment, the spatial, habituation and aversive memories were evaluated through the radial- and Y- maze, habituation to the open field and inhibitory avoidance task, respectively. Soon after the behavioral tests, on the 68th day, the animals were subjected to euthanasia to withdraw from the brain structures. The structures of the frontal cortex (FC) and hippocampus (HIP) were used to analyze levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukins (IL) IL-1 β , IL-6, IL-10, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). The levels of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and free radical formation by reaction with dichlorofluorescein diacetate (DCFH) were analyze just in the HIP. Moreover, glycemia and body weight of the animals were analyzed. The results of the present study show that there was no difference in glycemia and body weight between the groups, but treatment with cola-based soft drink caused, in general, spatial and habituation memories damage at all ages, except in habituation memory for 14-month-old animals. However, no damage was observed in aversive memory assessed in the inhibitory avoidance task. 2- and 8-month-old animals that given soft drink had increased CAT activity in the HIP and 8-month-old animals that ingested soft drink had decreased CAT activity in the FC. 8- and 14-month-old animals that given soft drink showed reduced SOD activity in FC. The levels of TBARS and DCFH were increased in the HIP of 2-month-old animals. In 14-month-old animals, only the DCFH level was increased in the HIP of the animals that ingested soft drink. The 8-month-old animals receiving soft drink had increased TNF- α levels in FC and HIP. In addition, 2-, 8- and 14-month-old animals that ingested soft drink had reduced IL-10 levels in FC and in HIP. Just 2-month-old animals HIP had reduced IL-10 levels induced by soft drink. Therefore, the present study showed that chronic treatment with cola-based soft drink can influence both spatial and habituation memories damages, as well as increased oxidative stress and inflammatory parameters at the molecular level in brain structures. It is possible to observe that the age that was most susceptible to the damage induced by the soft drink was the age of 8 months, followed by the age of 2 months and the last age of 14 months.

Keywords: Soft drink; memory; inflammation; oxidative stress; aging.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Os produtos finais da glicação (AGEs) avançada em patologias.....	177
Figura 2: O metabolismo da frutose em células hepáticas.....	23
Figura 3: Desenho experimental. Fonte: do autor, 2019.....	31
Figura 4: Efeito da administração crônica de refrigerante à base de xarope de cola durante 30 e 67 dias de tratamento em animais com 2, 8 e 14 meses de idade, nos valores de glicemia e peso	38
Figura 5: Efeito do tratamento com refrigerante à base de xarope de cola por 67 dias em animais com 2, 8 e 14 meses na memória espacial avaliada no teste do labirinto octogonal.....	40
Figura 6: Efeito do tratamento com refrigerante a base de cola por 67 dias em animais com 2, 8 e 14 meses na memória espacial avaliada no teste do labirinto em Y em ratos Wistars machos com idades de 2, 8 e 14 meses.	41
Figura 7: Efeito do tratamento com refrigerante a base de cola por 67 dias em animais com 2, 8 e 14 meses na memória de habituação avaliada no teste de habituação ao campo aberto em ratos Wistars machos com idades de 2, 8 e 14 meses.	42
Figura 8: Efeito do tratamento com refrigerante à base de cola por 67 dias em ratos Wistar machos com idade de 2, 8 e 14 meses no teste de esquivas inibitórias.....	43
Figura 9: Efeito do tratamento com refrigerante à base de cola durante 67 dias em ratos Wistar machos com idade de 2, 8 e 14 meses nas atividades da CAT (A e B) e SOD (C e D) em estruturas cerebrais do córtex frontal (A e C) e hipocampo (B e D).	44
Figura 10: Efeito do tratamento com refrigerante à base de cola durante 67 dias em ratos Wistar machos com idade de 2, 8 e 14 meses nos níveis do DCFH (A) e TBARS (B) no hipocampo ..	45
Figura 11: Efeito do tratamento com refrigerante à base de cola durante 67 dias em ratos Wistar machos com idade de 2, 8 e 14 meses nos níveis de TNF- α no córtex frontal (A) e hipocampo (B)..	46
Figura 12: Efeito do tratamento com refrigerante à base de cola durante 67 dias em ratos Wistar machos com idade de 2, 8 e 14 meses nos níveis de IL-1 β no Córtex frontal e hipocampo.	47
Figura 13: Efeito do tratamento com refrigerante à base de cola durante 67 dias em ratos Wistar machos com idade de 2, 8 e 14 meses nos níveis de IL-6 no córtex frontal (A) e hipocampo (B).	48
Figura 14: Efeito do tratamento com refrigerante à base de cola durante 67 dias em ratos Wistar machos com idade de 2, 8 e 14 meses nos níveis de IL-10 no córtex frontal (A) e hipocampo (B).	49
Tabela 1: Mostra o resumo dos resultados obtidos neste estudo	63

ABREVIATURAS

AGEs - Produtos finais de glicação avançada (do inglês: *Advanced Glycation End-products*)

AMP - Adenosina monofosfato

APO-E – Apolipoproteína-E

ATP – Adenosina trifosfato

BAA – Bebidas adoçadas com açúcar

BDNF - fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês: *Brain-derived neurotrophic factor*)

CAT - Catalase

CO₂ – Dióxido de carbono

DA – Doença de Alzheimer

DCF - 2',7'-diclofluoresceína

DCFH - 2'7'diacetato de diclorofluoresceína

D-gal - D-galactose

DHAP - Di-hidroxiacetona-fosfato

DHGNA - Doença hepática gordurosa não alcoólica

DNA – ácido desoxirribonucleico (do inglês: *deoxyribonucleic acid*)

EESGP - Extrato etanólico de sementes de gergelim preto

EFF - Excesso de frutose livre (do inglês *excess free fructose*)

EnFruAGE – Antígenos produzidos pelo alto teor de frutose através da glicação

ERNs - Espécies reativas de nitrogênio

EROs - Espécies reativas de oxigênio

GPx - Glutaciona peroxidase

HDL – Lipoproteínas de alta densidade (do inglês: *High Density Lipoproteins*)

HFCS - Xarope de milho rico em frutose (do inglês *high-fructose corn syrup*)

IGF-1 - Fator 1 de crescimento tipo insulina (do inglês: *insulin-like growth factor 1*)

IL-10 – Interleucina 10

IL-1 α – Interleucina 1 α

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade (do inglês: *Low Density Lipoproteins*)

MCP-1/CCL2 - Proteína quimiotática de monócitos-1

MDA – Malondialdeído

MRPS - Produtos de reação de Maillard (do inglês *Maillard reaction products*)

NF-KB - Fator nuclear Kappa B (do inglês: *nuclear factor kappa B*)

OMS - Organização Mundial da Saúde

PET - Politereftalato de etileno

RAGE - Receptor de AGE

SNC - sistema nervoso central

SOD - Superóxido dismutase

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF- α - Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
1.1 Alto consumo de refrigerantes na sociedade moderna.....	14
1.2. Refrigerantes e o impacto na saúde do indivíduo.....	16
1.3 Envelhecimento.....	21
1.4 Justificativa.....	28
2. Objetivos.....	29
2.1 Objetivos gerais.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. Materiais e Métodos.....	30
3.1. Desenho experimental.....	30
3.2. Tratamento crônico.....	30
3.3 Avaliação do peso corporal.....	31
3.4 Avaliação da ingestão de água e refrigerante.....	31
3.5 Testes comportamentais.....	32
3.5.1 Labirinto octogonal.....	32
3.5.2 Labirinto em Y.....	32
3.5.3 Habituação ao campo aberto.....	33
3.5.4 Esquiva inibitória.....	33
3.6 Eutanásia.....	34
3.7 Análises Bioquímicas.....	34
3.7.1 Processamento das amostras.....	34
3.7.2 Análise da glicemia.....	34
3.7.3 Mensuração de parâmetros de estresse oxidativo.....	34
3.7.4 Análise dos níveis de citocinas.....	36
3.8 Análise estatística.....	36
4. Resultados.....	37
5. Discussão.....	50
6. Conclusão.....	62
Referências.....	64
Anexo - Certificado de Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais.....	77

1. Introdução

1.1 Alto consumo de refrigerantes na sociedade moderna

O termo refrigerante abrange os refrigerantes, juntamente com outras bebidas açucaradas, como bebidas de frutas, limonadas e chás gelados. O termo soda engloba bebidas adoçadas com açúcar (BAA) e carbonatadas tais como as bebidas à base de xarope de cola. Na segunda metade do século XVIII, nos Estados Unidos, já existiam técnicas de carbonatação de líquidos. Nesta época, a água gaseificada ficou conhecida como água de soda, pois era utilizado bicarbonato de sódio para produzir carbonatação. Foi o farmacêutico, Thomas Henry, que publicou a receita de carbonatação em panfletos e distribuiu, sendo esta, utilizada na produção de cervejas e mais tarde do refrigerante (Wolf, Bray et al. 2008). Há uma estimativa de que foi na virada do século XIX que surgiram as primeiras receitas de refrigerantes, que misturavam xaropes de frutas com água gaseificada. Entretanto, foi em 1886 que a indústria do refrigerante teve um dos seus marcos mais importante, quando o farmacêutico John Pemberton combinou os ingredientes que serviram como base para o desenvolvimento do refrigerante Coca-Cola®. Inicialmente esta fórmula era vendida como tônico estimulante e mais tarde vendida como refrigerante (Wolf, Bray et al. 2008).

A primeira indústria de refrigerante no Brasil, surgiu nos primeiros anos do século XX. Até os anos de 1930, existiam apenas três unidades em atividade. A partir da década de 50, com a popularização dos eletrodomésticos, no Brasil, o consumo de refrigerantes ganhou espaço de maneira significativa como consequência do surgimento dos refrigeradores e da utilização de embalagens alternativas ao vidro, como o politereftalato de etileno. Por se tratar de um processo ainda artesanal, estas fábricas produziam pouco mais de uma centena de unidades por hora. (PET) (CRUZ, 2012). E, em nosso país, os sabores de refrigerantes mais consumidos são, respectivamente, cola (50,9%), guaraná (24,5%) e outros sabores (24,6%). Em seu processo de produção, os sabores concentrados são misturados com açúcar e insumos, produzindo um xarope. Após, é acrescentado água e gás carbônico. Dentro do cenário mundial, o Brasil se encontra em terceiro lugar entre os produtores de refrigerante, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e do México. Contudo, quando observado o consumo *per capita*, o Brasil se encontra na 28ª posição, consumindo em média anual de 69 litros por habitante, enquanto os Estados Unidos (EUA), que se encontra em 1ª lugar consome em média de 184 litros por habitante (Nielsen and Popkin 2004).

Há uma grande preocupação em relação à rápida trajetória de aumento do consumo dessas bebidas em muitos países em desenvolvimento, onde o acesso as BAA cresceu

concomitantemente com as taxas crescentes de urbanização (Barquera, Hernandez-Barrera et al. 2008). Os números de vendas do relatório anual de 2007 da Coca Cola® mostram que, durante 2007, a Índia e a China experimentaram os crescimentos de 14 e 18%, respectivamente, no volume de bebidas vendidas, o que indica um aumento substancial das vendas em nível da população (Malik, Popkin et al. 2010). Os refrigerantes, assim como os sucos de frutas industrializados e as bebidas energéticas conhecidas como BAA, apresentam alto teor de açúcares, pois estes são acrescentados durante o seu processo de fabricação. Estas são bebidas que contêm a adição de adoçantes calóricos, tais como sacarose, xaropes de milho ricos em frutose ou concentrados de suco de frutas. Independente da natureza desses adoçantes, todos irão resultar em efeitos metabólicos semelhantes. O consumo excessivo de frutose está, hipoteticamente, associado ao risco de doença metabólica (Hu and Malik 2010, Emond, Patterson et al. 2014, Walker, Dumke et al. 2014).

As BAAs contêm grandes quantidades de açúcares refinados. Tem-se observado uma relação entre o aumento do consumo dessas bebidas açucaradas com doenças metabólicas, como a hipertensão, a resistência à insulina, o diabetes Mellitus Tipo 2, a obesidade abdominal, a hipertrigliceridemia e a síndrome metabólica (Hu and Malik 2010, Gomez-Miranda, Jimenez-Cruz et al. 2013, Colchero, Salgado et al. 2015). Estudos tem demonstrado que as taxas de consumo de BAA estão aumentando em todo o mundo, com uma média de ingestão *per capita* de 11,4 galões por ano (Ludwig 2002, Hu and Malik 2010, Gomez-Miranda, Jimenez-Cruz et al. 2013, Emond, Patterson et al. 2014). As taxas de consumo de BAA são mais elevadas no México onde é consumido, em média, 31,5 galões por pessoa ao ano, seguido dos EUA com um consumo, em média, de 31,2 galões por pessoa ao ano (Gomez-Miranda, Jimenez-Cruz et al. 2013, Colchero, Salgado et al. 2015). Evidências baseadas em mais de 39 estudos transversais e prospectivos sustentam uma relação positiva entre a ingestão de BAA e a probabilidade de crianças e adolescentes estarem com sobrepeso ou obesidade (Malik, Schulze et al. 2006, Woodward-Lopez, Kao et al. 2011, Basu, McKee et al. 2013).

Nos EUA, por exemplo, pessoas adultas chegam a consumir 16% de suas calorias totais através de alimentos que recebem adição de açúcares, desses, 46% são consumidos em forma líquida, como os refrigerantes e bebidas energéticas (Basu, McKee et al. 2013, Miller, Merlo et al. 2017). No Brasil, em uma classificação geral dos alimentos, o refrigerante aparece na 9ª posição, estando presente em 23% das residências. Quando classificado por faixa etária e renda, o mesmo é majoritariamente consumido por indivíduos adolescentes e adultos de renda mais elevada (Souza et al. 2013). Contudo, a obesidade e as taxas associadas ao diabetes estão aumentando em todo âmbito terrestre. Mais de 1,5 bilhão de pessoas em todo o mundo estão

agora com sobrepeso e, pelo menos, um em cada vinte adultos têm diabetes. Desde 1980, o número de pessoas obesas no planeta dobrou, de modo que a maior parte da população mundial agora vive em países onde há mais mortes atribuídas ao excesso de peso do que ao baixo peso (Basu, McKee et al. 2013, Miller, Merlo et al. 2017).

1.2. Refrigerantes e o impacto na saúde do indivíduo

Os açúcares contendo frutose que estão atualmente presentes nas dietas são alegadamente um fator de risco importante para o desenvolvimento da obesidade, doença cardiometabólica, incluindo síndrome metabólica e diabetes (Hu and Malik 2010, Malhotra 2013, Malik and Hu 2015, Khan and Sievenpiper 2016, Miller, Merlo et al. 2017). Os efeitos adversos do açúcar para a saúde há muito tempo têm sido uma questão de grande interesse público e científico. Durante décadas a alta ingestão de açúcar esteve associada ao desenvolvimento de obesidade, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (DCV) (Khan and Sievenpiper 2016, Miller, Merlo et al. 2017). A frutose é encontrada em sacarose ou açúcar de mesa comum, que é um dissacarídeo composto por 1 molécula de glicose e 1 molécula de frutose ligada através de uma ligação glicosídica α 1-4, e é obtida a partir de cana-de-açúcar ou beterraba (Sievenpiper, de Souza et al. 2014). A frutose e ou a glicose também são encontradas como monossacarídeos naturais que existem em frutas, mel e alguns vegetais (Sievenpiper, de Souza et al. 2014, Malik e Hu 2015).

O metabolismo da frutose difere da glicose devido à presença de diferentes enzimas e reações para seus passos metabólicos iniciais. A frutose é absorvida do intestino na veia porta e é metabolizada no fígado, onde é convertida em frutose-1-fosfato pela enzima frutokinase. A frutose-1-fosfato é então dividida pela aldolase em duas moléculas de 3 carbonos, nomeadamente o gliceraldeído e a di-hidroxiacetona-fosfato (DHAP). O gliceraldeído é ainda convertido em gliceraldeído-3-fosfato, que juntamente com DHAP pode então entrar em várias vias metabólicas para formar substratos energéticos clássicos como a glicose, o glicogênio, o lactato e os ácidos graxos. Como esses processos não dependem da insulina, a frutose é metabolizada sem a necessidade de secreção de insulina e sem o aumento da glicose plasmática. Dado o destino metabólico distinto que diferencia a frutose da glicose (figura 2), a atenção recente foi focada na frutose como tendo um papel único de risco na etiologia de doenças ligadas a obesidade e síndromes metabólicas (Sievenpiper, de Souza et al. 2014, Malik and Hu 2015).

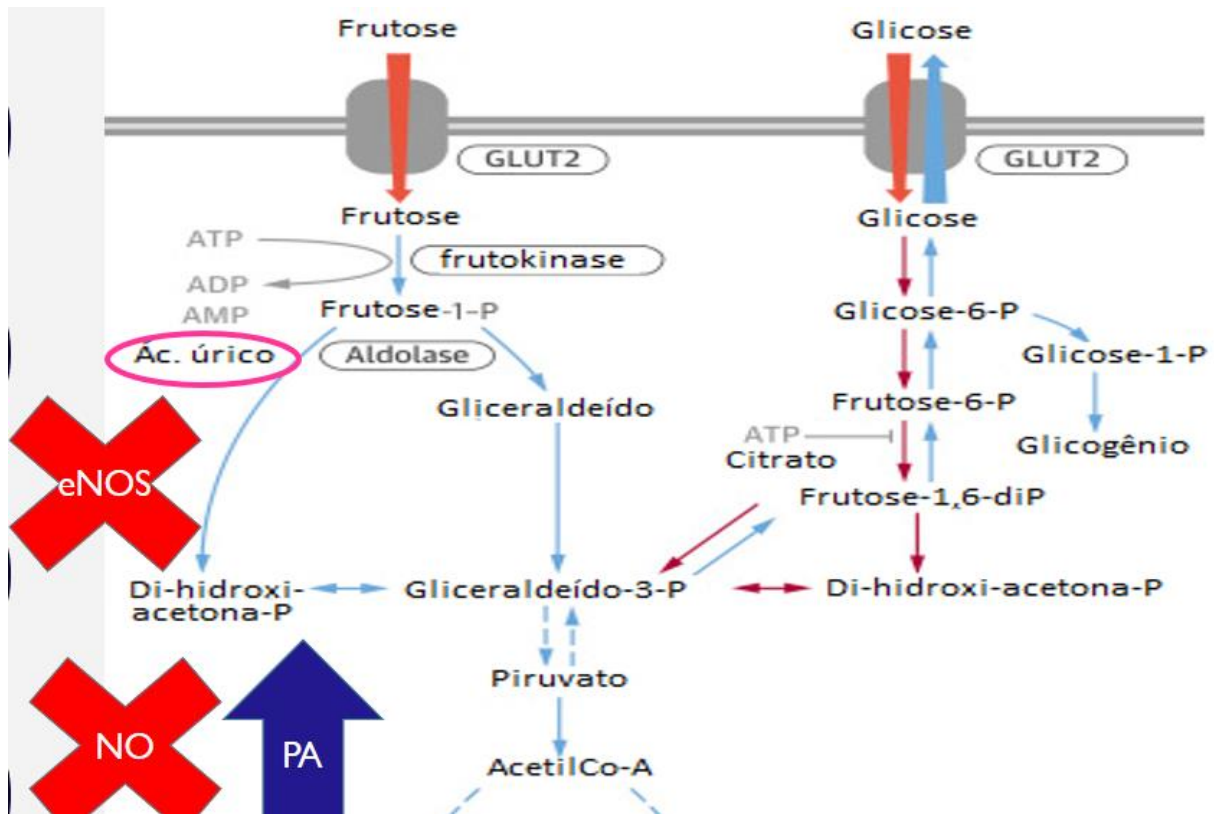


Figura 1: O metabolismo da frutose em células hepáticas. O metabolismo da frutose difere da glicose devido à presença de diferentes enzimas e reações para seus passos metabólicos iniciais. A frutose absorvida pelo fígado pode ser oxidada em CO₂ e depois convertida em lactato e glicose. Glicose e lactato são subsequentemente liberados na circulação para o metabolismo extra-hepático ou convertidos em glicogênio ou gordura hepática. A absorção maciça e a fosforilação da frutose no fígado podem levar a uma grande degradação da adenosina trifosfato (ATP) para adenosina monofosfato (AMP) e ácido úrico. (Malik and Hu 2015).

Adoçantes como o xarope de milho rico em frutose do inglês *high-fructose corn syrup* (HFCS) são produzidos a partir do amido de milho por meio de processamento industrial. Estes adoçantes são constituídos de frutose livre e glicose livre em proporções relativamente iguais e têm substituído progressivamente o uso de açúcar, principalmente devido ao seu baixo custo. As formas mais comuns de HFCS contêm frutose na proporção de 42% (HFCS-42) ou 55% (HFCS-55), juntamente com glicose e água (Sievenpiper, de Souza et al. 2014, Malik and Hu 2015). Os refrigerantes são bebidas ricas em frutose e podem estar envolvidos no aumento da obesidade em função da grande quantidade deste açúcar (Basu, McKee et al. 2013). Um alto consumo de bebidas calóricas tais como bebidas alcoólicas ou adoçadas (refrigerantes), tem sido associado a menor sensação de saciedade, podendo contribuir para o ganho de peso e a ingestão de líquido ao invés de calorias sólidas (Schulze, Liu et al. 2004, Perez-Morales, Bacardi-Gascon et al. 2013, Fresan, Gea et al. 2016, Miller, Merlo et al. 2017). A obesidade, nas últimas décadas, tornou-se uma pandemia global. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso

e mais de 700 milhões, obesos. O número de crianças com sobrepeso e obesidade no mundo poderá chegar a 75 milhões (World Health Organization, 2012). A principal causa da obesidade é o desequilíbrio de energia. Existem alguns fatores que contribuem para o aumento da obesidade como o estilo de vida sedentário, os fatores epigenéticos e a ingestão calórica excessiva através de alimentos e bebidas (Fresan, Gea et al. 2016).

O consumo de bebidas com excesso de frutose livre, do inglês *excess free fructose* (EFF), aumentou nas últimas décadas e as ingestões podem exceder as dosagens associadas à má absorção de frutose em subgrupos da população (Basu, McKee et al. 2013, Colchero, Salgado et al. 2015, DeChristopher, Uribarri et al. 2016). Com níveis elevados de frutose não absorvida e com condições alcalinas favoráveis no intestino superior, a frutose não absorvida glica proteínas dietéticas parcialmente digeridas e as transforma em antígenos (enFruAGE). A má absorção subjacente e a reatividade da frutose no sistema gastrointestinal, podem contribuir para a formação *in loco* de enFruAGEs. Os antígenos enFruAGEs podem ser uma fonte negligenciada de produtos de AGEs que contribuem para o aumento de doenças metabólicas como o diabetes tipo 2 (Basu, McKee et al. 2013). A formação intestinal *in situ* de enFruAGE pode produzir AGEs que são menores e possuem maior facilidade para se difundir para fora do compartimento vascular e para os tecidos circundantes do que as AGEs presentes na dieta ou as formadas na circulação sistêmica. Uma vez lá, o enFruAGE pode iniciar uma cascata inflamatória promovendo danos teciduais e, devido ao seu pequeno tamanho, podem se acumular no pâncreas resultando em pancreatite, insuficiência de insulina e diabetes tipo 2 (DT2). O enFruAGE pode ser precursor de inflamação crônica sendo capaz de promover a sinalização pró-inflamatória (Basu, McKee et al. 2013, DeChristopher, Uribarri et al. 2016).

