

Iracema Ayalla dos Santos

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA INGESTÃO CRÔNICA DE  
TIPOS DIFERENTES DE AÇÚCARES**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Fisiológica.

**Orientador:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Laura Difini Leite

**Coorientador:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Flávia Marques Ribeiro

Florianópolis, 2012

Iracema Ayalla dos Santos

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA INGESTÃO CRÔNICA DE TIPOS DIFERENTES DE AÇÚCARES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. Efeitos Comportamentais da Ingestão Crônica de Tipos Diferentes de Açúcares. Aprovada. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PGFis)

Florianópolis, 06 de agosto de 2012

---

Prof. Dr. Alex Rafaxo  
Coordenador

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

Santos, Iracema Ayalla dos

EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA INGESTÃO CRÔNICA DE TIPOS DIFERENTES DE AÇÚCARES [dissertação] / Iracema Ayalla dos Santos ; orientadora, Laura Difini Leite ; co-orientadora, Maria Flávia Marques Ribeiro. - Florianópolis, SC, 2012.

97 p. ; 21cm

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

Inclui referências

1. Fisiologia. 2. Ingestão crônica de açúcar. 3. Efeitos comportamentais. I. Leite, Laura Difini. II. Ribeiro, Maria Flávia Marques. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia. IV. Título.

Dedico este trabalho aos meus queridos  
pais e ao meu amado esposo



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente, por me proporcionar todas as oportunidades de aprendizado até agora, me fazendo sentir objeto do Seu infinito amor.

Ao meu esposo, agradeço por seu apoio incondicional, incentivo e resignação durante minha ausência, bem como aos demais familiares por compreenderem meu afastamento e torcerem pelo meu sucesso.

À professora Maria Flávia Marques Ribeiro por suas sábias críticas e sugestões na correção dos trabalhos escritos.

À professora Laura Difini Leite, por se mostrar muito mais que minha orientadora, tornando-se minha grande amiga.

Ao professor Adair Roberto Soares dos Santos pela colaboração em diversas fases da minha pesquisa, tanto com ajuda intelectual quanto com materiais e substâncias, sem os quais a execução da pesquisa seria impossível.

À professora Elisa Cristiana Winkelmann Duarte que não mediu sacrifícios, mesmo enfrentando períodos críticos em sua saúde.

Aos demais professores que nos auxiliaram com sugestões, críticas e palavras de incentivo na elaboração do projeto e durante o transcorrer da pesquisa.

Aos professores do PGFis-UFSC e do PPGFis-UFRGS por transmitirem seus conhecimentos com excelência e humildade.

Ao Péricles, mais que um técnico de laboratório, demonstrou um senso de responsabilidade e competência acima da função, virtudes que posso afirmar, foram decisivas para o sucesso da pesquisa.

À Ana Cláudia que por diversas vezes me socorreu com sua inestimável ajuda e intermediação nas atividades do laboratório.

Aos colegas e técnicos do MOR, por todas as vezes que necessitei de seus conhecimentos específicos, ou quando precisei usar o laboratório de histologia, sempre se mostraram muito solícitos e simpáticos.

Aos alunos de iniciação científica pela preciosa ajuda prestada com tanta dedicação, curiosidade e coragem nas atividades experimentais.

Aos colegas do PGFis que sempre me apoiaram compartilhando conhecimentos e experiências.

Aos colegas Fábio e Larissa, pela inestimável ajuda na aplicação e interpretação dos testes comportamentais, além do apoio e demonstração sincera de interesse pelo sucesso nos trabalhos do mestrado.

Aos colegas do laboratório do professor Adair que sempre me apoiaram e me trataram como se eu fizesse parte do seu grupo.

Ao “seu” Carlos pela costumeira prontidão em ajudar em qualquer situação e tempo (domingos e feriados), foi sempre um “braço forte”, e à dona Vilma pela simpatia e simplicidade.

Ao professor Josmar Mazuchelli, da Universidade Estadual de Maringá, pela orientação e execução da análise estatística.