O consumo de refrigerantes aumentou consideravelmente nas últimas décadas e, entre eles, as preparações à base de xarope de cola. Estes são possivelmente os refrescos com as maiores vendas em todo o mundo (Nielsen and Popkin 2004, Vereecken, Inchley et al. 2005). Com isso, foram levantadas preocupações importantes sobre os possíveis efeitos prejudiciais do consumo crônico de bebidas à base de xarope de cola, entre eles pode-se citar a desmineralização óssea (Tucker, Morita et al. 2006), o amolecimento do esmalte dos dentes (Jensdottir, Holbrook et al. 2006), o desenvolvimento de síndrome metabólica e o diabetes tipo 2 (Dhingra, Sullivan et al. 2007). Existem evidências de que os refrigerantes carbonatados e à base de xarope de cola, em particular, podem estar associados a menor densidade de massa óssea (McGartland, Robson et al. 2003, Tucker, Morita et al. 2006). A cafeína é um ingrediente presente na maioria dos refrigerantes à base de xarope de cola, e foi identificada como fator de risco para a osteoporose (Massey and Whiting 1993, Rapuri, Gallagher et al. 2001). Além disso,

as colas contêm ácido fosfórico, que demonstrou interferir na absorção de cálcio e contribuir para desequilíbrios que levam à perda adicional de cálcio (Amato, Maravilla et al. 1998, Fitzpatrick and Heaney 2003).

Em adultos de meia-idade o consumo de refrigerantes está associado a uma maior prevalência e incidência de múltiplos fatores de risco metabólicos. Existem vários efeitos fisiológicos de refrigerantes que podem representar um risco metabólico adverso. O alto consumo de adoçantes nutritivos adicionados, como o HFCS utilizado como adoçante primário em refrigerantes, pode levar ao ganho de peso, ao aumento da resistência à insulina, a uma diminuição de lipoproteínas de alta densidade, do inglês *High Density Lipoproteins* (HDL) e ao aumento nos níveis de triglicerídeos (Otero-Losada, Grana et al. 2011). Estudos demonstraram que o consumo crônico de bebidas à base de xarope de cola causa alterações no perfil lipídico de ratos e na APO-E em camundongos, o que inclui um aumento nos níveis plasmáticos de triglicerídeos. Também foi observada a diminuição de alimentos sólidos, porém, sem haver alteração no peso corporal (Otero-Losada, Grana et al. 2011, Otero-Losada, Mc Loughlin et al. 2013).

O aumento da incidência de obesidade tem acompanhado a crescente proporção de ingestão de energia representada por edulcorantes nutritivos que estão relacionados ao aumento do peso corporal (Malik, Popkin et al. 2010). Os gostos doces estimulam vários sistemas de neurotransmissores, por exemplo, dopamina e opióides endógenos, envolvidos na resposta de recompensa, que desempenham um papel na modulação do comportamento alimentar (Green and Murphy 2012). Os alimentos doces podem ser preferencialmente procurados e selecionados devido à ativação do sistema de recompensa, ou possivelmente consumidos em excesso devido à compensação por uma resposta de recompensa lenta (Wang, Volkow et al. 2001, Volkow, Wang et al. 2002, Davis, Patte et al. 2007, Green, Jacobson et al. 2011). Em estudo realizado por Malik et al (2010) foi demonstrado que além do ganho de peso, o maior consumo de BAA está associado ao desenvolvimento de síndrome metabólica e diabetes tipo 2. Estes dados fornecem evidências empíricas de que a ingestão de BAA deve ser limitada para reduzir o risco de doenças metabólicas crônicas associadas à obesidade (Malik, Popkin et al. 2010).

O consumo excessivo de dietas ricas em açúcar refinado não está apenas ligado ao aumento da taxa de obesidade em todo o mundo, mas tem sido associado ao declínio cognitivo, particularmente prejuízos na memória produzindo mudanças funcionais no hipocampo e no córtex frontal, levando a perturbações no controle comportamental (Kanoski and Davidson 2011, Cheke, Simons et al. 2016). O hipocampo está situado em uma posição estratégica para processar informações derivadas das áreas de associação polimodal do neocórtex e redistribuí-

las para regiões corticais e subcorticais envolvidas na modulação de processos comportamentais complexos, como a aprendizagem e a memória (Walsh and Emerich 1988). Esta região cerebral pode ser considerada o principal local de armazenamento temporário da memória. É a estrutura primordial para transformar a memória de curto prazo em memória de longo prazo, sendo responsável por selecionar e armazenar fatos, eventos e questões espaciais (memória espacial) (Yu and Frank 2015). O córtex pré-frontal medial desempenha um papel fundamental na memória, conforme destacado por seu envolvimento seletivo na recuperação de memórias remotas (Bontempi, Laurent-Demir et al. 1999, Frankland, Bontempi et al. 2004, Takashima, Petersson et al. 2006). Outros estudos mostram que o córtex pré-frontal medial está implicado na memória recente quando sua inativação se mostrou prejudicial para a lembrança da memória do medo que foi aprendida no dia anterior (Corcoran and Quirk 2007). Já foi visto que ratos com lesões no córtex pré-frontal medial têm dificuldade em recordar associações de recompensas ao longo de um atraso de 30 minutos (Seamans, Floresco et al. 1995), ou esperar por uma resposta durante um atraso de 30 segundos (Narayanan, Horst et al. 2006). Em resumo, há evidências de que o córtex pré-frontal medial desempenha um papel crítico em memórias remotas, recentes e de curto prazo em uma ampla gama de tarefas.

O córtex pré-frontal medial e o hipocampo desempenham papéis bem reconhecidos no processamento da memória (Eichenbaum, Schoenbaum et al. 1996, Baddeley 1998, Fuster 2001, Vertes, Hoover et al. 2007). O hipocampo projeta-se densamente e exerce fortes ações excitatórias no córtex pré-frontal medial. Curiosamente, o córtex pré-frontal medial, em ratos e em outras espécies, não tem projeções de retorno direto para o hipocampo e possuem poucas projeções para as estruturas para-hipocampais, incluindo o córtex entorrinal (Ferino, Thierry et al. 1987, Laroche, Davis et al. 2000, Euston, Gruber et al. 2012). Já está bem estabelecido que o núcleo de reunião do tálamo da linha média é a principal fonte de aferências talâmicas do hipocampo (Takagishi and Chiba 1991, Laroche, Davis et al. 2000, Vertes 2004). Um estudo realizado por Vertes et al. (2007), mostrou à nível microscópico, que as fibras do córtex pré-frontal medial formam múltiplos contatos sinápticos putativos com dendritos de neurônios hipocampais que se projetam ao longo da extensão do núcleo reunido. Mostrou também, em nível ultraestrutural, que as fibras corticais pré-frontais mediais formam contatos assimétricos predominantemente com hastes de células dendríticas, projetando-se hipocampalmente. Esses achados indicam que o núcleo de reunião representa um elo crítico entre o córtex pré-frontal medial e o hipocampo, funcionando como um interruptor “liga/desliga” para essas duas estruturas. (Vertes, Hoover et al. 2007).

Estudos sugerem que problemas de saúde relacionados à obesidade como o diabetes e a hipertensão, juntamente com o excesso de peso corporal, têm um impacto significativo na estrutura e função do cérebro em modelos de estudo pré-clínicos com roedores (Molteni, Barnard et al. 2002, Kanoski, Meisel et al. 2007, Erion, Wosiski-Kuhn et al. 2014) e, também em estudos com humanos (Jagust, Harvey et al. 2005, Bruehl, Sweat et al. 2011, Mueller, Sacher et al. 2012) indicando que os sistemas neurais envolvidos na cognição e na memória também são afetados negativamente na obesidade (Stranahan, Norman et al. 2008, Stranahan and Mattson 2012). Um estudo que reduziu a adiposidade através do treinamento em esteira em camundongos BL/C57 deficientes em receptores de leptina, mostrou que essa intervenção reduziu a inflamação central e adiposa e reverteu os déficits de plasticidade cognitiva e sináptica entre os neurônios do hipocampo (Erion, Wosiski-Kuhn et al. 2014). Relatos recentes indicam que danos seletivos ao hipocampo de roedores e patologias que são relacionadas ao hipocampo em humanos, estão associados com o aumento e a frequência da ingestão de energia através da alimentação (Davidson, Kanoski et al. 2005, Davidson, Chan et al. 2009). Em estudo realizado por Wong et al. (2017) foi observado que uma dieta com alto teor de sacarose causa impacto nos processos de memória espacial e de trabalho em roedores (Wong, Dogra et al. 2017). Esses achados sugerem que os fatores dietéticos podem estar associados ao surgimento da patologia hipocampal e, a patologia do hipocampo, pode estar associada ao surgimento de aumento da ingestão alimentar e ganho de peso corporal.

1.3 Envelhecimento

O envelhecimento é caracterizado pela deterioração progressiva das funções fisiológicas, levando a uma homeostase prejudicada do organismo e aumentando a suscetibilidade à doença e à morte. O envelhecimento é considerado um importante fator de risco para muitas doenças, incluindo câncer, distúrbios cardiovasculares, diabetes e doenças neurodegenerativas, entre elas, a de maior incidência é a Doença de Alzheimer (DA) (Ismail, Nguyen et al. 2011, Meng, Lv et al. 2017). Durante o envelhecimento, o número de células nervosas cerebrais é notavelmente reduzido, bem como as alterações no fluxo sanguíneo cerebral que estão associados ao aumento do risco de dano cognitivo. Ocorre também perda neuronal em algumas partes específicas do cérebro, tais como o *locus ceruleus*, substância negra, hipocampo, núcleo caudado, putâmen e córtex cerebral (Cesari, Vellas et al. 2013, Zlatar, Bischoff-Grethe et al. 2016). Essas alterações fisiológicas e anatômicas acabam levando a prejuízos de memória, principalmente da memória recente (Izquierdo, Barros et al. 1998). As alterações na cognição que ocorrem com o processo de envelhecimento normal estão

relacionadas com a redução de três recursos chave do processamento cognitivo: a velocidade com que a informação é processada, a memória de trabalho e as capacidades sensoriais e perceptuais (Yu, Oh et al. 2016). A respeito da repercussão da idade sobre o desempenho cognitivo, observou-se que o tipo de memória mais afetado pela idade é a memória de curto prazo, em especial a memória de trabalho, em razão da menor capacidade de armazenamento de informações (Scherling, Wilkins et al. 2016). Portanto, além do processo de envelhecimento ser uma deterioração progressiva de todos os mecanismos homeostáticos do cérebro, também é acompanhado de declínio cognitivo (Bishop, Lu et al. 2010).

O envelhecimento dispõe de muitas teorias que buscam explicar as alterações fisiológicas decorrentes desse processo. Dentre essas se destacam as teorias estocásticas e genéticas. As estocásticas sugerem que a perda de funcionalidade no envelhecimento é causada pelo acúmulo aleatório de lesões, associados à ação ambiental em moléculas vitais, que provocam um declínio fisiológico progressivo. Estão incluídas neste grupo, a teoria da quebra de ligações (Cristofalo, Gerhard et al. 1994), a teoria da glicação avançada (Zimmerman, Meistrell et al. 1995), a teoria do estresse oxidativo (Harman 1956) e a recente teoria do *Inflammaging* (Davinelli, Maes et al. 2016). Dentre as teorias genéticas, destacam-se: a teoria do envelhecimento celular (Hayflick and Moorhead 1961), teoria da mutagênese intrínseca (Burnet 1974) e a teoria dos telômeros (Kurenova and Mason 1997). Muito embora sejam apresentadas diferentes teorias para elucidar o envelhecimento, ambas acabam seguindo as mesmas direções conclusivas, ou seja, o organismo senescente, com o avanço da idade, apresenta diminuição da funcionalidade orgânica (Samanez-Larkin and Knutson 2015).

A glicação avançada é um processo lento e contínuo que ocorre no envelhecimento normal que dá origem aos produtos finais de glicação avançada (AGEs - do inglês: *Advanced Glycation End-products*). No entanto, é significativamente elevado em diabetes devido à hiperglicemia recorrente ou controle glicêmico deficiente (Shcheglova, Makker et al. 2009, Kang, Chung et al. 2016). Os AGEs iniciam patologias dos tecidos vasculares por dois mecanismos principais: alteração da matriz extracelular por meio de reticulações de proteína e a modulação das funções celulares através da interação com receptores específicos (Figura 1) (Shcheglova, Makker et al. 2009).

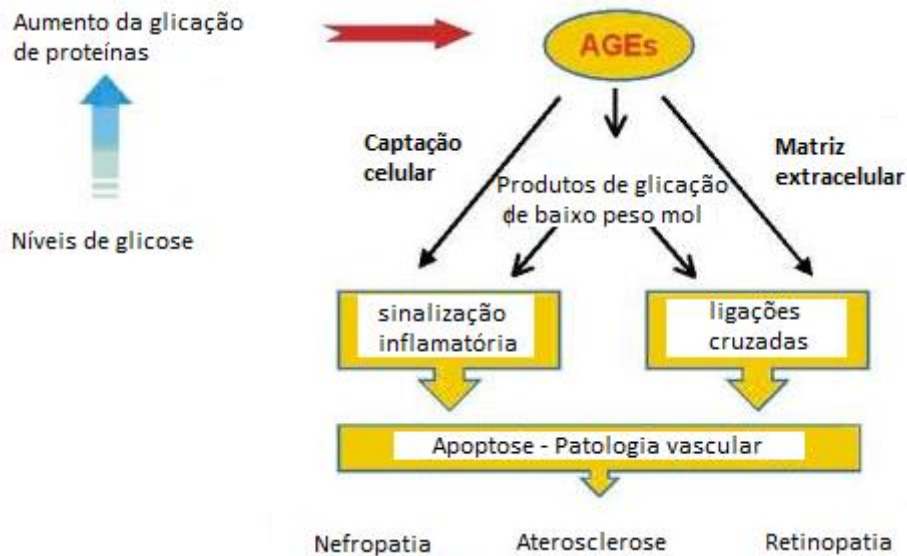


Figura 2: Os produtos finais da glicação (AGEs) avançada em patologias. A glicação da proteína devido à hiperglicemia ou ao envelhecimento normal são modificadas no organismo para AGEs. Estes AGEs podem ser ainda desagregados em peptídeos glicosilados e AGEs de baixo peso molecular. Tanto os AGEs de alto e baixo pesos moleculares podem ser absorvidos pelos tecidos vasculares, pelos receptores celulares e pela reticulação da matriz extracelular. Estas modificações são responsáveis pela citotoxicidade e necrose tecidual e, em última análise, levam a patologias vasculares como é visto nas complicações diabéticas. Adaptado de (Shcheglova, Makker et al. 2009).

Os AGEs são formados naturalmente no corpo humano e denominados análogos *in vivo* dos produtos da reação de Maillard do inglês *Maillard reaction products (MRPs)*. Os MRPs, descritos pela primeira vez pelo bioquímico francês C. Maillard no início do século XX, são formados por reações não enzimáticas de açúcares reativos e proteínas, conferindo aos alimentos, termicamente processados, sua cor, sabor e odor típicos (Vlassara, Brownlee et al. 1986, Pastoriza, Rufian-Henares et al. 2016, Mondaca-Navarro, Avila-Villa et al. 2017). Com exceção da via clássica de sua formação em condições hiperglicêmicas, existem caminhos alternativos eficazes de formação de AGEs sob estresse oxidativo e carbonílico utilizando aldeídos reativos formados durante a peroxidação lipídica e auto-oxidação da glicose (Nowotny, Jung et al. 2015). Inicialmente, os carbonilos são introduzidos por meio da reação de Amadori e podem ser retidos em vários adutos protéicos gerados na reação de Maillard subsequente. Posteriormente, a degradação desses adutos produz aldeídos de baixo peso molecular, dialdeídos e peptídeos glicosilados, que podem reagir novamente para modificar outras proteínas. Assim, o conceito de "estresse carbonílico" passou a ser um indício das patologias crônicas resultantes da glicação e oxidação (Soulis-Liparota, Cooper et al. 1991). Os AGEs estão relacionados ao envelhecimento patológico e em diferentes doenças não transmissíveis alterando a estrutura e a função das proteínas (Thorpe and Baynes 1996, Gurecka, Koborova et al. 2015).

Diversas vias de citotoxicidade são sugeridas pela variedade de receptores implicados na captação de AGE, incluindo o receptor de AGE (RAGE), receptor de macrófagos, galectina-3 e megalina (Smedsrod, Melkko et al. 1997, Saito, Nagai et al. 2003). Além da citotoxicidade direta, os AGEs podem induzir a apoptose interagindo com o seu receptor RAGE. A descoberta de receptores específicos de superfície celular para AGEs, o RAGE, possibilitou a caracterização de vias nocivas indiretas levando a um estresse oxidativo aumentado, efeitos pró-inflamatórios, diabetogênicos e aterogênicos (Bierhaus, Humpert et al. 2005, Ramasamy, Yan et al. 2009). O RAGE é um receptor de transdução de sinal da superfamília de imunoglobulinas que transduz os efeitos de múltiplos ligantes, incluindo AGEs, produtos de proteína de oxidação avançada, S100/calgranulinas, grupo de alta mobilidade box-1, peptídeo β -amilóide e fibrilas de folha beta (Yan, Ramasamy et al. 2010). As famílias ligantes de RAGE estão relacionadas a respostas fundamentais de estresse agudo e crônico. O RAGE transduz sinais estimulados por moléculas liberadas e ou reguladas em respostas inflamatórias (Bierhaus, Humpert et al. 2005, Ramasamy, Yan et al. 2009). A ativação de cascatas de transdução de sinal e fatores de transcrição, tais como fator nuclear-kB (NF-kB), a interação AGE-RAGE produz estresse oxidativo e aumento da expressão de citocinas inflamatórias (Yan, Ramasamy et al. 2009, Lv, Lv et al. 2016) que também estão descritas no processo de envelhecimento (Salmon, Richardson et al. 2010).

Recentemente, foi proposto que o RAGE desempenha um papel crucial de dano em processos celulares, tais como a neuroinflamação, a neurodegeneração, a excitotoxicidade e o estresse oxidativo (Tobon-Velasco, Cuevas et al. 2014, Hong, Shen et al. 2016, Lei, Zhu et al. 2016). O envolvimento de RAGE em processos fisiopatológicos tem sido demonstrado para várias doenças neurodegenerativas (Cai, Liu et al. 2016, Pugazhenthii, Qin et al. 2017, Rahimi, Aghabozorg Afjeh et al. 2018). Após os AGEs se ligarem ao RAGE, o estresse oxidativo é aumentado, então, a sua superexpressão produz ciclos viciosos que perpetuam o estresse oxidativo e contribuem para a neuroinflamação. Durante o processo de ligação, a transdução desencadeia mecanismos de oxidação através da formação de espécies reativas de oxigênio, seguida pela ativação das proteínas RAS p21 e MAP quinases, bem como pela regulação positiva do NF-kB, que ativa vários genes envolvidos na inflamação e estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas IL-1 α e IL-6 e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Vlassara 2001, Mene, Festuccia et al. 2003, Lu, He et al. 2004, Srikanth, Maczurek et al. 2011), incluindo a expressão de RAGE, para induzir uma ativação prolongada, sustentada e promover mecanismos de sinalização para danos celulares (Srikanth, Maczurek et al. 2011, Chen, Zhou et al. 2012, Tobon-Velasco, Cuevas et al. 2014).

Em síntese, considerada uma fonte exógena, uma dieta rica em açúcares e gorduras possui uma forte influência na formação de AGEs a partir da oxidação de açúcares ou lipídios. AGEs tem a capacidade de modificar a funcionalidade e a química de estruturas cerebrais, aumentando a perspectiva para o desenvolvimento de diversas doenças. Em paralelo à formação de algumas AGEs, ocorre a formação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e interações com receptores celulares, que como consequência promovem estresse oxidativo e a produção de citocinas inflamatórias (Fournet, Bonte et al. 2018).

O estresse oxidativo está presente no decorrer do envelhecimento e se caracteriza por ser um desequilíbrio entre os sistemas anti e pró-oxidantes, apresentando o aumento do número de compostos oxidantes em detrimento às defesas antioxidantes do organismo (Morcillo, Estrela et al. 1999, Sies 2015, Sies, Berndt et al. 2017). Tal desequilíbrio apresenta consequências deletérias para a célula, tais como a peroxidação lipídica, a oxidação e consequente inativação de proteínas e lesões oxidativas ao DNA, podendo levar à perda de função e morte celular (Droge 2002, Halliwell 2006, Gutteridge and Halliwell 2018). A oxidação lipídica é problemática em sistemas alimentares, onde a rancidez oxidativa causa perda nutricional e o desenvolvimento de compostos tóxicos e, na fisiologia humana, onde a oxidação de lipídios é um dos principais contribuintes para doenças como, por exemplo, a aterosclerose (Spickett and Pitt 2015). A oxidação lipídica prossegue através de um mecanismo de cadeia de radicais livres resultando em muitos produtos finais com a proeminência de aldeídos entre eles. Um dos aldeídos mais estudados é o malondialdeído (MDA) que, entre outras características, atua como um marcador de dano oxidativo em sistemas fisiológicos (Del Rio, Stewart et al. 2005). Existem numerosos métodos para medir o MDA, o método mais comum é através da reação de MDA com ácido tiobarbitúrico (TBA) para produzir um composto dimérico de cor rosa (Salih, Smith et al. 1987). As EROs e ERNs são radicais livres ou compostos que produzem radicais livres por interação com vários componentes celulares (Lichtenberg and Pinchuk 2015). O ensaio de Diacetato de 2', 7'-diclorodi-hidrofluoresceína (DCFH) é comumente utilizado para monitorar reações de radicais livres (RL), espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN). Após oxidação as espécies reativas presentes no meio oxidam o DCFH, produzindo o produto fluorescente 2',7'-diclofluoresceína (DCF) (LeBel and Bondy 1992, Laggner, Hermann et al. 2006).

Durante os processos metabólicos a formação de EROs ou de ERNs, atua como mediadora para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas (Tretter and Adam-Vizi 2005). Em proporções adequadas, sua produção possibilita a geração de trifosfato de adenosina (ATP) por meio da cadeia transportadora de elétrons, a regulação da sinalização

celular e a participação de mecanismos de defesa durante o processo inflamatório (Murphy 2009). A defesa do organismo contra o excesso destes agentes pró-oxidantes, que causam o estresse oxidativo, é garantida pela atuação de três enzimas principais: superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), sendo que cada uma possui seu respectivo mecanismo de reação. A SOD é responsável por converter o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, que é posteriormente convertido em compostos mais comuns e menos reativos, como água, por exemplo, pela ação da CAT e da GPx, que neutralizam o peróxido de hidrogênio (Halliwell 2007).

As EROs contribuem para o aumento de lesões e mutações mitocondriais, o que acabam interferindo, conseqüentemente, no processo de produção de energia e nas funções vitais da célula. Sabe-se também que as EROs são capazes de gerar danos nas moléculas de DNA e nas proteínas, além de destruírem as membranas por meio de reações com os ácidos graxos insaturados, promovendo uma série de reações de peroxidação lipídica e também proteica causando a destruição celular (Grimm, Hoehn et al. 2011). O estresse oxidativo está presente mais acentuadamente no processo de envelhecimento quando comparado ao indivíduo jovem (Salmon, Richardson et al. 2010).

Outro processo fisiopatológico envolvido no envelhecimento está relacionado ao *inflammaging*. Esta é uma das teorias mais recentes sobre o envelhecimento, está relacionada à resposta imune, e leva em consideração a ativação da inflamação crônica subclínica de baixo grau que ocorre com o envelhecimento. As pessoas que desfrutam de uma vida longa, especialmente centenária, parecem lidar com a inflamação crônica subclínica através de uma resposta anti-inflamatória, chamada, portanto, anti-*inflammaging* (Davinelli, Maes et al. 2016, Minciullo, Catalano et al. 2016, Prattichizzo, De Nigris et al. 2016). O *inflammaging* é um fator de risco muito significativo tanto para a morbidade e mortalidade na população idosa como para a maioria das doenças relacionadas com a idade que compartilham uma patogênese inflamatória. Este fenômeno é provocado por uma carga antigênica contínua e estresse (Franceschi, Bonafe et al. 2000, Franceschi and Campisi 2014). Estudos crescentes sugerem que uma comunicação bidirecional entre o cérebro e o sistema imunológico é crucial para manter a homeostase do sistema nervoso central (SNC). Um dos mais reconhecidos efeitos do envelhecimento cerebral é a desregulação do sistema imunológico como resultado da produção não controlada de EROs e de citocinas pró-inflamatórias (Esiri 2007, Davinelli, Maes et al. 2016).

No cérebro, a principal célula imunológica é a micloglia. Ela tem por atribuição conferir imunidade inata. Os astrócitos e oligodendrócitos também se encontram envolvidos na resposta

inflamatória neural (Tansey et al., 2007; Taylor et al., 2013). A microglia residente no cérebro saudável exibe um fenótipo de repouso sofrendo ativação quando submetida a tensões, como a invasão de patógenos, lesões ou o acúmulo de proteínas tóxicas, iniciando respostas imunes para estimular o reparo dos tecidos, fazendo a detoxificação de detritos e células apoptóticas. A atuação dessa célula promove a homeostase cerebral por meio da produção do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento tipo insulina-1 (IGF-1) e citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 10 (IL-10). No entanto, a persistência dos estímulos inflamatórios pode acarretar na superprodução de fatores neurotóxicos incluindo citocinas, quimiocinas e prostaglandinas. As citocinas pró-inflamatórias tais como fator de necrose tumoral-(TNF- α) e a IL-1 β , irão agir nos astrócitos, induzindo a resposta imune adaptativa, enquanto que as quimiocinas, como a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1/CCL2), atuam no recrutamento de células imunitárias adicionais aumentando o processo inflamatório e levando à redução da plasticidade sináptica e levando ao dano celular e consequente morte neuronal (Taylor, Main et al. 2013).

Contudo, o envelhecimento e as evidências dos efeitos prejudiciais dos maus hábitos alimentares e, principalmente, o aumento da ingestão de bebidas adoçadas com açúcar ricas em HFCS e xarope de cola, apontam a necessidade de haver maiores investigações relacionadas ao seu efeito comportamental e molecular no cérebro. Neste sentido a hipótese do presente estudo é a de que o consumo de refrigerante à base de xarope de cola pode desencadear danos de memória e moleculares no cérebro de animais jovens e envelhecidos diminuindo a qualidade de vida, principalmente no envelhecimento.

1.4 Justificativa

Com o aumento do consumo exacerbado dos refrigerantes à base de xarope de cola e xarope de milho rico em frutose, há um risco associado à obesidade e a síndrome metabólica que implicam no desenvolvimento de danos cognitivos na vida adulta e consequentemente redução da qualidade de vida no envelhecimento (Malik, Popkin et al. 2010, Otero-Losada, Mc Loughlin et al. 2013, Kang, Chung et al. 2016). Muitos estudos estão sendo realizados para identificação dos alimentos que podem desencadear danos cerebrais e alterações comportamentais, bem como, os fatores de risco para doenças associadas ao envelhecimento. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito comportamental e molecular do tratamento crônico com refrigerante à base de xarope de cola em ratos Wistar em processo de envelhecimento.

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Avaliar as alterações comportamentais, em parâmetros inflamatórios e estresse oxidativo em ratos Wistar machos com diretas idades e tratados com refrigerantes à base de xarope de cola e os mecanismos envolvidos no efeito desta bebida.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a memória de habituação através do teste de habituação ao campo aberto em ratos Wistar com 2, 8 e 14 meses de idade e tratados com refrigerantes à base de xarope de cola;
- Avaliar a memória espacial através do labirinto octogonal e labirinto em Y em ratos Wistar com 2, 8 e 14 meses de idade e tratados com refrigerantes à base de xarope de cola;
- Avaliar o efeito crônico da administração de refrigerante à base de xarope de cola na memória aversiva avaliada pela esQUIVA inibitória em ratos Wistar com 2, 8 e 14 meses de idade;
- Avaliar o efeito crônico da administração de refrigerante à base de xarope de cola no estresse oxidativo, através da avaliação dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e oxidação de DCFH na presença de espécies reativas do oxigênio em hipocampo de ratos Wistar com 2, 8 e 14 meses de idade;
- Avaliar o efeito crônico da administração de refrigerante à base de xarope de cola no estresse oxidativo por meio da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase em hipocampo e córtex frontal de ratos Wistar com 2, 8 e 14 meses de idade;
- Avaliar o efeito crônico da administração de refrigerante à base de xarope de cola nos níveis de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10) em hipocampo e córtex frontal de ratos Wistar com 2, 8 e 14 meses de idade;
- Avaliar o efeito crônico da administração de refrigerante à base de xarope de cola nos níveis glicêmicos no sangue de ratos Wistar com 2, 8 e 14 meses de idade;
- Avaliar o efeito crônico da administração de refrigerante à base de xarope de cola no ganho de peso corporal de ratos Wistar com 2, 8 e 14 meses de idade.

3. Materiais e Métodos

3.1. Desenho experimental

Neste estudo foram utilizados ratos *Wistar* machos com 2, 8 e 14 meses de idade procedentes do biotério da UNESC pesando aproximadamente 250 a 300g, sendo que as idades de 8 e 14 meses, correspondem, aproximadamente, as idades de 24 e 42 anos em humanos (Sengupta 2013). Os ratos ficaram abrigados em 5 por caixa com acesso a alimento e água *ad libitum* e foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas (06:00 às 18:00) e temperatura de $23 \pm 1^\circ$ C. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, sob protocolo 042/2015-02.

3.2. Tratamento crônico

O efeito comportamental e molecular da administração crônica de refrigerante à base de xarope de cola (Coca-cola[®] Indústrias Ltda) foi avaliado em ratos *Wistar* machos adultos com idade de 2, 8 e 14 meses. Para isso os animais foram divididos em dois grupos experimentais dentro de cada idade, sendo o grupo 1 controle que receberam somente água *ad libitum* e, o grupo 2 Refrigerante que receberam água e refrigerante à base de xarope de cola *ad libitum*.

O experimento foi dividido em 3 etapas de acordo com as idades de 2, 8 e 14 meses respectivamente:

Etapa 1: Animais com idade de 2 meses. Foram utilizados 15 animais por grupo experimental para avaliação comportamental. Os animais receberam tratamento de 67 dias. Os animais foram submetidos aos testes comportamentais do Labirinto Octogonal (do 57º ao 61º dia), do Labirinto em Y (no 64º dia), da Habituação ao Campo Aberto (no 65º e 66º dias) e da Esquiva Inibitória (no 67º e 68º dias). No 68º, após o término do teste comportamental, os animais foram decapitados na guilhotina para retirada do hipocampo e córtex frontal para as análises bioquímicas de estresse oxidativo e níveis de citocinas. O sangue foi coletado para a análise dos níveis glicêmicos.

Etapa 2: Animais com idade de 8 meses. Foram utilizados 15 animais por grupo experimental para avaliação comportamental. Os animais receberam tratamento durante 67 dias. Os animais foram submetidos aos testes comportamentais do Labirinto Octogonal (do 57º ao 61º dia), do Labirinto em Y (no 64º dia), da Habituação ao Campo Aberto (no 65º e 66º dias) e da Esquiva Inibitória (no 67º e 68º dias). No 68º, após o término do teste comportamental, os animais foram decapitados na guilhotina para retirada do hipocampo e córtex frontal para as análises

bioquímicas de estresse oxidativo e níveis de citocinas. O sangue foi coletado para a análise dos níveis glicêmicos.

Etapa 3: Animais com idade de 14 meses. Foram utilizados 15 animais por grupo experimental para avaliação comportamental. Os animais receberam tratamento de 67 dias. Os animais foram submetidos aos testes comportamentais do Labirinto Octogonal (do 57º ao 61º dia), do Labirinto em Y (no 64º dia), da Habituação ao Campo Aberto (no 65º e 66º dias) e da Esquiva Inibitória (no 67º e 68º dias). No 68º, após o término do teste comportamental, os animais foram decapitados na guilhotina para retirada do hipocampo e córtex frontal para as análises bioquímicas de estresse oxidativo e níveis de citocinas.

O desenho experimental da etapa 1, 2 e 3 pode ser observado, resumidamente, na figura 3:

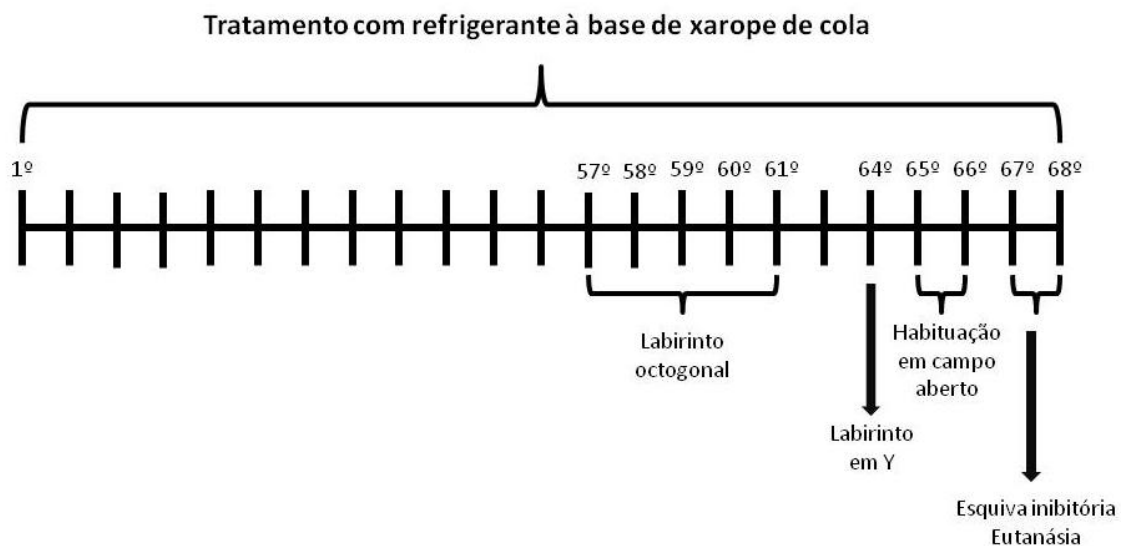


Figura 1: Desenho experimental. Fonte: do autor, 2019.

3.3 Avaliação do peso corporal

Um dia antes de iniciar a mudança da dieta os animais foram randomizados e pesados, pesando entre 340g à 450g. Após o início do tratamento os animais foram pesados quinzenalmente até a última semana de experimento.

3.4 Avaliação da ingestão de água e refrigerante

Os animais do grupo refrigerante receberam diariamente uma garrafa de água e uma de refrigerante à base de xarope de cola. Enquanto o grupo controle recebeu, diariamente, apenas a garrafa de água. Para os dois grupos foram fornecidas bebidas *ad libitum*. Foi medido 900ml de refrigerante ou água em uma proveta e disposto nas garrafas para os animais. As medidas foram realizadas em três momentos no decorrer do experimento, no 1º, 30º e 67º dias. Para a

medição, após 24 horas disponíveis para os animais as garrafas foram retiradas das gaiolas e o restante de líquido foi aferido utilizando uma proveta para realizar a média de ingestão de água e refrigerante por gaiola em um dia.

3.5 Testes comportamentais

3.5.1 Labirinto octogonal

Através deste teste comportamental foi avaliada a memória espacial de longo prazo através dos seguintes parâmetros: erros totais e o tempo total (latência) que obtiveram para encontrarem a recompensa nos 4 braços (Packard and White 1991). O animal foi colocado no aparato do labirinto octogonal, um aparato de 8 braços, numerados de 1 a 8 (48×12 cm), que se estende radialmente a partir de uma área central (32 cm de diâmetro). O aparelho foi colocado 50 cm acima do chão, e apresentou formas geométricas posicionadas na reta do braço onde foi colocada a comida. Estas pistas podem ser no final do braço. Dessa forma o animal foi colocado neste aparato durante 5 minutos no primeiro dia de teste apenas para se habituar ao aparato, após retornou a caixa moradia e foi colocado aproximadamente 2 *fruit loops* por animal para se habituarem a comida e depois ficará 22 horas sem ração. No segundo dia de teste o animal foi colocado novamente no aparato, porém, já tinha comida (*fruit loops*) em quatro dos oito braços do labirinto, nos braços em que tinha comida haviam pistas geométricas ao final dos braços. Foi anotado a entrada em cada braço, assim como, medido o tempo que cada animal demorou a encontrar os 4 *fruit loops*, assim que o animal encontrou as 4 recompensas foi retirado do aparato e retornou a caixa moradia. Após retornarem a caixa moradia, os animais receberam a ração do biotério e tiveram a ração durante 2 horas disponível para alimentarem-se, após foi colocado novamente 2 *fruit loops* por animal e a ração do biotério foi retirada, assim os ratos ficaram em jejum durante as 22 horas subsequentes. O mesmo foi realizado nos próximos 3 dias de teste. (Foyet, Hritcu et al. 2011, Hritcu, Cioanca et al. 2012).

3.5.2 Labirinto em Y

Esse teste é realizado para avaliar a memória de reconhecimento espacial de curto prazo e o aprendizado dos animais. O aparelho é feito de MDF preto e possui três braços iguais (50 x 10 x 20 cm, cada braço) afastados em 120° . Este foi colocado em uma sala escura com iluminação de lâmpada vermelha, para deixar os animais mais confortáveis para explorar (DEACON; RAWLINS, 2006) e com dicas visuais nas paredes do braço para facilitar a localização espacial dos animais. O protocolo consiste de duas sessões separadas por um intervalo de 2 horas. Na primeira sessão, o animal foi colocado no final de um dos braços,

chamado de braço de “partida”, e teve livre acesso para explorar o “outro braço” durante 5 min. Nesta sessão inicial, o terceiro braço do labirinto estava bloqueado por uma porta guilhotina. Após os 5 minutos os animais retornaram a caixa moradia. Depois de 2 horas, na segunda sessão, o animal foi novamente colocado no braço de “partida” do labirinto para explorar livremente os três braços durante 5 minutos, já com o braço que estava fechado anteriormente, chamado de braço “novo” disponível para exploração. O tempo de permanência em cada braço foi registrado, para avaliar a preferência dos animais por explorar o braço “novo” que não pôde ser explorado na primeira sessão (Figura 3) (DELLU et al., 2007).

3.5.3 Habituação ao campo aberto

Este teste comportamental tem por finalidade avaliar a memória de habituação. Foi realizado em um campo aberto de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 9 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Na sessão de treino, os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual explora livremente o ambiente por 5 minutos. A sessão de teste foi realizada 24 horas após o treino, na qual se repete o procedimento do treino. Os números de cruzamentos (Crossing) através das linhas pretas e o número de levantamentos (Rearings) foram avaliados em ambas as sessões (Vianna, Alonso et al. 2000).

3.5.4 Esquiva inibitória

Este teste comportamental possui o intuito de verificar a memória imediata, média e de longa duração. Consiste em uma caixa de acrílico na qual o piso é formado por barras paralelas de metal (1 mm de diâmetro). Os espaços entre as barras medem 1 cm. Uma plataforma com 7 cm de largura e 2,5 cm de comprimento é colocada junto à parede direita do aparelho. Na sessão de treino os animais foram colocados sobre a plataforma onde é medido o tempo que o animal levou para descer com as quatro patas da plataforma. Esse tempo é denominado latência. Imediatamente após descer da plataforma (com as 4 patas), o animal recebeu um choque de 0,4 Am durante 2 segundos. Na sessão de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e medido o tempo que ele levou para descer, porém, não foi administrado o choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória. Os intervalos entre o treino e o teste são de 5 segundo para avaliar memória imediata, 1 hora e meia para avaliar memória de média duração e de 24 horas para avaliar a memória de longa duração (Izquierdo, Izquierdo et al. 1998, Quevedo, Vianna et al. 1999).

3.6 Eutanásia

Após os testes comportamentais, no 68º dia de experimento, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação na guilhotina e estruturas cerebrais como hipocampo e córtex frontal serão dissecadas para posteriores análises imunológicas e o sangue foi coletado para a análise dos níveis de glicemia. Durante o procedimento de eutanásia, os animais ficaram mantidos em uma sala individualizada, a 21°C, com livre acesso à água e alimento.

3.7 Análises Bioquímicas

3.7.1 Processamento das amostras

Durante o procedimento de eutanásia, foram retiradas as estruturas cerebrais córtex frontal e hipocampo, acondicionadas em eppendorfs previamente identificados e congeladas imediatamente utilizando nitrogênio líquido. Ao final da eutanásia as amostras foram conservadas em freezer a temperatura -80°C.

3.7.2 Análise da glicemia

Um dia antes de iniciar a mudança da dieta foi aferido os níveis de glicemia de 6 animais de cada grupo. A verificação foi realizada semanalmente no mesmo horário, às 13 horas, até a última semana do experimento.

A concentração de glicose no sangue foi analisada com o glicômetro G-Tech (SD Biosensor Inc, Republic of Korea) e tiras G-Tech (SD Biosensor Inc, Republic of Korea). Logo após a análise comportamental, foi utilizado um lancetador para retirar uma gota de sangue da cauda dos animais. Esta gota de sangue foi inserida no espaço da fita e aguardado alguns segundos para registrar a glicemia que apareceu no visor do glicosímetro.

3.7.3 Mensuração de parâmetros de estresse oxidativo

Amostras de córtex frontal, hipocampo foram homogeneizadas. O estresse oxidativo foi avaliado pela quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), Oxidação de 2'7'diacetato de diclorofluoresceína (DCFH), atividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT).

Para determinação dos níveis de TBA-RS, a estrutura do hipocampo foi homogeneizada em tampão PBS gelado (pH 7,4). Logo após o homogeneizado foi precipitado por meio de uma reação ácida com ácido tricloroacético (TCA, Vetec®) a 10 % com sulfato de sódio adicionado ao sobrenadante na proporção 1:1 (v/v). Após centrifugação, o sobrenadante foi tratado com ácido tiobarbitúrico (TBA, Sigma-Aldrich® St. Louis, MO, EUA) 0,67 % na proporção de

1:1(v/v). A mistura foi levada a um banho fervente durante 2 horas e, após, resfriada em água à temperatura ambiente. A absorvância obtida através da coloração rósea resultante foi medida em espectrofotômetro a 532 nm. Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração com 1,1,3,3- tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as amostras. Os resultados foram expressos como nmol de TBA-RS.mg de proteína-1 (Esterbauer and Cheeseman 1990).

A produção de espécies reativas em hipocampo de animais tratados ou não com refrigerante à base de xarope de cola, foi determinada de acordo com o método de LeBel (1992), utilizando-se o diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCF-DA) (LeBel and Bondy 1992). Às alíquotas de amostras (80µg de proteína) previamente homogeneizadas, adicionou-se a forma diacetato do DCF, a qual é permeável à membrana celular, e essas alíquotas foram incubadas durante 30 min a 37 °C. No meio intracelular, esterases clivam o grupamento acetato do DCF-DA, gerando a forma reduzida DCFH. As espécies reativas presentes no meio oxidam o DCFH, produzindo o produto fluorescente 2',7'-diclofluoresceína (DCF). A fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de 480 (excitação) e 535 nm (emissão). A curva de calibração foi realizada utilizando-se DCF padrão (0-10 µM) e os resultados estão expressos como pmol de DCF.mg de proteína⁻¹.

Atividade da SOD nas estruturas cerebrais do hipocampo e do córtex frontal, foi avaliada através do método para o ensaio de atividade de superóxido dismutase (SOD) que se baseia na capacidade de auto-oxidação de pirogalol, um processo altamente dependente de O₂⁻²; um substrato para a SOD (Bannister and Calabrese 1987). Inicialmente, foram realizadas leituras da auto-oxidação da adrenalina. Após, foram adicionados à amostra CAT 10 mM, tampão glicina 50 mM e adrenalina 60 mM, e ao branco foi adicionada adrenalina 60 mM. A atividade enzimática foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente em 480 nm à temperatura ambiente. A atividade da enzima foi expressa em U.mg de proteína-1 (unidade de atividade da SOD por mg de proteína).

Esta atividade enzimática da catalase em cérebro total foi determinada através do método de Aebi (Aebi 1984). À amostra previamente homogeneizada, foi adicionado Triton 0,1 % seguido de agitação. Esta mistura foi conservada em gelo durante 15 minutos. Ao tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, foi adicionado H₂O₂ 30% (v/v). Este meio foi colocado em placa UV e o aparelho estabilizado contra um branco corrido separadamente de tampão fosfato. Após adição da amostra, foi realizada a leitura da queda da absorvância do H₂O₂ a 240nm, à temperatura ambiente, durante 5 minutos com leitura de 40 em 40 segundos. Para o cálculo, utilizou-se o coeficiente de extinção do H₂O₂ de 43,6 mM-1cm-1. Os resultados da atividade

enzimática estão expressos em U.mg de proteína-1 (unidade de atividade da CAT por mg de proteína).

As dosagens de Proteínas foram determinadas pelo método de Lowry (Lowry, Rosebrough et al. 1951) e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

3.7.4 Análise dos níveis de citocinas

Amostras de córtex frontal e hipocampo foram homogeneizadas em tampão fosfato. Os níveis de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) foram quantificadas por kits de imunoenensaio enzimático (ELISA) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), conforme as recomendações do fabricante, descritas a seguir. As placas de microtitulação (96 poços de fundo plano) foram incubadas durante a noite com o anticorpo de captura. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com tampão fosfato de lavagem, e em seguida, foram bloqueadas com uma solução de tampão fosfato com albumina 1% durante 1 hora. Após, foram incubadas as amostras homogeneizadas e a curva padrão, diluídas em solução tampão, durante 2 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e, em seguida, incubadas com anticorpo de detecção por mais 2 horas. Depois das lavagens, foi incubado uma peroxidase conjugada com estreptavidina por 20 minutos, e após o substrato (peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina, 1:1), e a reação foi finalizada pela adição de ácido sulfúrico 2N. As placas foram lidas à 450nm em espectrofotômetro. A proteína total foi mensurada de acordo com o método de Lowry (Lowry, Rosebrough et al. 1951), usando albumina de soro bovino como padrão.

3.8 Análise estatística

Os dados foram expressos por média \pm erro padrão da média ou mediana \pm intervalo interquartil (esquiva inibitória). A diferença entre os grupos para a glicemia, peso corporal, níveis de citocinas e estresse oxidativo foi avaliada pela análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Os dados do teste de habituação ao campo aberto e Y-maze foram avaliados pelo teste *T* de *Student* pareado. Os dados do labirinto octogonal foram avaliados por ANOVA de uma via de medidas repetidas e quando o valor de *F* foi significativo, foram realizadas comparações entre os grupos pelo teste *post hoc* de Duncan. O teste de esquiva inibitória foi avaliado pelo teste de Wilcoxon, já que os dados não possuíam distribuição normal. A significância estatística foi considerada para valores de *p* menores que 0,05.

4. Resultados

A figura 4 (A e B) apresenta os resultados da taxa glicêmica no sangue e do peso corporal de animais tratados ou não com refrigerante à base de xarope de cola com idades de 2, 8 e 14 meses. Para realizar a análise estatística foi aplicado a análise de variância (ANOVA) de uma via de medidas repetidas e o teste *post hoc* de Duncan foi realizado quando apropriado. A ANOVA de uma via de medidas repetidas revelou diferenças significativas para a glicemia [$F(10,78) = 5,26$; $p < 0,01$] e o peso [$F(10,170) = 41,06$; $p < 0,01$].

O teste *post hoc* de Duncan revelou, ao avaliar a taxa de glicemia no sangue (figura 4 A), que houve aumento da glicose no sangue dos animais com idade de 2 meses no grupo controle (água) no 30º dia e no 67º dia, e no grupo tratado com refrigerante à base de xarope de cola ao longo do 30º e 67º dia. Os animais com 8 e 14 meses não apresentaram aumento da taxa glicêmica no sangue tanto no grupo controle como no grupo tratado com refrigerante, durante todo o período avaliado.

Quando avaliado o valor do peso corporal (figura 4 B), de acordo com o teste *post hoc* de Duncan, foi observado que os animais com 2 meses de idade obtiveram ganho de peso tanto no grupo controle (água) no 30º dia e no 67º dia, como no grupo tratado com refrigerante à base de xarope de cola ao longo do 30º e 67º dia. Já os animais com 8 meses de idade apresentaram ganho de peso apenas no 67º dia tanto no grupo controle (água) como no tratado. Os animais com 14 meses não apresentaram ganho de peso em nenhum dos grupos avaliados.

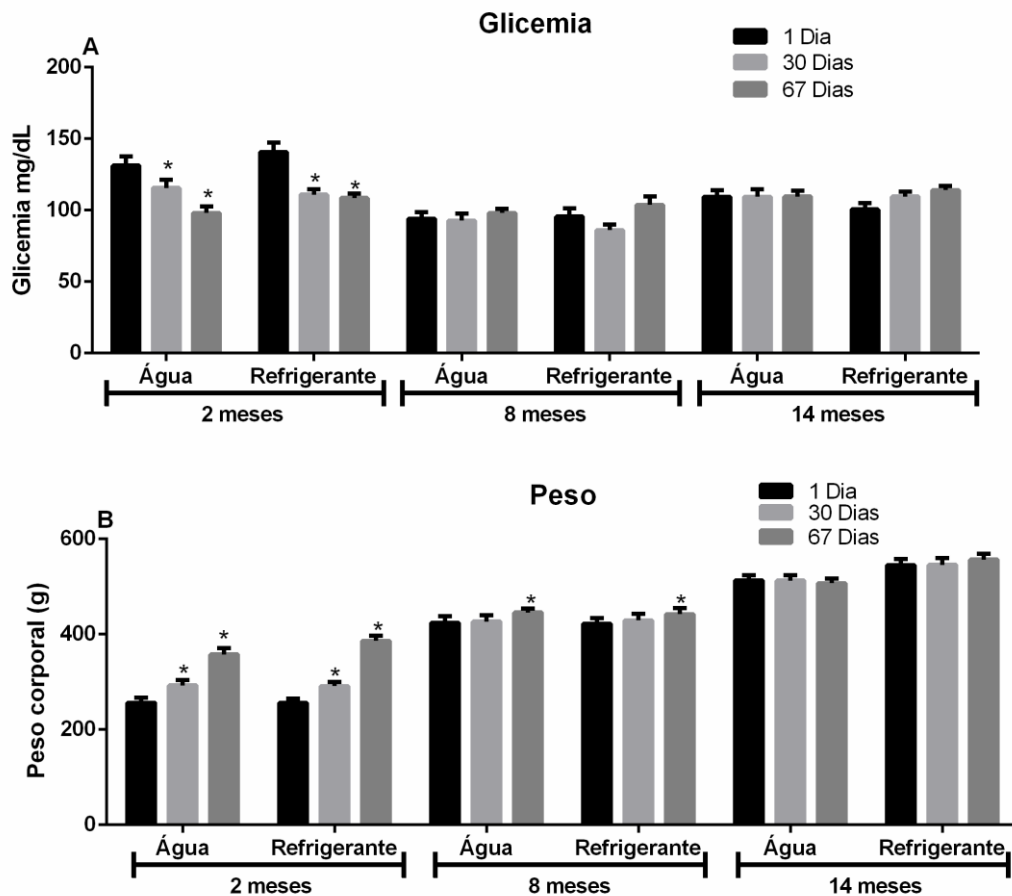


Figura 2 A e B: Efeito da administração crônica de refrigerante à base de xarope de cola durante 30 e 67 dias de tratamento em animais com 2, 8 e 14 meses de idade, nos valores de glicemia e peso. (A) valores referentes a glicemia $n= 5-10$ e (B) valores referentes ao peso corporal, com $n= 10-24$ animais por grupo experimental. Os dados foram expressos como média \pm EPM. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via de medidas repetidas e o teste *post hoc* de Duncan foi realizado quando apropriado. * $p<0,05$ quando comparado dentro do mesmo grupo experimental com o primeiro dia de teste.

A figura 5 (A e B) apresenta os resultados do labirinto octogonal de animais tratados ou não com refrigerante a base de cola e com idades de 2, 8 e 14 meses. A análise de variância (ANOVA) de uma via de medidas repetidas revelou diferença significativa na interação entre os grupos nas repetições em relação à latência (tempo) para encontrar a recompensa [$F(15,201) = 5,70$; $p < 0,001$] e os erros totais para encontrar a recompensa [$F(15,201) = 3,82$; $p < 0,001$].

O teste *post hoc* de Duncan revelou diferenças significativas quando observado o tempo (figura 5 A) para encontrar a recompensa nos grupos controles (água) nas idades de 2 e 8 meses. As diferenças foram significativas nos 2º, 3º e 4º dias de teste, dessa forma os animais demonstraram estar com a memória espacial conservada, pois a cada dia foram diminuindo o tempo para encontrar a comida. Já os animais com 2 meses de idade que foram submetidos a ingestão de refrigerante apresentaram dano de memória espacial, pois não diminuíram o tempo para encontrar a comida ao longo de todo o período de teste. Os animais de 8 meses tratados

com refrigerante diminuíram o tempo para encontrar a comida apenas nos dois últimos dias de teste. Na idade de 14 meses os animais controle (água) apresentaram dano de memória espacial, porém, os tratados com refrigerante foram capazes de diminuir o tempo para encontrar a comida no último dia de teste.

Quando avaliado o número de erros totais (figura 5 B) para encontrar a comida, o teste *post hoc* de Duncan apresentou diferença estatística entre os grupos. Os animais com 2 meses de idade não apresentaram dano de memória espacial, diminuindo o número de erros ao longo dos dias de teste, já o grupo que recebeu o tratamento com refrigerante apenas diminuiu o número de erros no último dia de teste. Os animais com 8 meses de idade apresentaram dano de memória espacial no grupo controle (água), já o grupo tratado com refrigerante foi capaz de reduzir esses erros no último dia de teste. Por fim, os animais controle (água) com idade de 14 meses não apresentaram dano de memória espacial quando avaliado o número total de erros para encontrar a comida, já os tratados com refrigerante não foram capazes de reduzir o número de erros ao longo dos dias de teste, demonstrando que o refrigerante pode ter causado danos de memória espacial nesses animais.

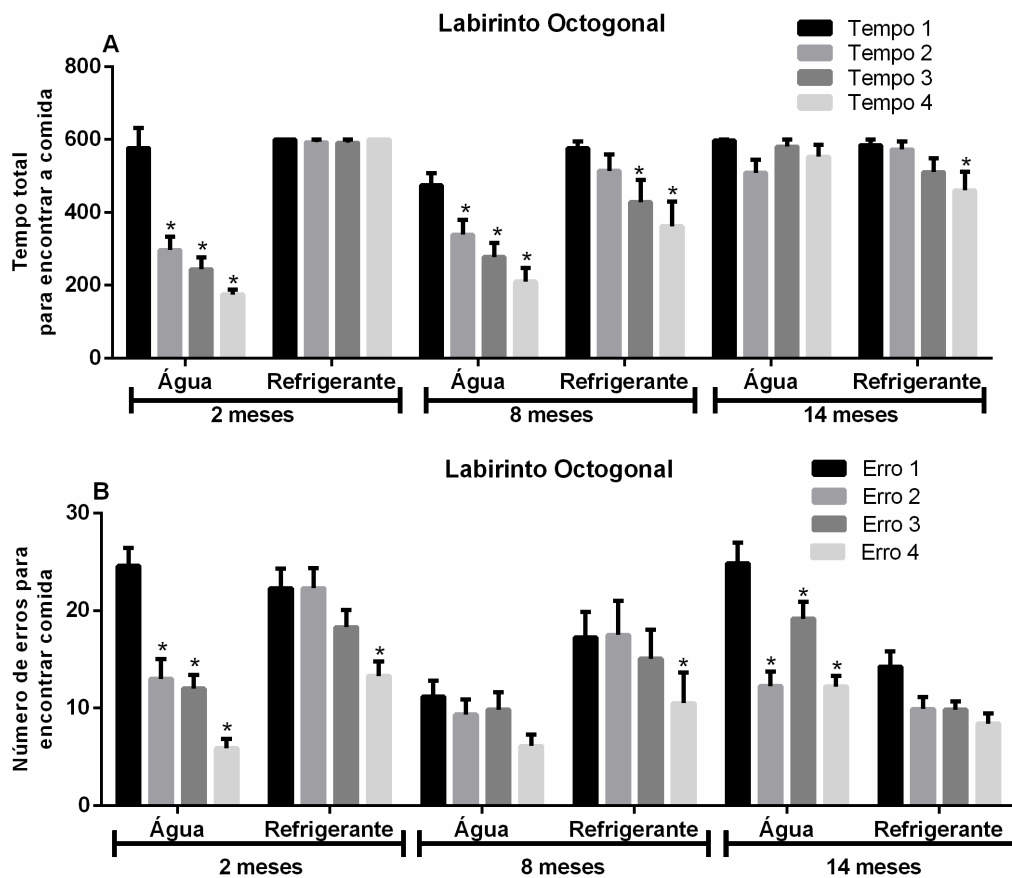


Figura 3 A e B: Efeito do tratamento com refrigerante à base de xarope de cola por 67 dias em animais com 2, 8 e 14 meses na memória espacial avaliada no teste do labirinto octogonal. (A) tempo para encontrar a recompensa e (B) número de erros para encontrar a recompensa no 1º, 2º, 3º e 4º dias de teste, com $n= 10-18$ animais por grupo experimental. Os dados foram expressos como média \pm EPM. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via de medidas repetidas e o teste *post hoc* de Duncan foi realizado quando apropriado. * $p<0,05$ quando comparado dentro do mesmo grupo experimental com o primeiro dia de teste.

A figura 6 apresenta os dados do labirinto em Y. Os mesmos foram analisados pelo teste *T* de *Student* para amostras dependentes quanto ao tempo de permanência entre os braços “outro” e “novo” para animais com 2, 8 ou 14 meses de idade submetidos ou não à administração de refrigerante à base de cola. Os animais controle com 2 [$t(12) = -3,88$; $p<0,05$] e 8 [$t(10) = 2,38$; $p<0,05$] meses de idade não apresentaram dano de memória espacial de curto prazo, permanecendo, os animais, por maior tempo no braço “novo” quando comparado ao “outro” braço, demonstrando que os animais souberam se localizar espacialmente e reconhecer qual era o braço novo. Já os animais com 14 meses de idade não apresentaram o mesmo desempenho mantendo exploração semelhante nos dois braços avaliados [$t(20) = 0,10$; $p=0,92$]. Entretanto, quando avaliado o tempo de permanência no braço “novo” desses animais com 2, 8 e 14 meses de idade que foram submetidos a administração de refrigerante, foi observado o dano de memória espacial, onde os mesmos mantiveram a exploração semelhante no “braço

novo” e no “outro braço”, para 2 [t(14) = -1,27, p=0,23] e 8 [t(10) = 0,97, p=0,36] meses, respectivamente, demonstrando não reconhecer o novo ambiente (braço novo). Os animais com 14 meses [t(21) = 2,2; p<0,05] apresentaram um dano ainda maior, permanecendo por muito mais tempo no “outro” braço durante o teste.

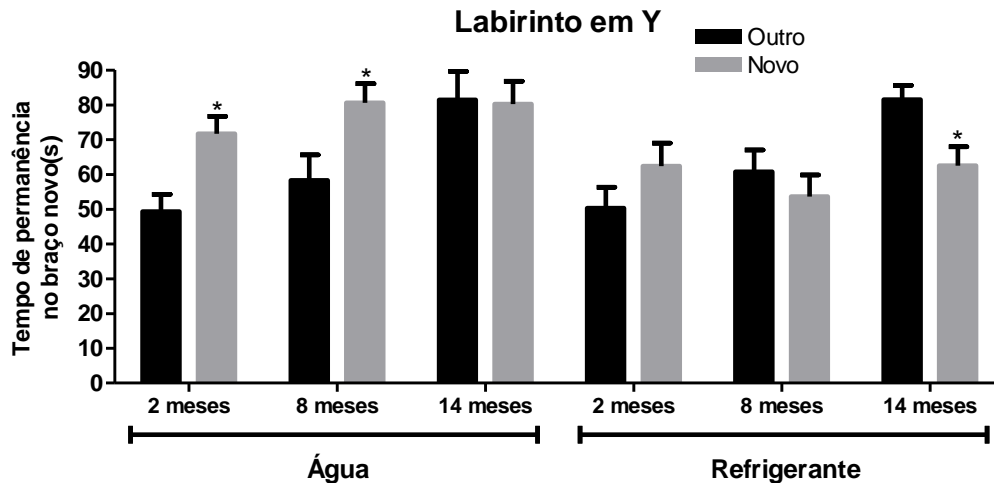


Figura 4: Efeito do tratamento com refrigerante a base de cola por 67 dias em animais com 2, 8 e 14 meses na memória espacial avaliada no teste do labirinto em Y em ratos Wistars machos com idades de 2, 8 e 14 meses. A figura mostra o tempo de exploração em segundos em cada braço do labirinto em Y: “outro” e “novo”. Os dados são expressos como média \pm EPM de 9-21 animais por grupo, *p<0,05 quando comparado com o “outro” braço.

Os dados do teste de habituação ao campo aberto foram analisados pelo teste *T* de *Student* para amostras dependentes. A figura 7 mostra os resultados da memória de habituação avaliada pelo teste de habituação ao campo aberto referentes ao número de cruzamentos (figura 7A) e levantamentos (figura 7B), entre as sessões treino e teste de animais com 2, 8 e 14 meses de idade.

Os animais do grupo controle água aprenderam no teste de habituação ao campo aberto quanto ao número de cruzamentos (2 [t(14) = 3,27, p<0,05], 8 [t(13) = 2,90, p<0,05] e 14 [t(22) = 6,81, p<0,05] meses) e número de levantamentos (2 [t(14) = 4,65, p<0,05], 8 [t(14) = 2,42, p<0,05] e 14 [t(22) = 6,51, p<0,05] meses). A ingestão de coca-cola induziu dano na memória de habituação para os animais de 2 e 8 meses para o número de cruzamentos (2 [t(13) = 2,02, p=0,06], 8 [t(11) = 0,63, p=0,54] meses) e número de levantamentos (2 [t(13) = 1,34, p=0,20], 8 [t(11) = 0,71, p=0,49] meses), exceto para os animais de 14 meses em que o refrigerante não causou dano (cruzamentos [t(21) = 4,33, p<0,05] e levantamentos [t(21) = 3,69, p<0,05]).

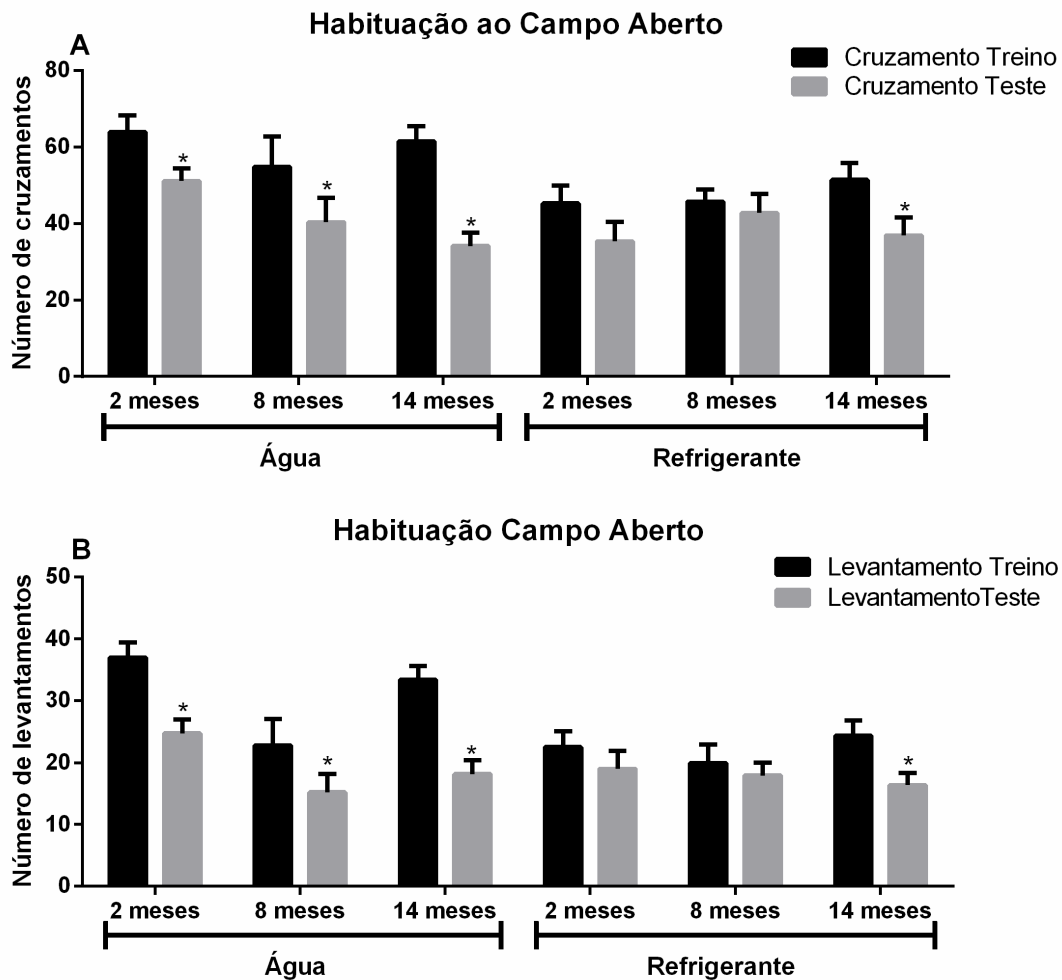


Figura 5 A e B: Efeito do tratamento com refrigerante a base de cola por 67 dias em animais com 2, 8 e 14 meses na memória de habituação avaliada no teste de habituação ao campo aberto em ratos Wistars machos com idades de 2, 8 e 14 meses. (A) apresenta o número de cruzamentos e (B) número de levantamentos avaliados na sessão treino e teste. Os dados foram expressos como média \pm EPM com $n = 12-23$ animais por grupo experimental. Foram considerados significativos os resultados que apresentaram $*p < 0,05$ quando comparados no mesmo grupo experimental entre a sessão teste e treino.

A figura 8 mostra o teste de esquiwa inibitória. Esse teste foi analisado pelo teste não paramétrico Wilcoxon. Os animais controle (água) com idade de 2 meses apresentaram dano de memória imediata ($p=0,37$), porém, demonstraram aprendizado nas memórias de curta e longa duração. O grupo de 2 meses tratado com refrigerante demonstrou aprendizado nas três memórias avaliadas. Os animais controle (água) e os tratados com refrigerante a base de cola com idades de 8 e 14 meses demonstraram aprendizado da memória imediata, de curta e de longa duração.

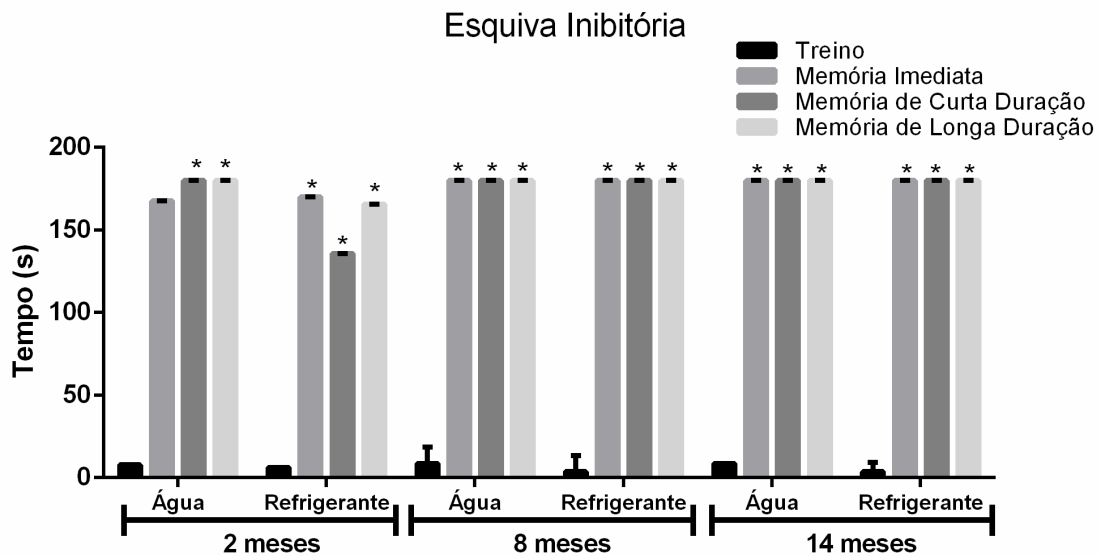


Figura 6: Efeito do tratamento com refrigerante à base de cola por 67 dias em ratos Wistar machos com idade de 2, 8 e 14 meses no teste de esquiva inibitória. A figura mostra a latência em segundos em que os animais levaram para descer da plataforma. 5 segundos após o treino os animais foram recolocados na plataforma para avaliar a memória mediata, 1,5 horas novamente para avaliar a memória de curta duração e 24 horas após o treino para avaliar a memória de longa duração. Os dados são expressos como mediana \pm intervalo interquartil de 9-23 animais por grupo e avaliados pelo teste de Wilcoxon. * $p < 0,05$ quando comparado com o treino.

Na figura 9 estão representados os dados obtidos da avaliação da CAT (figura 9A e 9B) e da SOD (figura 9C e 9D). A ANOVA de uma via mostrou diferenças significativas entre os grupos quando avaliada a atividade da CAT no córtex frontal [$F(5,22) = 2,92$; $p < 0,05$] (figura 9A) e no hipocampo [$F(5,22) = 7,99$; $p < 0,001$] (figura 9B). O teste *post hoc* de Duncan mostrou que no córtex frontal de animais com idade de 8 meses de idade, os controles (água) apresentaram atividade aumentada da CAT quando comparados ao grupo controle (água) de 2 meses de idade, e os animais com 8 meses de idade administrados com refrigerante apresentaram redução da atividade da CAT quando comparado ao grupo controle da mesma idade. Quando avaliada a atividade da CAT no hipocampo, o teste *post hoc* de Duncan mostrou que os animais com idade de 2 meses que receberam tratamento com refrigerante à base de cola, apresentaram atividade aumentada da CAT quando comparados ao controle (água) dentro da mesma idade. Quanto aos animais com 8 meses de idade, o grupo controle água apresentou atividade reduzida da CAT, quando comparado ao grupo controle de 2 meses. Os animais com 8 meses de idade tratados com refrigerante à base de xarope de cola, demonstraram atividade da CAT aumentada quando comparados ao grupo controle (água) de 8 meses.

Na figura 9C, a ANOVA de uma via demonstrou diferença estatística nos níveis da SOD no córtex frontal [$F(1,23) = 2,95$; $p < 0,05$]. O teste *post hoc* de Duncan mostrou que a SOD apresentou atividade aumentada nos animais controles (água) de 8 meses quando comparados aos controles de 2 meses. Os ratos com 8 meses de idade, que receberam refrigerante,

apresentaram a atividade reduzida da SOD, quando comparado o grupo controle água dentro da mesma idade. Ainda na estrutura do córtex frontal, foi observado que os animais com 14 meses de idade que receberam refrigerante apresentaram atividade reduzida da SOD quando comparados ao grupo controle (água) dentro da mesma idade. Já na estrutura do hipocampo a ANOVA de uma via mostrou que não teve diferenças significativas entre os grupos experimentais [$F(5,25) = 0,56; p=0,73$] (figura 9D).

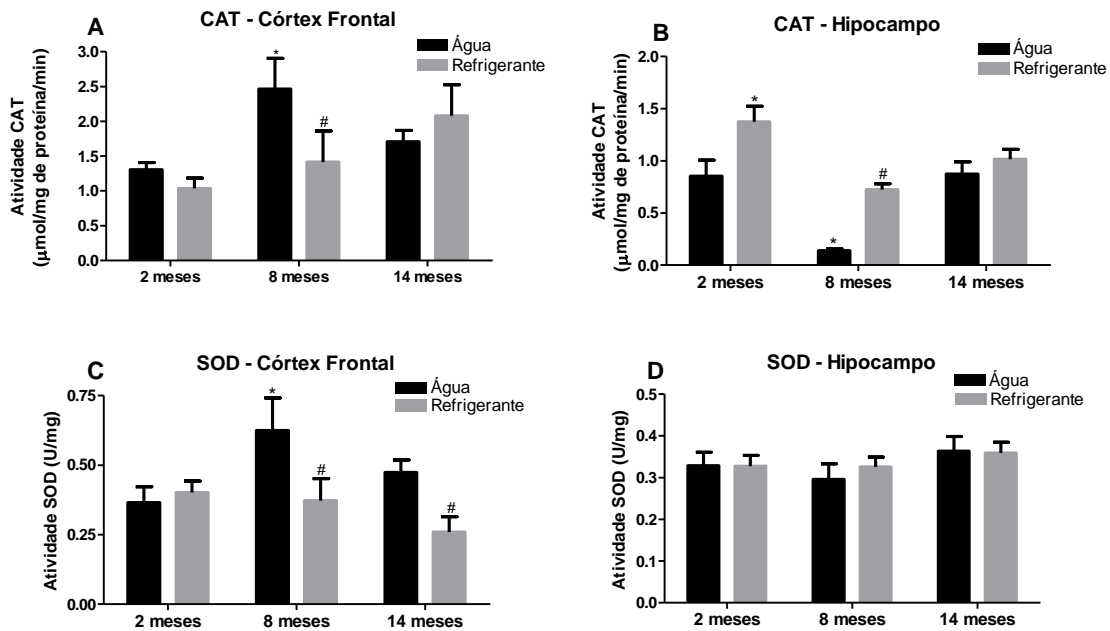


Figura 7 A, B, C e D: Efeito do tratamento com refrigerante à base de cola durante 67 dias em ratos Wistar machos com idade de 2, 8 e 14 meses nas atividades da CAT (A e B) e SOD (C e D) em estruturas cerebrais do córtex frontal (A e C) e hipocampo (B e D). Os dados são expressos como média \pm EPM de 3-6 animais por grupo. Os dados foram analisados pela ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. # $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle dentro da mesma idade e * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle (água) de 2 meses.

Na figura 10 (A e B) estão representados os resultados obtidos na avaliação da taxa de produção de radicais livres (RL) pela Diclorofluoresceína diacetato (DCFH) [$F(5,18) = 4,08; p < 0,05$] e a avaliação da peroxidação lipídica através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) [$F(5,20) = 7,03; p < 0,05$], respectivamente, na estrutura do hipocampo, de acordo com a análise de ANOVA de uma via.

A taxa de produção de RL por meio do DCFH (figura 10A) se mostrou aumentada nos animais de 2 meses administrados com refrigerante, nos animais com 8 meses controles (água) e no grupo tratado com refrigerante à base de xarope de cola e nos animais com 14 meses administrados com refrigerante quando comparados ao grupo controle (água) de 2 meses. Os animais com idade de 14 meses que receberam refrigerante à base de xarope de cola apresentaram taxa aumentada de RL quando comparados ao grupo controle (água) de 14 meses.

Na avaliação da peroxidação lipídica através do TBARS (figura 10B), foi observado o aumento dos níveis do mesmo, nos animais com idade de 2 meses tratados com refrigerante à base de xarope de cola quando comparados ao grupo controle (água).

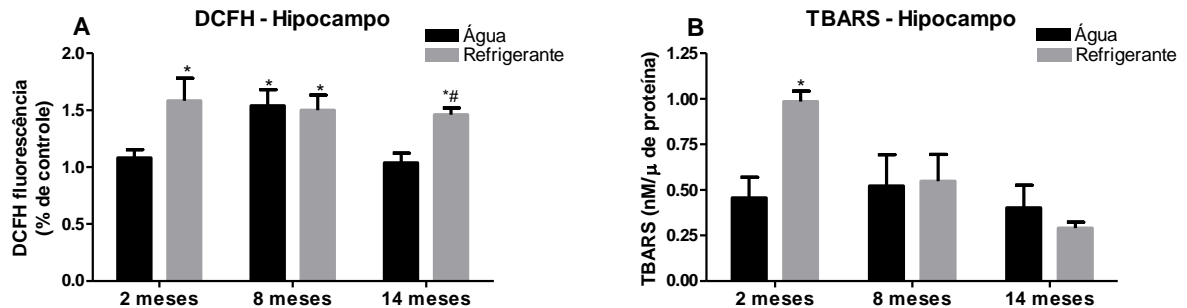


Figura 8 A e B: Efeito do tratamento com refrigerante à base de cola durante 67 dias em ratos Wistar machos com idade de 2, 8 e 14 meses nos níveis do DCFH (A) e TBARS (B) no hipocampo. Os dados são expressos como média \pm EPM de 3-6 animais por grupo. Os dados foram analisados pela ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle dentro da mesma idade e * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle (água) de 2 meses.

Para avaliação dos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IL-6, no córtex frontal e no hipocampo dos ratos tratados ou não com refrigerante à base de xarope de cola em diferentes idades, foi utilizada a ANOVA de uma via seguido pelo teste de *post hoc* de Duncan quando apropriado.

Na figura 11 (A e B) estão representados, respectivamente, os resultados dos níveis de TNF- α no córtex frontal e no hipocampo. A ANOVA de uma via revelou diferenças significativas para os níveis de TNF- α no córtex frontal (figura 11A) [F (5,20) = 2,99; $p < 0,05$] e hipocampo (figura 11 B) [F (5,23) = 5,85; $p < 0,05$].

O teste *post hoc* de Duncan mostrou que no córtex frontal, os níveis de TNF- α encontravam-se aumentados no grupo que ingeriu refrigerante na idade de 8 meses, quando comparados ao controle (água) de 8 meses (figura 11A).

No hipocampo (figura 11B), foi observado o aumento dos níveis de TNF- α nos animais com 8 meses de idade tratados com refrigerante, quando comparados ao controle (água) dentro da mesma idade. Ainda na idade de 8 meses, os animais controles (água) apresentaram níveis reduzidos dessa citocina quando comparados aos controles (água) de 2 meses de idade. Na idade de 14 meses, tanto os animais controles (água) quanto os animais que ingeriram refrigerante, apresentaram níveis reduzidos de TNF- α quando comparados aos animais controles com idade de 2 meses.

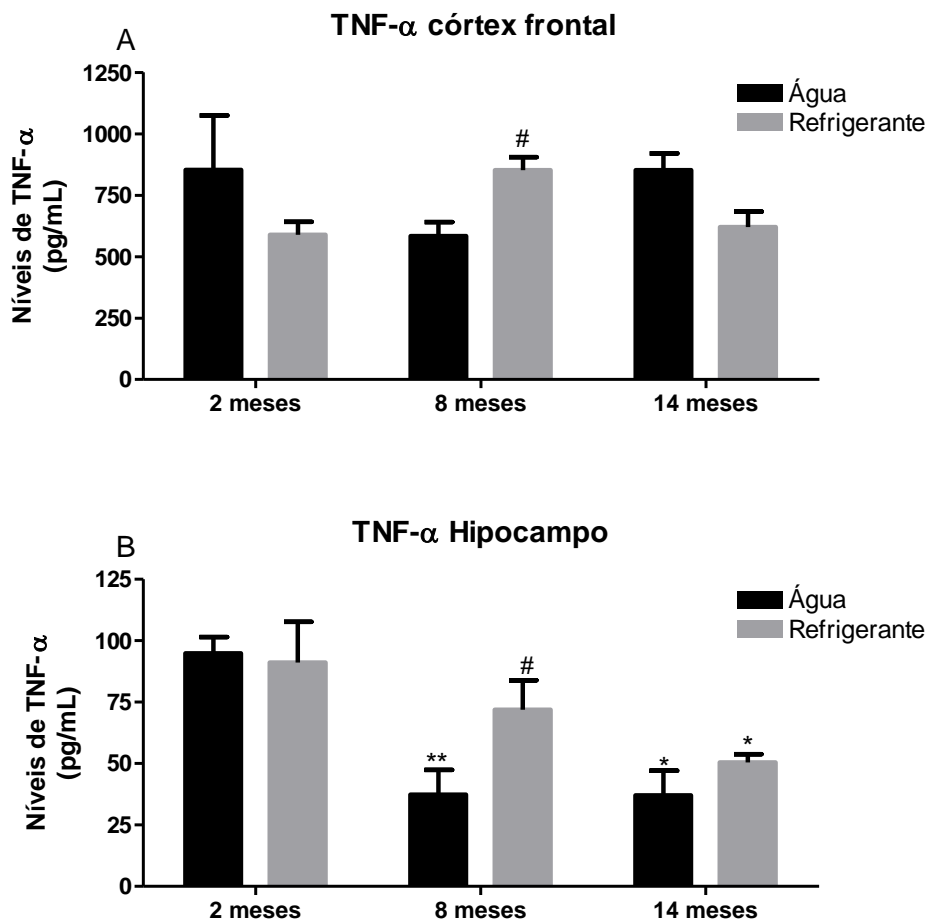


Figura 9 (A, B): Efeito do tratamento com refrigerante à base de cola durante 67 dias em ratos Wistar machos com idade de 2, 8 e 14 meses nos níveis de TNF- α no córtex frontal (A) e hipocampo (B). Os dados são expressos como média \pm EPM de 3-6 animais por grupo. Os dados foram analisados pela ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. [#] $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle dentro da mesma idade e ^{*} $p < 0,05$, ^{**} $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle (água) de 2 meses.

Na figura 12 (A e B) estão representados, respectivamente, os resultados dos níveis de IL-1 β no córtex frontal e no hipocampo. A ANOVA de uma via revelou diferenças significativas para os níveis de IL-1 β no hipocampo (figura 12B) [$F(5,25) = 3,33$; $p < 0,05$], já no córtex frontal (figura 12A), não foram observadas diferenças estatísticas [$F(5,18) = 1,14$; $p = 0,37$].

O teste *post hoc* de Duncan mostrou que no hipocampo (figura 12 B) os níveis de IL-1 β dos animais controles (água) com 8 meses de idade e, também, dos tratados com refrigerante, estavam diminuídos quando comparados ao controle (água) com 2 meses de idade. O mesmo padrão foi observado com os animais controles e tratados com refrigerante na idade de 14 meses.

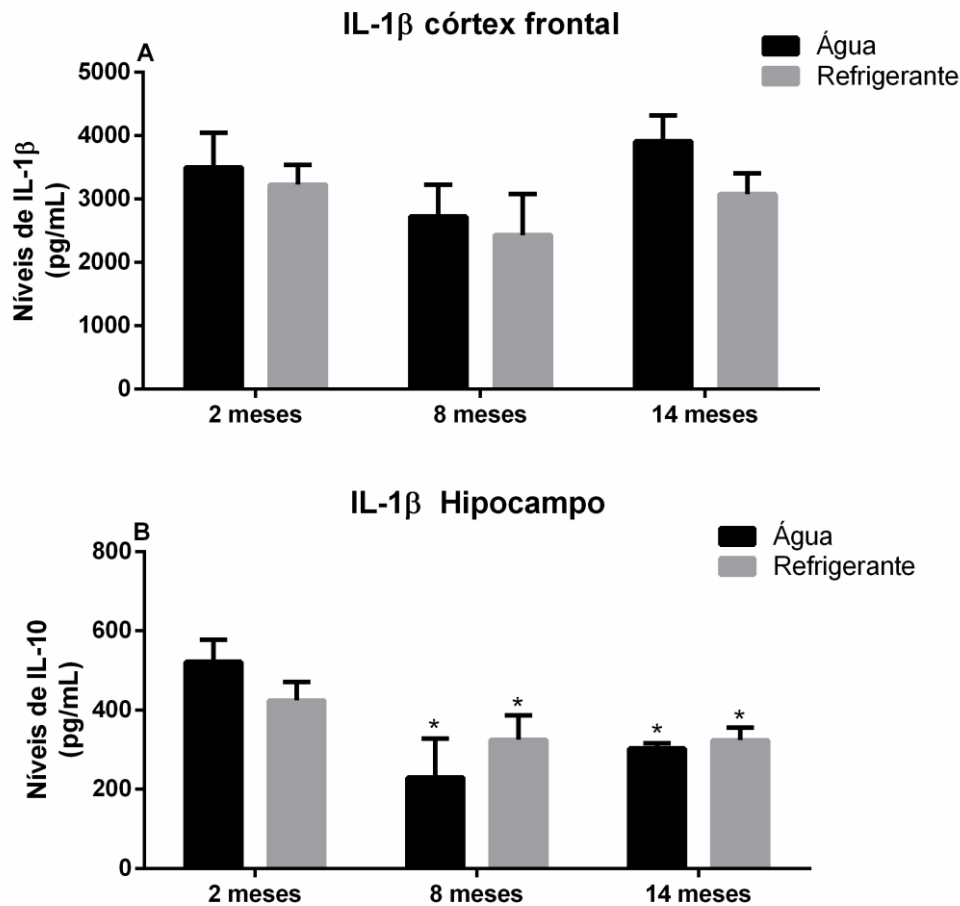


Figura 10 (A, B): Efeito do tratamento com refrigerante à base de cola durante 67 dias em ratos Wistar machos com idade de 2, 8 e 14 meses nos níveis de IL-1 β no Córtex frontal e hipocampo. Os dados são expressos como média \pm EPM de 3-6 animais por grupo. Os dados foram analisados pela ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle (água) de 2 meses.

Na figura 13 (A e B) estão representados, respectivamente, os resultados dos níveis de IL-6 no córtex frontal e no hipocampo. A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa para o hipocampo [$F(5,20) = 2,01$; $p = 0,12$], mas não para o córtex frontal [$F(5,22) = 3,43$; $p < 0,05$].

No hipocampo, o teste *post hoc* de Duncan mostrou que os animais controle (água) com 8 e 14 meses apresentaram redução dos níveis de IL-6 quando comparado ao grupo controle 2 meses.

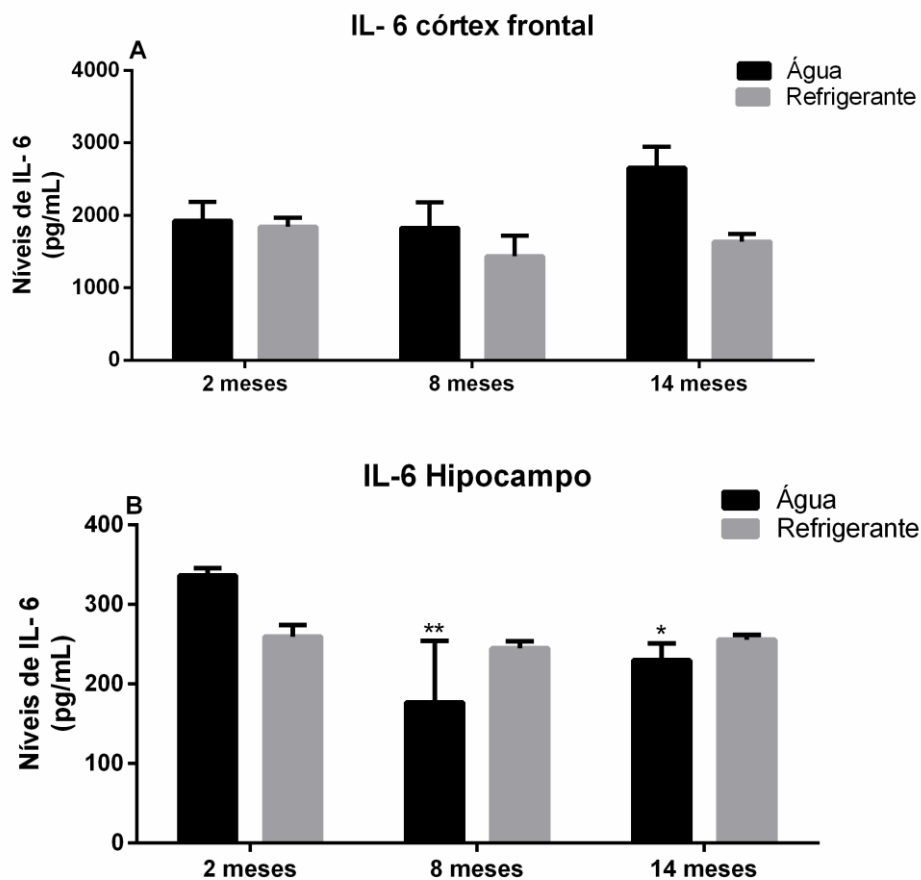


Figura 11 (A, B): Efeito do tratamento com refrigerante à base de cola durante 67 dias em ratos Wistar machos com idade de 2, 8 e 14 meses nos níveis de IL-6 no córtex frontal (A) e hipocampo (B). Os dados são expressos como média \pm EPM de 3-6 animais por grupo. Os dados foram analisados pela ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle (água) de 2 meses.

Na figura 14 (A e B) estão representados, respectivamente, os resultados dos níveis de IL-10 no córtex frontal e no hipocampo. A ANOVA de uma via revelou diferenças significativas para os níveis de IL-10 nas estruturas do córtex frontal [F (5,18) = 5,37; $p > 0,05$] e do hipocampo (figura 13 B) [F (5,18) = 5,75; $p < 0,05$].

Na estrutura do córtex frontal (figura 14A), o teste de *pos hoc* de Duncan revelou que os níveis de IL-10 nos animais tratados com refrigerante nas idades de 2, 8 e 14 meses, estavam diminuídos quando comparados aos animais controle (água) com 2 meses de idade. O grupo refrigerante, em todas as idades, apresentou redução dos níveis de IL-10 quando comparado também com cada um de seu respectivo grupo controle em cada idade.

No hipocampo (figura 14 B) foi observado que o refrigerante diminuiu os níveis de IL-10 nos animais com 2 meses de idade quando comparados ao grupo controle dentro da mesma idade. Na idade de 8 meses foi observado que os níveis de IL-10 estavam diminuídos nos animais controles (água) e nos tratados com refrigerante quando comparados ao controle

(água) de 2 meses de idade. Os animais com 14 meses de idade também apresentaram níveis diminuídos de IL-10 nos grupos controle (água) e tratado com refrigerante quando comparados ao grupo controle (água) com 2 meses de idade.

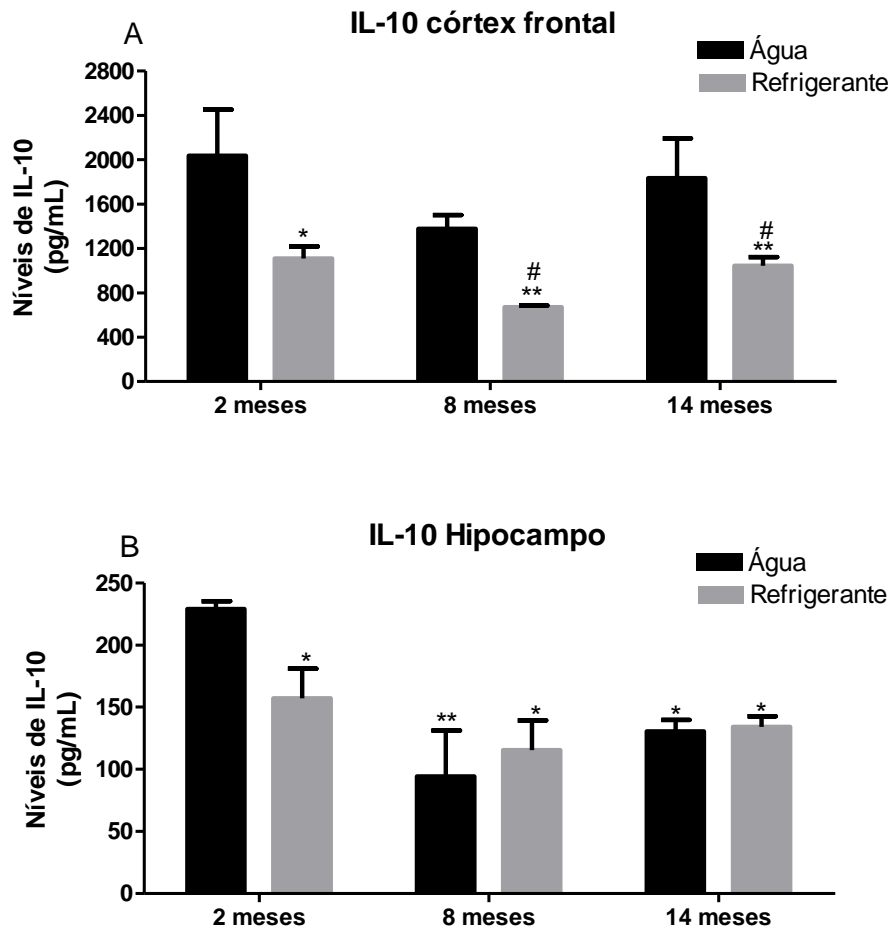


Figura 12 (A, B): Efeito do tratamento com refrigerante à base de cola durante 67 dias em ratos Wistar machos com idade de 2, 8 e 14 meses nos níveis de IL-10 no córtex frontal (A) e hipocampo (B). Os dados são expressos como média \pm EPM de 3-6 animais por grupo. Os dados foram analisados pela ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. # $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle dentro da mesma idade e * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle (água) de 2 meses.

5. Discussão

A ingestão total de energia na dieta, particularmente o consumo de açúcares simples, como a frutose, tem aumentado constantemente nas sociedades ocidentais, mas os efeitos de tais dietas sobre o cérebro são pouco compreendidos (Gross, Li et al. 2004, Everitt, Hilmer et al. 2006). O consumo excessivo de dietas ricas em açúcar refinado, por exemplo, não está apenas ligado ao aumento da taxa de obesidade em todo o mundo, mas tem sido associado ao declínio cognitivo, particularmente prejuízos na memória (Wong, Dogra et al. 2017). O cérebro dos mamíferos depende da glicose como sua principal fonte de energia. No cérebro adulto, os neurônios têm a maior demanda de energia, exigindo a entrega contínua de glicose pelo sangue (Howarth, Gleeson et al. 2012). Evidências indicam que aumentos relativamente modestos nas concentrações de glicose circulantes melhoram os processos de memória e aprendizagem em roedores e humanos (Gold 1995). Em contrapartida, uma dieta altamente calórica reduz a plasticidade sináptica do hipocampo e prejudica a função cognitiva (Farr, Yamada et al. 2008, Stranahan, Norman et al. 2008).

Nesse sentido, no presente estudo foram avaliados os efeitos da administração de refrigerante à base de xarope de cola nos processos de memória espacial, de habituação e aversiva, bem como nos parâmetros inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) e de estresse oxidativo (atividade de CAT e SOD, níveis de TBARS e taxa de oxidação de DCFH) em ratos *Wistar* machos com 2, 8 e 14 meses de idade.

A memória espacial, no presente estudo, foi investigada por meio dos testes do labirinto em Y e do labirinto octogonal com a presença de orientação espacial para o animal completar a tarefa (Dellu, Fauchey et al. 1997, Lee, Kho et al. 2014). Os animais que receberam refrigerante à base de xarope de cola com idades de 2, 8 e 14 meses, apresentaram prejuízo na memória espacial. O teste comportamental do labirinto octogonal ocorreu durante 5 dias, sendo o primeiro somente habituação, pois não há recompensa e os 4 seguintes como teste com a recompensa. Neste teste, o animal precisa consolidar, armazenar e recordar em qual braço estava a recompensa (cereal), além de não retornar onde já consumiu a mesma (Hritcu, Foyet et al. 2011, Hritcu, Cioanca et al. 2012, Lee, Kho et al. 2014).

No teste do labirinto octogonal foi observado que os animais tratados com refrigerante à base de xarope de cola não tiveram o mesmo desempenho quando comparados aos controles (água) dentro da mesma idade, demonstrando não diminuírem o tempo e/ou número de erros para encontrar a recompensa, mesmo quando conseguiram apresentar uma pequena diminuição desses fatores, os mesmos só ocorreram nos últimos dias do teste, e de maneira geral, de forma

inferior ao desempenho dos animais controles (água) dentro de cada idade (2, 8 e 14 meses), quando junta-se a análise dos tempos total para encontrar a recompensa e o número de erros para encontrar a recompensa. Um estudo realizado com ratos machos com 2 meses de idade que receberam dieta controle (frutose 0%) ou alta concentração de frutose (60%) durante 18 semanas, demonstrou que o grupo com dieta com alta concentração de frutose ao ser submetido ao teste do labirinto aquático de *Morris* na 19ª semana do experimento, apresentou prejuízo na retenção de memória espacial durante o teste que ocorreu 48 horas após o treino e um aumento no tempo de latência para encontrar a plataforma (Ross, Bartness et al. 2009). O estudo realizado por Budni et al. (2016) mostrou que ratos com 4 meses de idade que receberam via oral o açúcar de D-galactose (D-gal) (100mg/kg), após 4 e 6 semanas de tratamento apresentaram danos na memória espacial quando avaliados por meio do teste do labirinto octogonal (Budni, Pacheco et al. 2016). Outro estudo realizado com ratos machos Sprague–Dawley com 2 meses de idade tratados com frutose durante 8 semanas, mostrou que a frutose causou danos de memória espacial quando avaliados no teste do labirinto de Banner (Agrawal, Noble et al. 2016).

Em estudo realizado com ratos *Wistar* machos com idade de 21 e 56 dias que receberam uma solução preparada com 10% de sacarose diluída em água, concentração que se assemelha aos refrigerantes, durante 2 horas por dia por 28 dias, avaliou a memória espacial no teste do labirinto aquático de *Morris*. Os resultados desse estudo demonstraram que os grupos que receberam a solução de sacarose apresentaram prejuízo de memória espacial quando comparados aos controles e que os déficits de memória puderam ser observados até 6 semanas após o fim do tratamento com sacarose, indicando que o dano permanece após o término do tratamento (Kendig, Boakes et al. 2013). Outro estudo mostrou que ratos machos com idade de 30 e 60 dias que receberam uma solução contendo 11% de sacarose diluída em água, durante 30 dias *ad libitum* e submetidos ao teste do labirinto de Barnes, apresentaram uma latência aumentada para encontrar a caixa de fuga, o que demonstra um déficit na aprendizagem espacial apenas nos animais com 30 dias de idade quando comparados ao grupo controle dentro da mesma idade. Contudo, os animais com 60 dias de idade não apresentaram prejuízo significativo comparado ao grupo controle (Hsu, Konanur et al. 2015). Esses dados corroboram, em parte, com os achados do presente estudo, indicando que refrigerantes e soluções que mimetizam as fórmulas dos refrigerantes podem induzir, quando administrados cronicamente, danos na memória espacial, principalmente em idade mais jovem.

O teste comportamental do labirinto em Y, é um teste de reconhecimento para avaliar a memória espacial de curto prazo. Nesta tarefa, durante a primeira sessão, o animal pode

explorar apenas dois braços o de “partida” e o “outro”, com o terceiro braço “novo” bloqueado por uma porta guilhotina. Durante a sessão teste, a porta guilhotina é aberta e todos os três braços estão acessíveis. A discriminação da novidade *versus* familiaridade pode ser analisada comparando a exploração dos animais nos braços “novo e outro”. Uma vez que a tarefa se baseia na tendência natural dos roedores para explorar a novidade, a preferência pela novidade e a memória podem ser avaliadas pelo tempo de permanência entre esses dois braços durante a sessão de teste (Conrad, Lupien et al. 1997, Dellsu, Contarino et al. 2000, Martin, Jones et al. 2003).

No teste do labirinto em Y foi observado que os animais que receberam refrigerante à base de xarope de cola com 2, 8 e 14 meses de idade, apresentaram dano de memória espacial quando comparados aos controles dentro da mesma idade, caracterizando um dano de memória espacial nesses animais. Um estudo realizado com ratos *Wistar* com 4 meses de idade que ingeriram uma solução de 35% de sacarose diluídos em água *ad libitum* durante 9 semanas, mostrou por meio do teste do labirinto em Y que os animais tratados visitaram menos o braço “novo”, assim como passaram menos tempo no mesmo quando comparados aos animais controles (Soares, Prediger et al. 2013). Em outro estudo realizado com 45 ratos Sprague Dawley machos com 2 meses de idade que foram divididos em 3 grupos e alimentados *ad libitum* durante 52 semanas com uma dieta isenta de açúcar (grupo 1) outra que continha 7,9% de sacarose (grupo 2) ou outra que era constituída por 10% de mel (que é a quantidade equivalente de açúcar) (grupo 3), o teste do labirinto em Y mostrou que os animais alimentados com mel exibiram melhor desempenho na memória espacial reconhecendo o novo braço, como o braço não visitado do labirinto, em comparação com ratos que receberam dieta isenta de açúcar e a que continha 7,9% de sacarose (Chepulis, Starkey et al. 2009).

Ainda a respeito da memória espacial, um estudo que examinou o impacto de 2h de acesso diário a 10% de sacarose em ratos machos jovens em tarefas comportamentais, mostrou que os animais que receberam a sacarose apresentaram prejuízo de memória espacial ao serem avaliados por meio do teste do labirinto em T, que se assemelha ao labirinto em Y, indicando que dietas ricas em sacarose causam impacto nos processos espaciais e de memória de trabalho (Wong, Dogra et al. 2017). Estes dados corroboram, em parte, com os resultados apresentados no presente trabalho demonstrando que dietas ricas em açúcares podem causar prejuízo de memória espacial. Não foram encontrados na literatura dados relacionando à ingestão de refrigerante com danos de memória espacial avaliados através dos testes comportamentais de labirinto radial ou labirinto em Y. Dessa forma, os resultados do presente estudo indicam claramente e, pela primeira vez, no labirinto em Y e no labirinto radial, que

refrigerantes à base de xarope de cola, quando administrados cronicamente, induzem dano de memória espacial de curta (labirinto em Y) e de longa duração (labirinto radial) em animais jovens (2 meses) e em processo de envelhecimento (8 e 14 meses). Sugerindo então, que o consumo de refrigerantes associados ou não ao fator idade podem acarretar em dano cognitivo. Baseado nos dados do labirinto radial, parece que quanto mais jovens os animais, maior o dano na memória espacial de longo prazo.

Neste trabalho também foi avaliada a memória de habituação ao campo aberto de animais tratados ou não com refrigerante à base de xarope de cola. Para avaliar a memória de habituação foi realizado o teste de habituação ao campo aberto em animais com 2, 8 e 14 meses de idade. Este teste comportamental tem como objetivo avaliar a memória de habituação por meio de parâmetros, tais como, levantamentos e cruzamentos, que o animal realiza durante a exploração do aparato (Vianna, Alonso et al. 2000). Os dados obtidos pela avaliação de memória de habituação ao campo aberto mostraram que o refrigerante à base de xarope de cola causou danos na memória de habituação quando observados os números de cruzamentos e levantamentos em todas as idades. Um estudo realizado por Budni et al. (2016), já citado anteriormente, mostrou que ratos com 4 meses de idade que receberam por via oral D-gal (100mg/kg), após 4 e 6 semanas de tratamento, também apresentaram danos na memória de habituação avaliada pelo teste de habituação ao campo aberto. Indicando que a administração crônica do açúcar D-gal também causa danos nesse tipo de memória (Budni, Pacheco et al. 2016). Esses dados corroboram com os achados do presente estudo que sugerem que o consumo crônico de açúcares e refrigerantes podem produzir dano na memória de habituação. Contudo, da mesma forma que observado na memória espacial de longo prazo, o dano foi maior em idades mais jovens (2 e 8 meses), mas não em idades mais avançadas (14 meses).

É importante ressaltar que, assim como para os testes comportamentais do labirinto octogonal e do labirinto em Y, também não foram encontrados na literatura dados relacionando à ingestão de refrigerante e o teste comportamental de habituação ao campo aberto sendo, o presente estudo, pioneiro na avaliação da memória espacial e de habituação em animais que foram expostos ao tratamento crônico com refrigerante à base de xarope de cola em diferentes idades (2, 8 e 14 meses).

Além disso foi observado no teste comportamental de esquiva inibitória que os animais tratados com refrigerante à base de xarope de cola não apresentaram dano na retenção de memória aversiva em nenhuma das idades. Um estudo realizado por Ross (2008) obteve resultados semelhantes porém com animais que ingeriram 60% de frutose. Este estudo avaliou a aquisição de memória aversiva em ratos com 53 dias de idade que receberam uma dieta

contendo 60% de frutose na alimentação durante 18 semanas *ad libitum*. Durante a sessão treino o grupo que recebeu uma dieta rica em frutose não teve diferença de latência significativa quando comparado com o grupo controle. Durante o teste, realizado 48 horas após o treino, os animais administrados com frutose tiveram uma tendência a apresentar uma memória prejudicada. Contudo, estatisticamente o resultado não se mostrou significativo (Ross, 2008), indicando que dietas ricas em frutose parece não causar dano na memória aversiva. No caso do presente estudo, uma dieta rica com refrigerantes não causa danos na memória aversiva.

Um outro estudo fez uso de ratos com aproximadamente 65 dias de vida, separados em 13 grupos (tratamento + controle), foram submetidos ao teste de comportamento de esquiva inibitória. Após a saída do treino, foram administrados por via subcutânea dosagens de 3,2, 10, 32, 100, 320, ou 2000 mg/kg de glicose ou frutose. Os valores foram estabelecidos com intuito de descrever uma curva para valores de dano de memória causados por glicose e frutose. O teste decorreu 48 horas após o treino. Os animais que receberam as dosagens de 320 mg/kg de glicose e 320 mg/kg de frutose, apresentaram melhora significativa na aquisição de memória aversiva quando comparados ao grupo controle. Enquanto que os animais que receberam as doses de 10, 32, 100 e 2000 mg/kg dos dois açúcares, tiveram a aquisição da tarefa de reversão prejudicada e, as doses de 3,2 mg/kg de ambos os açúcares, não tiveram efeito significativo no desempenho dessa tarefa (Rodriguez, Horne et al. 1994). Estes dados indicam que diferentes valores de consumo tanto de glicose quanto de frutose podem contribuir ou prejudicar a memória aversiva. Estes dados, embora não sejam oriundos de mesmo tratamento e via de administração, corroboram, em parte, com os achados do presente estudo, onde a dieta utilizada não foi capaz de causar dano de memória aversiva demonstrando que os animais tratados obtiveram o mesmo desempenho na tarefa aversiva que os seus controles.

O alto consumo de bebidas açucaradas está associado ao aumento da taxa glicêmica no sangue e com a obesidade (Agrawal, Noble et al. 2016). Ao avaliar os níveis de glicemia no sangue dos animais, foi possível observar que não houve alteração significativa quando compara-se os valores do 1º dia, 30º dia e do 67º dia de tratamento. Assim como não houve alteração quando comparados os dois grupos (controle (água) *versus* grupo ingestão de refrigerante). Em um estudo realizado por Kendig et al. (2013), ratos com 21 e 56 dias de idade receberam uma solução preparada com 10% de sacarose diluída em água, durante 2 horas por dia por 28 dias. Os valores de glicemia revelaram que os animais mais novos tiveram uma tendência para leituras maiores em relação aos animais adultos. Entretanto, não houve resultado significativo quando comparado com os respectivos grupos controle (Kendig, Boakes et al. 2013). Outro estudo realizado com animais de 4 meses que receberam 35% de sacarose durante

9 semanas, mostrou que a ingestão de sacarose aumentou os valores da glicemia pós-prandial quando comparado com o grupo controle. Contudo, os valores de glicemia em jejum permaneceram inalterados comparados com o controle (Soares, Prediger et al. 2013). Estes dados corroboram com os dados do presente trabalho indicando que a administração crônica de açúcar proveniente do refrigerante não alteram os níveis glicêmicos em ratos. O que não indica que a administração por um tempo maior não poderia mudar estes valores.

Quando avaliado o peso corporal dos animais administrados ou não com refrigerante à base de xarope de cola, foi observado que os animais com 2 e 8 meses apresentaram aumento de peso quando comparado o 1º dia de tratamento com o 30º dia e o 67º dia em ambos os grupos, sugerindo que o refrigerante não foi o responsável pelo aumento de peso nesses animais. Os animais com idade de 14 meses não apresentaram aumento de peso em nenhum dos grupos durante o 1º dia, 30º dia e 67º dia. Esses resultados indicam que talvez seja necessário um tempo ainda maior de tratamento para que as alterações de peso possam ser melhor avaliadas. Em estudo realizado por Kending et al. (2013), citado anteriormente, as avaliações de peso revelaram que os animais mais novos ganharam mais peso quando comparados os animais mais velhos, porém, não houve resultado significativo quando comparado com os respectivos grupos controle (Kendig, Boakes et al. 2013). Outros estudos demonstraram que o consumo crônico de bebidas à base de xarope de cola causa alterações no perfil lipídico de ratos, o que inclui um aumento nos níveis plasmáticos de triglicerídeos. E, também nesses estudos, foram observadas a diminuição no consumo de alimentos sólidos, porém, sem haver alteração no peso corporal (Otero-Losada, Grana et al. 2011, Otero-Losada, Mc Loughlin et al. 2013).

Outro estudo foi realizado com ratos de 2 meses de idade que receberam *ad libitum* uma solução contendo 20% de frutose durante 8 meses. As avaliações de peso demonstraram que os animais com dieta rica em açúcar passaram a apresentar diferença significativa a partir do terceiro mês da alteração da dieta quando comparados com o grupo controle (Stranahan, Norman et al. 2008). Soares et al. (2013) avaliaram animais de 4 meses que receberam 35% de sacarose durante 9 semanas. Os resultados demonstraram que a ingestão de sacarose não teve influência nos valores de peso comparados ao grupo controle (Soares, Prediger et al. 2013). Baseado nos estudos acima, os resultados do presente trabalho levam a entender que a duração do tratamento (67 dias) não foi suficiente para que os ratos mostrarem uma diferença significativa nos valores de peso. Contudo, os achados indicam que os efeitos do consumo excessivo de açúcares podem produzir outros efeitos sistêmicos e centrais sem alterar a glicemia e o peso corporal (Stranahan, Norman et al. 2008, Ross, Bartness et al. 2009).

O estresse oxidativo está presente no decorrer do envelhecimento e é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de ERO e/ou ERN e as defesas antioxidantes teciduais (Betteridge 2000). As EROs e ERNs são radicais livres ou compostos que produzem radicais livres por interação com vários componentes celulares podendo causar danos celulares, levando ao prejuízo cognitivo e dano de memória (Lichtenberg and Pinchuk 2015). Dentre as defesas antioxidantes, destacam-se a enzima SOD que é responsável pela dismutação de ânions superóxido, a forma mais abundante de ERO, e a CAT, que neutraliza o peróxido de hidrogênio liberado nessa reação (Halliwell 2001, Halliwell 2006, Gutteridge and Halliwell 2018).

No presente estudo foi observado o aumento da atividade da CAT no hipocampo dos animais tratados com refrigerante à base de xarope de cola nas idades de 2 e atividade diminuída no controle 8 meses e ao mesmo tempo a ingestão de refrigerante induziu aumento da CAT em animais com 8 meses. No córtex frontal, foi observado aumento da atividade da CAT nos animais controle 8 meses e o refrigerante reduziu esta atividade. Quanto a atividade da SOD, foi observado que em animais com 8 e 14 meses a atividade desta enzima foi reduzida em animais que ingeriram o refrigerante. Em um estudo pré-clínico, ratos foram aleatoriamente designados para beber água, aspartame (240 mg/kg por via oral) e refrigerantes à base de cola (acesso livre), diariamente durante 2 meses. A ingestão subcrônica de aspartame e de refrigerante provocou a redução na atividade da SOD e da CAT no cérebro desses animais (Lebda, Sadek et al. 2017). Em estudo realizado por Amri et al. (2017), em ratos *Wistar* machos adultos, que receberam dieta com alto índice de gordura e frutose, mostrou a redução da atividade da SOD no tecido cerebral (Amri, Ghorbel et al. 2017). Outro estudo realizado com ratas jovens que receberam tratamento com frutose por 9 semanas, também mostrou redução da atividade da SOD no tecido adiposo visceral (Kovacevic, Nestorov et al. 2017). Estes dados corroboram os achados do presente estudo que também mostram a redução na atividade da SOD na estrutura do córtex frontal em animais com 8 e 14 meses.

Em outro estudo, realizado também com ratos *Wistar* machos com 3 meses de idade, foi observado que animais tratados com refrigerantes carbonatados (Coca-cola, Pepsi e 7-UP) durante 3 meses, apresentaram diminuição da expressão da CAT no tecido cerebral quando comparados aos animais controles (água) (El-Terras, Soliman et al. 2016). Estes resultados diferem, em parte, dos encontrados no presente estudo, onde a CAT apresentou atividade aumentada, no hipocampo, de animais com 2 e 8 meses que ingeriram refrigerante. No córtex frontal, os dados corroboram dados da literatura, onde o refrigerante induziu redução da atividade da CAT em animais com 8 meses. Entretanto, a avaliação foi realizada na estrutura do hipocampo, além do córtex frontal, enquanto que o estudo de El-Terras et al. (2016), avaliou

o tecido cerebral e, também, o tempo de tratamento foi maior (90 dias) quando comparado ao presente estudo (67 dias). Uma hipótese a ser considerada é a de que um dano tecidual pode ter contribuído para a expressão reduzida da CAT e conseqüente atividade reduzida no córtex frontal, porém, no hipocampo, este evento, pode vir a resultar em um aumento da atividade dessa enzima.

Um estudo realizado por Yang et al. (2018), investigou o efeito do extrato etanólico de sementes de gergelim preto (EESGP) contra a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) em camundongos alimentados com frutose. Os animais foram alimentados com uma dieta padrão, sem ou com 30% de frutose em água potável por 8 semanas consecutivas. Neste estudo foi observado que, no tecido hepático, a atividade da SOD e da CAT diminuíram em camundongos alimentados com frutose que não receberam o tratamento com EESGP (Yang, Wang et al. 2018). Em estudo realizado com ratos machos foi observada a diminuição da atividade da SOD e da CAT no fígado de animais com DHGNA que receberam dieta padrão com 30% de frutose durante 16 semanas quando comparados aos animais controles (Pai, Munshi et al. 2019). Muito embora esses estudos não tenham sido realizados com o uso do mesmo modelo animal e a mesma avaliação tecidual, corroboram, em parte, os dados do presente trabalho que mostrou alteração na atividade das enzimas CAT (redução no córtex frontal e aumento no hipocampo) e SOD (redução no córtex frontal) em animais que receberam refrigerante à base de xarope de cola *ad libitum*, que também é rico em frutose.

Um estudo realizado por Lopes et al. (2014), avaliou o efeito da administração aguda de frutose sobre o estresse oxidativo no córtex cerebral de ratos *Wistar* com 30 dias de idade. Os animais receberam injeção subcutânea de cloreto de sódio (0,9%) ou solução de frutose (5 $\mu\text{mol/g}$) e, uma hora após a administração, foram eutanasiados. Os achados desse estudo mostraram o aumento da atividade da SOD e a redução da atividade da CAT na estrutura do córtex cerebral (Lopes, Vilela et al. 2014). Estes resultados concordam, em parte, com o presente estudo, uma vez que a CAT foi reduzida no córtex, bem como a atividade da SOD foi reduzida nesta mesma estrutura, mas no hipocampo a CAT foi aumentada pela ingestão do refrigerante. Contudo, deve-se considerar que Lopes et al. (2014), realizou o tratamento um tratamento agudo com frutose, enquanto que o presente estudo fez uso de refrigerante à base de xarope de cola *ad libitum*, outra questão a ser relatada é em relação à idade dos animais que, no estudo de Lopes, foi de apenas 30 dias, enquanto que no presente estudo as idades variaram entre 2, 8 e 14 meses. De acordo com os dados, a idade de 8 meses foi a mais afetada quando se trata da alteração da atividade da SOD e CAT por ingestão de refrigerante, uma vez que suas atividades foram reduzidas no córtex frontal e a atividade da CAT foi aumentada no hipocampo.

Na idade de 2 meses somente a atividade da CAT foi aumentada no hipocampo e na idade de 14 meses a atividade da SOD foi reduzida no córtex frontal, explicando, em parte, os resultados do dano nas memórias espaciais e na memória de habituação induzida pelo refrigerante à base de cola.

Ainda, dentro da avaliação dos parâmetros oxidativos, os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a taxa de produção de radicais livres (RL) pela Diclorofluoresceína diacetato (DCFH), também foram verificados no presente estudo na estrutura do hipocampo em todas as idades. Foi observado que o refrigerante induziu, no hipocampo, aumento dos níveis de DCFH em todas as idades, exceto 8 meses, e induziu aumento dos níveis de TBARS em animais de 2 meses. Em estudo, anteriormente citado, realizado por Pai et al. (2019), mostrou aumento dos níveis de TBARS no tecido hepático dos animais tratados com frutose a 30%. Outro estudo administrou uma dieta de alta gordura e frutose a ratos *Wistar* machos albinos por 60 dias, essa dieta causou um aumento significativo da peroxidação lipídica no hipocampo e no plasma desses animais (Kalivarathan, Chandrasekaran et al. 2017). Um outro estudo também já citado, realizado por Budni et al. (2016), mostrou que ratos com 4 meses de idade que receberam via oral o açúcar de D-gal (100mg/kg), após 4 semanas de tratamento apresentaram aumento dos níveis de TBARS no córtex frontal e, durante todo o período de tratamento, no hipocampo (Budni, Pacheco et al. 2016). O aumento do TBARS e da taxa de produção de RL através da DCFH, também foram demonstrados no estudo realizado por Lopes et al. (2014), já citado anteriormente, ao avaliar o efeito da administração aguda de frutose sobre o estresse oxidativo no córtex cerebral de ratos *Wistar* com 30 dias de idade (Lopes, Vilela et al. 2014). Apesar de terem avaliado esses efeitos na estrutura do córtex cerebral e o presente estudo ter verificado apenas no hipocampo, ambos apresentaram aumento da peroxidação lipídica e da oxidação de DCFH na presença de EROs, sugerindo que a administração crônica ou aguda de grandes quantidades de frutose, como quem ingere refrigerante todos os dias, pode causar danos através do aumento das EROs.

Visto que a D-gal, assim como a frutose, também são açúcares que estão ligados à danos metabólicos, estes dados corroboram os achados do presente estudo, fortalecendo a hipótese de que uma dieta rica em açúcares pode causar danos oxidativos e também de memória. Contudo, observa-se que este dano se manteve somente em animais mais jovens, quando trata-se de níveis de TBARS, talvez porque os animais com 8 e 14 meses precisam de dose maior ou tempo maior de tratamento para induzir níveis aumentados de TBARS. Mas quando se avalia o DCFH, observa-se que o refrigerante causou dano em todas as idades, exceto nos animais de 8 meses

pois o controle, per se já apresenta dano alto. Novamente, o dano oxidativo causado pelo refrigerante à base de xarope de cola é maior em animais com 2 meses de idade.

A inflamação, grande parte mediada pelo sistema imune inato, é uma resposta fisiológica auto limitante que ocorre frente a um dano tecidual gerado por estímulos nocivos objetivando a remoção destes estímulos e o reparo dos danos. Tais estímulos podem ser ocasionados, por exemplo, por meio da alta produção de EROs (Kumar et al., 2013). Em resposta a esses estímulos, células imunes inatas, tais como macrófagos, produzem citocinas pró-inflamatórias que estimulam o recrutamento de neutrófilos ao local da lesão e aumentam a permeabilidade vascular (Wilfred de Alwis and Day 2007). O processo inflamatório no SNC é mediado pela ativação de astrócitos e microglia. Considerada uma fonte exógena, uma dieta rica em açúcares e gorduras possui uma forte influência no desenvolvimento de AGEs a partir da oxidação de açúcares ou lipídios. As AGEs têm a capacidade de modificar a funcionalidade e a química de estruturas cerebrais, aumentando a perspectiva para o desenvolvimento de diversas doenças. Concomitantemente à formação de algumas AGEs, ocorre a formação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e interações com receptores celulares, que como consequência promovem estresse oxidativo e a produção de citocinas inflamatórias (Fournet, Bonte et al. 2018). Como observado, nos resultados anteriores, o refrigerante à base de xarope de cola induziu estresse oxidativo, por diferentes mecanismos em diferentes idades, possivelmente mediado por AGEs, contudo, os níveis de AGEs não foram mensurados, mas é uma hipótese do trabalho de que muito provavelmente o refrigerante à base de xarope de cola administrado por 67 dias pode estar aumentando AGEs, causando estresse oxidativo e por fim alterando alguns ou muitos parâmetros inflamatórios.

Com este objetivo, no presente estudo foram avaliados os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e a anti-inflamatória IL-10 nas estruturas cerebrais do córtex frontal e hipocampo dos animais com 2, 8 e 14 meses de idade. Os níveis de TNF- α estavam aumentados no córtex frontal e hipocampo de animais com 8 meses de idade que ingeriram refrigerante quando comparados com os animais controles dentro da mesma idade. Os níveis de IL-1 β e IL-6 não apresentaram diferenças estatísticas em nenhum dos grupos avaliados quando comparados com o controle dentro da mesma idade. E, por fim, a IL-10 apresentou níveis diminuídos no córtex frontal de animais com 2, 8 e 14 meses de idade que ingeriram refrigerante. No hipocampo, os animais com idade de 2 meses que receberam tratamento com refrigerante também apresentaram os níveis reduzidos de IL-10.

Em tratamento agudo com frutose realizado por Lopes et al. (2014), já citado, os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 na estrutura do córtex cerebral de ratos

Wistar, não apresentaram alterações substanciais. No presente estudo os níveis de IL-6 e IL-1 β também não apresentaram diferenças estatísticas em comparação com o grupo controle em cada idade. Um estudo realizado com ratos machos Sprague–Dawley, avaliou os efeitos metabólicos da ingestão de sacarose e xarope de milho de alta frutose-55 (HFCS-55) durante a adolescência (com 30 dias de vida) ou a idade adulta (com 60 dias de vida). Ratos adolescentes ou machos adultos receberam durante 30 dias (I) sacarose a 11% solução, (II) solução de HFCS-55 a 11%, ou (III) uma garrafa extra de água (controle). Os níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, estavam aumentados no hipocampo dorsal no grupo adolescente HFCS-55 em relação aos controles e não apresentou efeito significativo no grupo sacarose, enquanto os níveis de interleucina IL-1 β e insulina plasmática estavam elevados em ambos os grupos de açúcares (HFCS-55 e sacarose) expostos aos adolescentes (Hsu, Konanur et al. 2015). Os resultados apresentados por Hsu et al. (2015), diferem dos achados no presente estudo que mostrou que não houve alteração nos níveis dessas interleucinas pró-inflamatórias no hipocampo e córtex frontal dos animais tratados com refrigerante à base de xarope de cola.

Outro estudo realizado com ratos machos Sprague-Dawley adultos, realizou o tratamento com água (controles); sacarose (23%); glicose (23%) ou frutose (23%) por 4 semanas. Os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 foram avaliados no sangue desses animais. O TNF- α mostrou níveis aumentados no soro dos animais que consumiram as soluções de sacarose ou frutose quando comparados aos animais controles (água). Os níveis de IL-1 β estavam diminuídos apenas nos animais tratados com glicose e, a IL-6, não apresentou alterações em nenhum dos grupos avaliados (van der Borgh, Kohnke et al. 2011). Há que se considerar que foram estudos que diferiram na espécie de animais utilizada e no tratamento proposto, bem como nas estruturas avaliadas, talvez isso possa explicar as diferenças nos resultados. É importante ressaltar que não foram encontrados na literatura trabalhos que tenham realizado a dosagem dessas citocinas em hipocampo e córtex frontal de animais tratados com refrigerante à base de xarope de cola.

Outro estudo administrou uma dieta de alta gordura e frutose a ratos *Wistar* machos albinos por 60 dias, essa dieta causou um aumento significativo nos níveis de TNF- α e IL-6 no plasma dos animais tratados quando comparados aos controles (água) (Kalivarathan, Chandrasekaran et al. 2017). Estes dados corroboram, em parte, o presente estudo onde os animais com 8 meses de idade também apresentaram níveis aumentados de TNF- α no córtex e hipocampo. Talvez essa diferença possa estar ligada à idade desses animais e as estruturas avaliadas que foram distintas em ambos os estudos.

No córtex frontal de animais com 2, 8 e 14 meses de idade, bem como no hipocampo de animais com 2 meses de idade, foi observado níveis reduzidos de IL-10 em animais que receberam refrigerante à base de cola, quando comparado ao grupo controle dentro de cada idade. Um estudo realizado com camundongos C57BL/6 que foram tratados com bebidas contendo álcool ou açúcares, mostrou que houve redução dos níveis séricos de IL-10 nesses animais. Esses resultados corroboram com os achados no presente estudo fortalecendo a hipótese de que uma dieta rica em açúcares, neste caso refrigerante, pode influenciar na regulação de parâmetros inflamatórios tanto a nível sérico, como cerebral. É importante salientar que na literatura não foram encontrados estudos iguais ou semelhantes que tenham avaliado os níveis de IL-10 no córtex ou hipocampo de ratos *Wistar* tratados com refrigerante à base de xarope de cola em diferentes idades.

O presente estudo mostra que o tratamento crônico com refrigerante à base de xarope de cola pode levar a danos de memória espacial e de habituação, bem como a aumento de parâmetros de estresse oxidativo e inflamatórios à nível molecular em estruturas cerebrais como o córtex frontal e o hipocampo, regiões essas envolvidas com o aprendizado e a memória.

6. Conclusão

Os resultados do presente estudo indicam que a ingestão de refrigerantes à base de xarope de cola, podem induzir, em animais com 2, 8 e 14 meses de idade, danos na memória espacial de curta e de longa duração, bem como, induzir prejuízos na memória de habituação, mas não dano à memória de habituação para animais com 14 meses. De acordo com os dados deste trabalho pode-se concluir que nos animais com 2 meses os danos nestas memórias podem ser explicados, pelo menos em parte, por aumento da atividade da CAT, dos níveis de DCFH e TBARS no hipocampo, bem como redução dos níveis de IL-10 no córtex frontal e hipocampo que induziram o estresse oxidativo e a inflamação. Nos animais de 8 meses, os danos nas memórias espaciais e de habituação podem ser explicados, parcialmente, pelo desbalanço das enzimas antioxidantes que apresentaram a redução da atividade da CAT e SOD no córtex frontal, aumento da atividade da CAT no hipocampo, aumento dos níveis de TNF- α no córtex frontal e hipocampo e redução dos níveis de IL-10 no córtex frontal. Nos animais de 14 meses os danos nas memórias espaciais de curta e de longa duração podem ter ocorrido, pelo menos em parte, em função da redução da atividade da SOD no córtex frontal, aumento dos níveis de DCFH no hipocampo e redução dos níveis de IL-10 no córtex frontal. É possível observar que a idade que foi mais susceptível ao dano induzido pelo refrigerante, foi a idade de 8 meses, seguido pela idade de 2 meses e por última a idade de 14 meses.

A tabela 1 apresenta, de forma resumida, o efeito do tratamento crônico com refrigerante à base de xarope de cola durante 67 dias nas memórias de habituação, espacial e aversiva, bem como nos níveis de estresse oxidativo por meio da avaliação do TBARS, DCFH, atividades das enzimas SOD e CAT e nos níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10, em estruturas cerebrais do córtex frontal e hipocampo de ratos *Wistars* nas idades de 2, 8 e 14 meses.

Idade e tratamento	Glic. e Peso		L. em Y	L. octogonal		M. de habituação		Esquiva inibitória			TNF- α		IL-1 β		IL-6		IL-10		CAT		SOD		DCFH	TBARS	
	G	P		T	E	N.C	N.L	I	C	L	C	H	C	H	C	H	C	H	C	H	C	H			H
2 MESES – ÁGUA	↓	↑	😊	😊	😊	😊	😊	⚡	😊	😊	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2 MESES – REFRIGERANTE	↓	↑	⚡	⚡	😊	⚡	⚡	😊	😊	😊	↓	—	—	—	—	—	↓	—	—	↑	—	—	↑	↑	
8 MESES – ÁGUA	—	↑	😊	😊	⚡	😊	😊	😊	😊	😊	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8 MESES – REFRIGERANTE	—	↑	⚡	😊	😊	⚡	⚡	😊	😊	😊	↑	↑	—	—	—	—	↓	—	↓	↑	↓	—	—	—	—
14 MESES – ÁGUA	—	—	⚡	⚡	😊	😊	😊	😊	😊	😊	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
14 MESES – REFRIGERANTE	—	—	⚡	😊	⚡	😊	😊	😊	😊	😊	—	—	—	—	—	—	↓	—	—	—	↓	—	↑	—	—

Tabela 1 😊= usado quando os grupos controle (água) ou tratado não apresentam dano de memória; ⚡= indica dano de memória; ↑= indica níveis aumentados de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, CAT, SOD, TBARS e DCFH, quando comparados ao grupo controle (água) dos animais de 2 meses e aumento dos níveis glicêmicos e de peso corporal quando comparados os dia 30 e 67 com o 1 dia do tratamento dentro da mesma idade; ↓= indica níveis diminuídos de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, CAT, SOD, TBARS e DCFH, quando comparados ao grupo controle (água) dos animais de 2 meses e aumento dos níveis glicêmicos e de peso corporal quando comparados os dia 30° e 67° com o 1° dia do tratamento dentro da mesma idade; **Glic.**= Glicemia; **L. em Y**= Labirinto em Y; **L. Octogonal**= Labirinto Octogonal; **M. de habituação**= memória de habituação; **N.C**= número de cruzamentos; **N.L**= número de levantamentos **C**= córtex frontal; **H**= hipocampo.

Referências

- Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro." Methods Enzymol **105**: 121-126.
- Agrawal, R., E. Noble, L. Vergnes, Z. Ying, K. Reue and F. Gomez-Pinilla (2016). "Dietary fructose aggravates the pathobiology of traumatic brain injury by influencing energy homeostasis and plasticity." J Cereb Blood Flow Metab **36**(5): 941-953.
- Amato, D., A. Maravilla, C. Montoya, O. Gaja, C. Revilla, R. Guerra and R. Paniagua (1998). "Acute effects of soft drink intake on calcium and phosphate metabolism in immature and adult rats." Rev Invest Clin **50**(3): 185-189.
- Amri, Z., A. Ghorbel, M. Turki, F. M. Akrouf, F. Ayadi, A. Elfeki and M. Hammami (2017). "Effect of pomegranate extracts on brain antioxidant markers and cholinesterase activity in high fat-high fructose diet induced obesity in rat model." BMC Complement Altern Med **17**(1): 339.
- Baddeley, A. (1998). "Recent developments in working memory." Curr Opin Neurobiol **8**(2): 234-238.
- Bannister, J. V. and L. Calabrese (1987). "Assays for superoxide dismutase." Methods Biochem Anal **32**: 279-312.
- Barquera, S., L. Hernandez-Barrera, M. L. Tolentino, J. Espinosa, S. W. Ng, J. A. Rivera and B. M. Popkin (2008). "Energy intake from beverages is increasing among Mexican adolescents and adults." J Nutr **138**(12): 2454-2461.
- Basu, S., M. McKee, G. Galea and D. Stuckler (2013). "Relationship of soft drink consumption to global overweight, obesity, and diabetes: a cross-national analysis of 75 countries." Am J Public Health **103**(11): 2071-2077.
- Betteridge, D. J. (2000). "What is oxidative stress?" Metabolism **49**(2 Suppl 1): 3-8.
- Bierhaus, A., P. M. Humpert, M. Morcos, T. Wendt, T. Chavakis, B. Arnold, D. M. Stern and P. P. Nawroth (2005). "Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products." J Mol Med (Berl) **83**(11): 876-886.
- Bishop, N. A., T. Lu and B. A. Yankner (2010). "Neural mechanisms of ageing and cognitive decline." Nature **464**(7288): 529-535.
- Bontempi, B., C. Laurent-Demir, C. Destrade and R. Jaffard (1999). "Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage." Nature **400**(6745): 671-675.
- Bruehl, H., V. Sweat, A. Tirsi, B. Shah and A. Convit (2011). "Obese Adolescents with Type 2 Diabetes Mellitus Have Hippocampal and Frontal Lobe Volume Reductions." Neurosci Med **2**(1): 34-42.
- Budni, J., R. Pacheco, S. da Silva, M. L. Garcez, F. Mina, T. Bellettini-Santos, J. de Medeiros, B. C. Voss, A. V. Steckert, S. Valvassori Sda and J. Quevedo (2016). "Oral administration of d-galactose induces cognitive impairments and oxidative damage in rats." Behav Brain Res **302**: 35-43.

- Burnet, F. M. (1974). "Intrinsic mutagenesis, an interpretation of the pathogenesis of xeroderma pigmentosum." Lancet **2**(7879): 495-498.
- Cai, Z., N. Liu, C. Wang, B. Qin, Y. Zhou, M. Xiao, L. Chang, L. J. Yan and B. Zhao (2016). "Role of RAGE in Alzheimer's Disease." Cell Mol Neurobiol **36**(4): 483-495.
- Cesari, M., B. Vellas and G. Gambassi (2013). "The stress of aging." Experimental Gerontology **48**(4): 451-456.
- Cheke, L. G., J. S. Simons and N. S. Clayton (2016). "Higher body mass index is associated with episodic memory deficits in young adults." Q J Exp Psychol (Hove) **69**(11): 2305-2316.
- Chen, C. H., W. Zhou, S. Liu, Y. Deng, F. Cai, M. Tone, Y. Tone, Y. Tong and W. Song (2012). "Increased NF-kappaB signalling up-regulates BACE1 expression and its therapeutic potential in Alzheimer's disease." Int J Neuropsychopharmacol **15**(1): 77-90.
- Chepulic, L. M., N. J. Starkey, J. R. Waas and P. C. Molan (2009). "The effects of long-term honey, sucrose or sugar-free diets on memory and anxiety in rats." Physiol Behav **97**(3-4): 359-368.
- Colchero, M. A., J. C. Salgado, M. Unar-Munguia, M. Hernandez-Avila and J. A. Rivera-Dommarco (2015). "Price elasticity of the demand for sugar sweetened beverages and soft drinks in Mexico." Econ Hum Biol **19**: 129-137.
- Conrad, C. D., S. J. Lupien, L. C. Thanasoulis and B. S. McEwen (1997). "The effects of type I and type II corticosteroid receptor agonists on exploratory behavior and spatial memory in the Y-maze." Brain Res **759**(1): 76-83.
- Corcoran, K. A. and G. J. Quirk (2007). "Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears." J Neurosci **27**(4): 840-844.
- Cristofalo, V. J., G. S. Gerhard and R. J. Pignolo (1994). "Molecular biology of aging." Surg Clin North Am **74**(1): 1-21.
- Davidson, T. L., K. Chan, L. E. Jarrard, S. E. Kanoski, D. J. Clegg and S. C. Benoit (2009). "Contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex to energy and body weight regulation." Hippocampus **19**(3): 235-252.
- Davidson, T. L., S. E. Kanoski, E. K. Walls and L. E. Jarrard (2005). "Memory inhibition and energy regulation." Physiol Behav **86**(5): 731-746.
- Davinelli, S., M. Maes, G. Corbi, A. Zarrelli, D. C. Willcox and G. Scapagnini (2016). "Dietary phytochemicals and neuro-inflammation: from mechanistic insights to translational challenges." Immun Ageing **13**: 16.
- Davis, C., K. Patte, R. Levitan, C. Reid, S. Tweed and C. Curtis (2007). "From motivation to behaviour: a model of reward sensitivity, overeating, and food preferences in the risk profile for obesity." Appetite **48**(1): 12-19.
- DeChristopher, L. R., J. Uribarri and K. L. Tucker (2016). "The link between soda intake and asthma: science points to the high-fructose corn syrup, not the preservatives: a commentary." Nutr Diabetes **6**(11): e234.

- Del Rio, D., A. J. Stewart and N. Pellegrini (2005). "A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress." Nutr Metab Cardiovasc Dis **15**(4): 316-328.
- Dellu, F., A. Contarino, H. Simon, G. F. Koob and L. H. Gold (2000). "Genetic differences in response to novelty and spatial memory using a two-trial recognition task in mice." Neurobiol Learn Mem **73**(1): 31-48.
- Dellu, F., V. Fauchey, M. Le Moal and H. Simon (1997). "Extension of a new two-trial memory task in the rat: influence of environmental context on recognition processes." Neurobiol Learn Mem **67**(2): 112-120.
- Dhingra, R., L. Sullivan, P. F. Jacques, T. J. Wang, C. S. Fox, J. B. Meigs, R. B. D'Agostino, J. M. Gaziano and R. S. Vasan (2007). "Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community." Circulation **116**(5): 480-488.
- Droge, W. (2002). "Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants." Exp Gerontol **37**(12): 1333-1345.
- Eichenbaum, H., G. Schoenbaum, B. Young and M. Bunsey (1996). "Functional organization of the hippocampal memory system." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13500-13507.
- El-Terras, A., M. M. Soliman, A. Alkheldaide, H. F. Attia, A. Alharthy and A. E. Banaja (2016). "Carbonated soft drinks induce oxidative stress and alter the expression of certain genes in the brains of Wistar rats." Mol Med Rep **13**(4): 3147-3154.
- Emond, J. A., R. E. Patterson, P. M. Jardack and L. Arab (2014). "Using doubly labeled water to validate associations between sugar-sweetened beverage intake and body mass among White and African-American adults." Int J Obes (Lond) **38**(4): 603-609.
- Erion, J. R., M. Wosiski-Kuhn, A. Dey, S. Hao, C. L. Davis, N. K. Pollock and A. M. Stranahan (2014). "Obesity elicits interleukin 1-mediated deficits in hippocampal synaptic plasticity." J Neurosci **34**(7): 2618-2631.
- Esiri, M. M. (2007). "Ageing and the brain." J Pathol **211**(2): 181-187.
- Esterbauer, H. and K. H. Cheeseman (1990). "Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal." Methods Enzymol **186**: 407-421.
- Euston, D. R., A. J. Gruber and B. L. McNaughton (2012). "The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making." Neuron **76**(6): 1057-1070.
- Everitt, A. V., S. N. Hilmer, J. C. Brand-Miller, H. A. Jamieson, A. S. Truswell, A. P. Sharma, R. S. Mason, B. J. Morris and D. G. Le Couteur (2006). "Dietary approaches that delay age-related diseases." Clin Interv Aging **1**(1): 11-31.
- Farr, S. A., K. A. Yamada, D. A. Butterfield, H. M. Abdul, L. Xu, N. E. Miller, W. A. Banks and J. E. Morley (2008). "Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment." Endocrinology **149**(5): 2628-2636.

- Ferino, F., A. M. Thierry and J. Glowinski (1987). "Anatomical and electrophysiological evidence for a direct projection from Ammon's horn to the medial prefrontal cortex in the rat." Exp Brain Res **65**(2): 421-426.
- Fitzpatrick, L. and R. P. Heaney (2003). "Got soda?" J Bone Miner Res **18**(9): 1570-1572.
- Fournet, M., F. Bonte and A. Desmouliere (2018). "Glycation Damage: A Possible Hub for Major Pathophysiological Disorders and Aging." Aging Dis **9**(5): 880-900.
- Foyet, H. S., L. Hritcu, A. Ciobica, M. Stefan, P. Kamtchouing and D. Cojocaru (2011). "Methanolic extract of Hibiscus asper leaves improves spatial memory deficits in the 6-hydroxydopamine-lesion rodent model of Parkinson's disease." J Ethnopharmacol **133**(2): 773-779.
- Franceschi, C., M. Bonafe, S. Valensin, F. Olivieri, M. De Luca, E. Ottaviani and G. De Benedictis (2000). "Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence." Ann N Y Acad Sci **908**: 244-254.
- Franceschi, C. and J. Campisi (2014). "Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **69** Suppl 1: S4-9.
- Frankland, P. W., B. Bontempi, L. E. Talton, L. Kaczmarek and A. J. Silva (2004). "The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory." Science **304**(5672): 881-883.
- Fresan, U., A. Gea, M. Bes-Rastrollo, M. Ruiz-Canela and M. A. Martinez-Gonzalez (2016). "Substitution Models of Water for Other Beverages, and the Incidence of Obesity and Weight Gain in the SUN Cohort." Nutrients **8**(11).
- Fuster, J. M. (2001). "The prefrontal cortex--an update: time is of the essence." Neuron **30**(2): 319-333.
- Gold, P. E. (1995). "Role of glucose in regulating the brain and cognition." Am J Clin Nutr **61**(4 Suppl): 987s-995s.
- Gomez-Miranda, L. M., A. Jimenez-Cruz and M. Bacardi-Gascon (2013). "[Randomized clinical trials on the sugar sweetened beverages on adiposity in older than 13 y; systematic review]." Nutr Hosp **28**(6): 1792-1796.
- Green, E., A. Jacobson, L. Haase and C. Murphy (2011). "Reduced nucleus accumbens and caudate nucleus activation to a pleasant taste is associated with obesity in older adults." Brain Res **1386**: 109-117.
- Green, E. and C. Murphy (2012). "Altered processing of sweet taste in the brain of diet soda drinkers." Physiol Behav **107**(4): 560-567.
- Grimm, S., A. Hoehn, K. J. Davies and T. Grune (2011). "Protein oxidative modifications in the ageing brain: consequence for the onset of neurodegenerative disease." Free Radic Res **45**(1): 73-88.

- Gross, L. S., L. Li, E. S. Ford and S. Liu (2004). "Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment." Am J Clin Nutr **79**(5): 774-779.
- Gurecka, R., I. Koborova, K. Jansakova, T. Tabi, E. Szoko, V. Somoza, K. Sebekova and P. Celec (2015). "Prenatal dietary load of Maillard reaction products combined with postnatal Coca-Cola drinking affects metabolic status of female Wistar rats." Croat Med J **56**(2): 94-103.
- Gutteridge, J. M. C. and B. Halliwell (2018). "Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success?" Biochem Biophys Res Commun **502**(2): 183-186.
- Halliwell, B. (2001). "Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment." Drugs Aging **18**(9): 685-716.
- Halliwell, B. (2006). "Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life." Plant Physiol **141**(2): 312-322.
- Halliwell, B. (2007). "Biochemistry of oxidative stress." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 1147-1150.
- Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." J Gerontol **11**(3): 298-300.
- Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." Exp Cell Res **25**: 585-621.
- Hong, Y., C. Shen, Q. Yin, M. Sun, Y. Ma and X. Liu (2016). "Effects of RAGE-Specific Inhibitor FPS-ZM1 on Amyloid-beta Metabolism and AGEs-Induced Inflammation and Oxidative Stress in Rat Hippocampus." Neurochem Res **41**(5): 1192-1199.
- Howarth, C., P. Gleeson and D. Attwell (2012). "Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum." J Cereb Blood Flow Metab **32**(7): 1222-1232.
- Hritcu, L., O. Cioanca and M. Hancianu (2012). "Effects of lavender oil inhalation on improving scopolamine-induced spatial memory impairment in laboratory rats." Phytomedicine **19**(6): 529-534.
- Hritcu, L., H. S. Foyet, M. Stefan, M. Mihasan, A. E. Asongalem and P. Kamtchouing (2011). "Neuroprotective effect of the methanolic extract of Hibiscus asper leaves in 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease." J Ethnopharmacol **137**(1): 585-591.
- Hsu, T. M., V. R. Konanur, L. Taing, R. Usui, B. D. Kayser, M. I. Goran and S. E. Kanoski (2015). "Effects of sucrose and high fructose corn syrup consumption on spatial memory function and hippocampal neuroinflammation in adolescent rats." Hippocampus **25**(2): 227-239.
- Hu, F. B. and V. S. Malik (2010). "Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: Epidemiologic evidence." Physiology & Behavior **100**(1): 47-54.
- Hu, F. B. and V. S. Malik (2010). "Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: epidemiologic evidence." Physiol Behav **100**(1): 47-54.

- Ismail, Z., M. Q. Nguyen, C. E. Fischer, T. A. Schweizer, B. H. Mulsant and D. Mamo (2011). "Neurobiology of delusions in Alzheimer's disease." Curr Psychiatry Rep **13**(3): 211-218.
- Izquierdo, I., D. M. Barros, T. Mello e Souza, M. M. de Souza, L. A. Izquierdo and J. H. Medina (1998). "Mechanisms for memory types differ." Nature **393**(6686): 635-636.
- Izquierdo, I., L. A. Izquierdo, D. M. Barros, T. Mello e Souza, M. M. de Souza, J. Quevedo, C. Rodrigues, M. K. Sant'Anna, M. Madruga and J. H. Medina (1998). "Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory." Behav Pharmacol **9**(5-6): 421-427.
- Jagust, W., D. Harvey, D. Mungas and M. Haan (2005). "Central obesity and the aging brain." Arch Neurol **62**(10): 1545-1548.
- Jensdottir, T., P. Holbrook, B. Nauntofte, C. Buchwald and A. Bardow (2006). "Immediate erosive potential of cola drinks and orange juices." J Dent Res **85**(3): 226-230.
- Kalivarathan, J., S. P. Chandrasekaran, K. Kalaivanan, V. Ramachandran and A. Carani Venkatraman (2017). "Apigenin attenuates hippocampal oxidative events, inflammation and pathological alterations in rats fed high fat, fructose diet." Biomed Pharmacother **89**: 323-331.
- Kang, M. K., W. B. Chung, S. K. Hong, O. R. Kim, S. H. Ihm, K. Chang and K. B. Seung (2016). "Effects of candesartan cilexetil and amlodipine orotate on receptor for advanced glycation end products expression in the aortic wall of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OETF) type 2 diabetic rats." Arch Pharm Res **39**(4): 565-576.
- Kanoski, S. E. and T. L. Davidson (2011). "Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity." Physiol Behav **103**(1): 59-68.
- Kanoski, S. E., R. L. Meisel, A. J. Mullins and T. L. Davidson (2007). "The effects of energy-rich diets on discrimination reversal learning and on BDNF in the hippocampus and prefrontal cortex of the rat." Behav Brain Res **182**(1): 57-66.
- Kendig, M. D., R. A. Boakes, K. B. Rooney and L. H. Corbit (2013). "Chronic restricted access to 10% sucrose solution in adolescent and young adult rats impairs spatial memory and alters sensitivity to outcome devaluation." Physiol Behav **120**: 164-172.
- Khan, T. A. and J. L. Sievenpiper (2016). "Controversies about sugars: results from systematic reviews and meta-analyses on obesity, cardiometabolic disease and diabetes." Eur J Nutr **55**(Suppl 2): 25-43.
- Kovacevic, S., J. Nestorov, G. Matic and I. Elakovic (2017). "Fructose-enriched diet induces inflammation and reduces antioxidative defense in visceral adipose tissue of young female rats." Eur J Nutr **56**(1): 151-160.
- Kurenova, E. V. and J. M. Mason (1997). "Telomere functions. A review." Biochemistry (Mosc) **62**(11): 1242-1253.
- Laggner, H., M. Hermann, B. M. Gmeiner and S. Kapiotis (2006). "Cu²⁺ and Cu⁺ bathocuproine disulfonate complexes promote the oxidation of the ROS-detecting compound dichlorofluorescein (DCFH)." Anal Bioanal Chem **385**(5): 959-961.

- Laroche, S., S. Davis and T. M. Jay (2000). "Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation." Hippocampus **10**(4): 438-446.
- Lebda, M. A., K. M. Sadek and Y. S. El-Sayed (2017). "Aspartame and Soft Drink-Mediated Neurotoxicity in Rats: Implication of Oxidative Stress, Apoptotic Signaling Pathways, Electrolytes and Hormonal Levels." **32**(5): 1639-1647.
- LeBel, C. P. and S. C. Bondy (1992). "Oxidative damage and cerebral aging." Prog Neurobiol **38**(6): 601-609.
- Lee, J. Y., S. Kho, H. B. Yoo, S. Park, J. S. Choi, J. S. Kwon, K. R. Cha and H. Y. Jung (2014). "Spatial memory impairments in amnesic mild cognitive impairment in a virtual radial arm maze." Neuropsychiatr Dis Treat **10**: 653-660.
- Lei, X. G., J. H. Zhu, W. H. Cheng, Y. Bao, Y. S. Ho, A. R. Reddi, A. Holmgren and E. S. Arner (2016). "Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications." Physiol Rev **96**(1): 307-364.
- Lichtenberg, D. and I. Pinchuk (2015). "Oxidative stress, the term and the concept." Biochem Biophys Res Commun **461**(3): 441-444.
- Lopes, A., T. C. Vilela, L. Taschetto, F. Vuolo, F. Petronilho, F. Dal-Pizzol, E. L. Streck, G. C. Ferreira and P. F. Schuck (2014). "Evaluation of the effects of fructose on oxidative stress and inflammatory parameters in rat brain." Mol Neurobiol **50**(3): 1124-1130.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.
- Lu, C., J. C. He, W. Cai, H. Liu, L. Zhu and H. Vlassara (2004). "Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(32): 11767-11772.
- Ludwig, D. S. (2002). "The glycemic index: physiological mechanisms relating to obesity, diabetes, and cardiovascular disease." Jama **287**(18): 2414-2423.
- Lv, X., G. H. Lv, G. Y. Dai, H. M. Sun and H. Q. Xu (2016). "Food-advanced glycation end products aggravate the diabetic vascular complications via modulating the AGEs/RAGE pathway." Chin J Nat Med **14**(11): 844-855.
- Malhotra, A. (2013). "The dietary advice on added sugar needs emergency surgery." Bmj **346**: f3199.
- Malik, V. S. and F. B. Hu (2015). "Fructose and Cardiometabolic Health: What the Evidence From Sugar-Sweetened Beverages Tells Us." Journal of the American College of Cardiology **66**(14): 1615-1624.
- Malik, V. S. and F. B. Hu (2015). "Fructose and Cardiometabolic Health: What the Evidence From Sugar-Sweetened Beverages Tells Us." J Am Coll Cardiol **66**(14): 1615-1624.
- Malik, V. S., B. M. Popkin, G. A. Bray, J. P. Despres, W. C. Willett and F. B. Hu (2010). "Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis." Diabetes Care **33**(11): 2477-2483.

- Malik, V. S., M. B. Schulze and F. B. Hu (2006). "Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review." Am J Clin Nutr **84**(2): 274-288.
- Martin, S., M. Jones, E. Simpson and M. van den Buuse (2003). "Impaired spatial reference memory in aromatase-deficient (ArKO) mice." Neuroreport **14**(15): 1979-1982.
- Massey, L. K. and S. J. Whiting (1993). "Caffeine, urinary calcium, calcium metabolism and bone." J Nutr **123**(9): 1611-1614.
- McGartland, C., P. J. Robson, L. Murray, G. Cran, M. J. Savage, D. Watkins, M. Rooney and C. Boreham (2003). "Carbonated soft drink consumption and bone mineral density in adolescence: the Northern Ireland Young Hearts project." J Bone Miner Res **18**(9): 1563-1569.
- Mene, P., F. Festuccia and F. Pugliese (2003). "Clinical potential of advanced glycation end-product inhibitors in diabetes mellitus." Am J Cardiovasc Drugs **3**(5): 315-320.
- Meng, J., Z. Lv, X. Qiao, X. Li, Y. Li, Y. Zhang and C. Chen (2017). "The decay of Redox-stress Response Capacity is a substantive characteristic of aging: Revising the redox theory of aging." Redox Biol **11**: 365-374.
- Miller, G., C. Merlo, Z. Demissie, S. Sliwa and S. Park (2017). "Trends in Beverage Consumption Among High School Students - United States, 2007-2015." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **66**(4): 112-116.
- Minciullo, P. L., A. Catalano, G. Mandraffino, M. Casciaro, A. Crucitti, G. Maltese, N. Morabito, A. Lasco, S. Gangemi and G. Basile (2016). "Inflammaging and Anti-Inflammaging: The Role of Cytokines in Extreme Longevity." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **64**(2): 111-126.
- Molteni, R., R. J. Barnard, Z. Ying, C. K. Roberts and F. Gomez-Pinilla (2002). "A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning." Neuroscience **112**(4): 803-814.
- Mondaca-Navarro, B. A., L. A. Avila-Villa, A. F. Gonzalez-Cordova, J. Lopez-Cervantes, D. I. Sanchez-Machado, O. N. Campas-Baypoli and R. Rodriguez-Ramirez (2017). "Antioxidant and chelating capacity of Maillard reaction products in amino acid-sugar model systems: applications for food processing." J Sci Food Agric.
- Morcillo, E. J., J. Estrela and J. Cortijo (1999). "Oxidative stress and pulmonary inflammation: pharmacological intervention with antioxidants." Pharmacol Res **40**(5): 393-404.
- Mueller, K., J. Sacher, K. Arelin, S. Holiga, J. Kratzsch, A. Villringer and M. L. Schroeter (2012). "Overweight and obesity are associated with neuronal injury in the human cerebellum and hippocampus in young adults: a combined MRI, serum marker and gene expression study." Transl Psychiatry **2**: e200.
- Murphy, M. P. (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species." Biochem J **417**(1): 1-13.
- Narayanan, N. S., N. K. Horst and M. Laubach (2006). "Reversible inactivations of rat medial prefrontal cortex impair the ability to wait for a stimulus." Neuroscience **139**(3): 865-876.

- Nielsen, S. J. and B. M. Popkin (2004). "Changes in beverage intake between 1977 and 2001." Am J Prev Med **27**(3): 205-210.
- Nowotny, K., T. Jung, A. Hohn, D. Weber and T. Grune (2015). "Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus." Biomolecules **5**(1): 194-222.
- Otero-Losada, M. E., D. R. Grana, A. Muller, G. Ottaviano, G. Ambrosio and J. Milei (2011). "Lipid profile and plasma antioxidant status in sweet carbonated beverage-induced metabolic syndrome in rat." Int J Cardiol **146**(1): 106-109.
- Otero-Losada, M. E., S. Mc Loughlin, G. Rodriguez-Granillo, A. Muller, G. Ottaviano, M. Moriondo, J. C. Cutrin and J. Milei (2013). "Metabolic disturbances and worsening of atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-} mice after cola beverages drinking." Cardiovasc Diabetol **12**: 57.
- Packard, M. G. and N. M. White (1991). "Dissociation of hippocampus and caudate nucleus memory systems by posttraining intracerebral injection of dopamine agonists." Behav Neurosci **105**(2): 295-306.
- Pai, S. A., R. P. Munshi, F. H. Panchal, I. S. Gaur, S. N. Mestry, M. S. Gursahani and A. R. Juvekar (2019). "Plumbagin reduces obesity and nonalcoholic fatty liver disease induced by fructose in rats through regulation of lipid metabolism, inflammation and oxidative stress." Biomed Pharmacother **111**: 686-694.
- Pastoriza, S., J. A. Rufian-Henares, B. Garcia-Villanova and E. Guerra-Hernandez (2016). "Evolution of the Maillard Reaction in Glutamine or Arginine-Dextrinomaltose Model Systems." Foods **5**(4).
- Perez-Morales, E., M. Bacardi-Gascon and A. Jimenez-Cruz (2013). "Sugar-sweetened beverage intake before 6 years of age and weight or BMI status among older children; systematic review of prospective studies." Nutr Hosp **28**(1): 47-51.
- Prattichizzo, F., V. De Nigris, L. La Sala, A. D. Procopio, F. Olivieri and A. Ceriello (2016). "'Inflammaging' as a Druggable Target: A Senescence-Associated Secretory Phenotype-Centered View of Type 2 Diabetes." Oxid Med Cell Longev **2016**: 1810327.
- Pugazhenthii, S., L. Qin and P. H. Reddy (2017). "Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease." Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis **1863**(5): 1037-1045.
- Quevedo, J., M. R. Vianna, R. Roesler, F. de-Paris, I. Izquierdo and S. P. Rose (1999). "Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus." Learn Mem **6**(6): 600-607.
- Rahimi, M., S. S. Aghabozorg Afjeh, M. D. Omrani, S. Arsang-Jang, M. Ganji, R. Noroozi, M. Taheri and S. Ghafouri-Fard (2018). "Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products (sRAGE) is Up-Regulated in Multiple Sclerosis Patients Treated with Interferon beta-1a." Cell Physiol Biochem **46**(2): 561-567.
- Ramasamy, R., S. F. Yan and A. M. Schmidt (2009). "RAGE: therapeutic target and biomarker of the inflammatory response--the evidence mounts." J Leukoc Biol **86**(3): 505-512.

- Rapuri, P. B., J. C. Gallagher, H. K. Kinyamu and K. L. Ryschon (2001). "Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes." Am J Clin Nutr **74**(5): 694-700.
- Rodriguez, W. A., C. A. Horne, A. N. Mondragon and D. D. Phelps (1994). "Comparable dose-response functions for the effects of glucose and fructose on memory." Behav Neural Biol **61**(2): 162-169.
- Ross, A. P., T. J. Bartness, J. G. Mielke and M. B. Parent (2009). "A high fructose diet impairs spatial memory in male rats." Neurobiol Learn Mem **92**(3): 410-416.
- Saito, A., R. Nagai, A. Tanuma, H. Hama, K. Cho, T. Takeda, Y. Yoshida, T. Toda, F. Shimizu, S. Horiuchi and F. Gejyo (2003). "Role of megalin in endocytosis of advanced glycation end products: implications for a novel protein binding to both megalin and advanced glycation end products." J Am Soc Nephrol **14**(5): 1123-1131.
- Salih, A. M., D. M. Smith, J. F. Price and L. E. Dawson (1987). "Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry." Poult Sci **66**(9): 1483-1488.
- Salmon, A. B., A. Richardson and V. I. Perez (2010). "Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging?" Free Radic Biol Med **48**(5): 642-655.
- Samanez-Larkin, G. R. and B. Knutson (2015). "Decision making in the ageing brain: changes in affective and motivational circuits." Nat Rev Neurosci **16**(5): 278-289.
- Scherling, C. S., S. E. Wilkins, J. Zakrezewski, J. H. Kramer, B. L. Miller, M. W. Weiner and H. J. Rosen (2016). "Decreased Self-Appraisal Accuracy on Cognitive Tests of Executive Functioning Is a Predictor of Decline in Mild Cognitive Impairment." Front Aging Neurosci **8**: 120.
- Schulze, M. B., S. Liu, E. B. Rimm, J. E. Manson, W. C. Willett and F. B. Hu (2004). "Glycemic index, glycemic load, and dietary fiber intake and incidence of type 2 diabetes in younger and middle-aged women." Am J Clin Nutr **80**(2): 348-356.
- Seamans, J. K., S. B. Floresco and A. G. Phillips (1995). "Functional differences between the prelimbic and anterior cingulate regions of the rat prefrontal cortex." Behav Neurosci **109**(6): 1063-1073.
- Sengupta, P. (2013). "The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's." Int J Prev Med **4**(6): 624-630.
- Shcheglova, T., S. P. Makker and A. Tramontano (2009). "Covalent binding antibodies suppress advanced glycation: on the innate tier of adaptive immunity." Acta Naturae **1**(2): 66-72.
- Sies, H. (2015). "Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine." Redox Biol **4**: 180-183.
- Sies, H., C. Berndt and D. P. Jones (2017). "Oxidative Stress." Annu Rev Biochem **86**: 715-748.

- Sievenpiper, J. L., R. J. de Souza, A. I. Cozma, L. Chiavaroli, V. Ha and A. Mirrahimi (2014). "Fructose vs. glucose and metabolism: do the metabolic differences matter?" Curr Opin Lipidol **25**(1): 8-19.
- Smedsrod, B., J. Melkko, N. Araki, H. Sano and S. Horiuchi (1997). "Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal Kupffer and endothelial cells." Biochem J **322** (Pt 2): 567-573.
- Soares, E., R. D. Prediger, S. Nunes, A. A. Castro, S. D. Viana, C. Lemos, C. M. De Souza, P. Agostinho, R. A. Cunha, E. Carvalho, C. A. Fontes Ribeiro, F. Reis and F. C. Pereira (2013). "Spatial memory impairments in a prediabetic rat model." Neuroscience **250**: 565-577.
- Soulis-Liparota, T., M. Cooper, D. Papazoglou, B. Clarke and G. Jerums (1991). "Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozocin-induced diabetic rat." Diabetes **40**(10): 1328-1334.
- Spickett, C. M. and A. R. Pitt (2015). "Oxidative lipidomics coming of age: advances in analysis of oxidized phospholipids in physiology and pathology." Antioxid Redox Signal **22**(18): 1646-1666.
- Srikanth, V., A. Maczurek, T. Phan, M. Steele, B. Westcott, D. Juskiw and G. Munch (2011). "Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **32**(5): 763-777.
- Stranahan, A. M. and M. P. Mattson (2012). "Recruiting adaptive cellular stress responses for successful brain ageing." Nat Rev Neurosci **13**(3): 209-216.
- Stranahan, A. M., E. D. Norman, K. Lee, R. G. Cutler, R. S. Telljohann, J. M. Egan and M. P. Mattson (2008). "Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats." Hippocampus **18**(11): 1085-1088.
- Takagishi, M. and T. Chiba (1991). "Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tracer PHA-L study." Brain Res **566**(1-2): 26-39.
- Takashima, A., K. M. Petersson, F. Rutters, I. Tendolkar, O. Jensen, M. J. Zwarts, B. L. McNaughton and G. Fernandez (2006). "Declarative memory consolidation in humans: a prospective functional magnetic resonance imaging study." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(3): 756-761.
- Taylor, J. M., B. S. Main and P. J. Crack (2013). "Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease." Neurochem Int **62**(5): 803-819.
- Thorpe, S. R. and J. W. Baynes (1996). "Role of the Maillard reaction in diabetes mellitus and diseases of aging." Drugs Aging **9**(2): 69-77.
- Tobon-Velasco, J. C., E. Cuevas and M. A. Torres-Ramos (2014). "Receptor for AGEs (RAGE) as mediator of NF-kB pathway activation in neuroinflammation and oxidative stress." CNS Neurol Disord Drug Targets **13**(9): 1615-1626.
- Tretter, L. and V. Adam-Vizi (2005). "Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **360**(1464): 2335-2345.

- Tucker, K. L., K. Morita, N. Qiao, M. T. Hannan, L. A. Cupples and D. P. Kiel (2006). "Colas, but not other carbonated beverages, are associated with low bone mineral density in older women: The Framingham Osteoporosis Study." Am J Clin Nutr **84**(4): 936-942.
- van der Borgh, K., R. Kohnke, N. Goransson, T. Deierborg, P. Brundin, C. Erlanson-Albertsson and A. Lindqvist (2011). "Reduced neurogenesis in the rat hippocampus following high fructose consumption." Regul Pept **167**(1): 26-30.
- Vereecken, C. A., J. Inchley, S. V. Subramanian, A. Hublet and L. Maes (2005). "The relative influence of individual and contextual socio-economic status on consumption of fruit and soft drinks among adolescents in Europe." Eur J Public Health **15**(3): 224-232.
- Vertes, R. P. (2004). "Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat." Synapse **51**(1): 32-58.
- Vertes, R. P., W. B. Hoover, K. Szigeti-Buck and C. Leranth (2007). "Nucleus reuniens of the midline thalamus: link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus." Brain Res Bull **71**(6): 601-609.
- Vianna, M. R., M. Alonso, H. Viola, J. Quevedo, F. de Paris, M. Furman, M. L. de Stein, J. H. Medina and I. Izquierdo (2000). "Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat." Learn Mem **7**(5): 333-340.
- Vlassara, H. (2001). "The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications." Diabetes Metab Res Rev **17**(6): 436-443.
- Vlassara, H., M. Brownlee and A. Cerami (1986). "Nonenzymatic glycosylation: role in the pathogenesis of diabetic complications." Clin Chem **32**(10 Suppl): B37-41.
- Volkow, N. D., G. J. Wang, J. S. Fowler, J. Logan, M. Jayne, D. Franceschi, C. Wong, S. J. Gatley, A. N. Gifford, Y. S. Ding and N. Pappas (2002). ""Nonhedonic" food motivation in humans involves dopamine in the dorsal striatum and methylphenidate amplifies this effect." Synapse **44**(3): 175-180.
- Walker, R. W., K. A. Dumke and M. I. Goran (2014). "Fructose content in popular beverages made with and without high-fructose corn syrup." Nutrition **30**(7-8): 928-935.
- Walsh, T. J. and D. F. Emerich (1988). "The hippocampus as a common target of neurotoxic agents." Toxicology **49**(1): 137-140.
- Wang, G. J., N. D. Volkow, J. Logan, N. R. Pappas, C. T. Wong, W. Zhu, N. Netusil and J. S. Fowler (2001). "Brain dopamine and obesity." Lancet **357**(9253): 354-357.
- Wilfred de Alwis, N. M. and C. P. Day (2007). "Genetics of alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease." Semin Liver Dis **27**(1): 44-54.
- Wolf, A., G. A. Bray and B. M. Popkin (2008). "A short history of beverages and how our body treats them." Obes Rev **9**(2): 151-164.
- Wong, A., V. R. Dogra and A. C. Reichelt (2017). "High-sucrose diets in male rats disrupt aspects of decision making tasks, motivation and spatial memory, but not impulsivity measured by operant delay-discounting." Behav Brain Res **327**: 144-154.

- Woodward-Lopez, G., J. Kao and L. Ritchie (2011). "To what extent have sweetened beverages contributed to the obesity epidemic?" Public Health Nutr **14**(3): 499-509.
- Yan, S. F., R. Ramasamy and A. M. Schmidt (2009). "The receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and cardiovascular disease." Expert Rev Mol Med **11**: e9.
- Yan, S. F., R. Ramasamy and A. M. Schmidt (2010). "The RAGE axis: a fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature." Circ Res **106**(5): 842-853.
- Yang, Y., J. Wang and Y. Zhang (2018). "Black Sesame Seeds Ethanol Extract Ameliorates Hepatic Lipid Accumulation, Oxidative Stress, and Insulin Resistance in Fructose-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease." **66**(40): 10458-10469.
- Yu, J. Y. and L. M. Frank (2015). "Hippocampal-cortical interaction in decision making." Neurobiol Learn Mem **117**: 34-41.
- Yu, X. W., M. M. Oh and J. F. Disterhoft (2016). "CREB, cellular excitability, and cognition: implications for aging." Behav Brain Res.
- Zimmerman, G. A., M. Meistrell, 3rd, O. Bloom, K. M. Cockroft, M. Bianchi, D. Risucci, J. Broome, P. Farmer, A. Cerami, H. Vlassara and et al. (1995). "Neurotoxicity of advanced glycation endproducts during focal stroke and neuroprotective effects of aminoguanidine." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(9): 3744-3748.
- Zlatar, Z. Z., A. Bischoff-Grethe, C. C. Hays, T. T. Liu, M. J. Meloy, R. A. Rissman, M. W. Bondi and C. E. Wierenga (2016). "Higher Brain Perfusion May Not Support Memory Functions in Cognitively Normal Carriers of the ApoE epsilon4 Allele Compared to Non-Carriers." Front Aging Neurosci **8**: 151.

Anexo - Certificado de Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade do Extremo Sul Catarinense Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação da administração crônica de bebida à base de xarope de cola sobre parâmetros comportamentais e moleculares em ratos Wistar”, Protocolo nº 042/2015-2 sob a responsabilidade de Josiane Budni equipe: Vanessa Moraes de Andrade, Gustavo Luis Schiavo, Ricardo Chiengo Sapalo Cassoma, Franciele Gonçalves Mina, Michelle Lima Garcez, Tatiani Bellettini dos Santos e Adriani Paganini Damiani, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Vigência do Projeto	09/11/2015 a 08/11/2017
Espécie/linhagem	Rato heterogênico - Wistar
Nº. De animais	90
Peso/Idade	400g, 8 meses
Sexo	M
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Protocol number: 042/2015-2

Principal Investigator:

Researchers: Rebeca Nambuco Luacuti, Samira Dal-Toé De Prá, Paula Ronsani Ferro e Flávia Karine Rigo.

Project title: “Evaluation of chronin administration of cola-based drink on behavior and molecular parameters in Wistar rats”.

*The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.*

Criciúma, 03 de novembro de 2015.

JAIRO JOSÉ ZOCHE
Coordenador da CEUA