À banca examinadora pelas críticas, sugestões e observações que deram consistência à minha defesa de mestrado.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina pela excelência acadêmica.

Ao CNPq-Brasil pelo suporte financeiro.

Aos animais que deram sua vida pela ciência.

E a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização e sucesso desta pesquisa, o meu sincero agradecimento por tudo!

*"Louvarei o nome de Deus com um cântico, e engrandecê-lo-ei com ação de graças."*  
(Salmos 69:30)





## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	XI
LISTA DE FIGURAS .....	XIII
LISTA DE TABELAS .....	XV
RESUMO .....	XVII
ABSTRACT .....	XIX
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. O açúcar branco refinado .....	1
1.2. O açúcar mascavo .....	2
1.3. O açúcar na dieta .....	3
1.4. O metabolismo do açúcar .....	6
1.5. Regulação do apetite .....	8
1.6. Nocicepção e o consumo de açúcar .....	10
1.7. Depressão e o consumo de açúcar .....	14
1.8. Proteína Fos .....	19
2. JUSTIFICATIVA .....	21
3. OBJETIVOS .....	23
3.1. Objetivos Gerais .....	23
3.2. Objetivos Específicos .....	23
4. METODOLOGIA .....	25
4.1. Animais .....	25
4.2. Dieta .....	25
4.3. Testes comportamentais .....	28
4.3.1. Medida do comportamento tipo-depressivo – teste do nado forçado (TNF) .....	28
4.3.2. Medida do limiar da dor – teste dos filamentos de Von Frey Mecânico .....	30
4.4. Atividade neuronal – imunorreatividade à proteína Fos .....	31
4.4.1. Quantificação de células Fos-positivas .....	36
4.5. Análise do nível glicêmico sanguíneo .....	36
4.6. Análise estatística .....	38
5. RESULTADOS .....	39
5.1. Consumo de ração e água.....	39
5.1.1. Avaliação do consumo de ração com açúcar e sem açúcar .....	39

5.1.2.	Comparação do consumo de ração com os diferentes tipos de açúcar .....	43
5.1.3.	Comparação do consumo em calorias e avaliação da variação da massa corporal.....	46
5.1.4.	Avaliação do consumo semanal de água .....	50
5.2.	Testes comportamentais .....	52
5.2.1.	Teste dos filamentos de Von Frey .....	52
5.2.2.	Teste do nado forçado .....	53
5.3.	Imunoistoquímica .....	60
5.3.1.	Quantificação de células Fos-positivas no <i>Locus coeruleus</i> .....	60
5.3.2.	Quantificação de células Fos-positivas no núcleo magno da rafe .....	63
5.3.3.	Quantificação de células Fos-positivas no hipocampo .....	65
5.4.	Avaliação glicêmica .....	71
6.	DISCUSSÃO .....	73
6.1.	Preferência alimentar, consumo de calorias e ingestão de água .....	73
6.2.	Nocicepção e depressão .....	77
7.	CONCLUSÕES .....	85
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-HTP – 5-hidroxitriptofano  
ADP – difosfato de adenosina  
AgRP – proteína relacionada com o *agouti*  
ATP – trifosfato de adenosina  
BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro  
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais  
CMV – Conselho de Medicina Veterinária  
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal  
CRH – Hormônio liberador de corticotropina  
DA – dopamina  
DAB – diaminobenzidina  
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
GLUT – transportador de glicose  
HPA – Eixo hipotalâmico  
IASP – Associação Internacional Para o Estudo da Dor  
IBGE – Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IL – Interleucina  
Kcal – quilocaloria  
LC – *Locus coeruleus*  
NAc – núcleo *accumbens*  
NMR – núcleo magno da rafe  
NPY – neuropeptídeo Y  
PAG – substância cinzenta periaquedutal  
PBS – tampão fosfato-salino (phosphate buffered saline)  
PLP – piridoxal-5' fosfato  
SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas  
SGLT – cotransportador sódio-glicose  
SM – Síndrome metabólica  
SNC – sistema nervoso central  
TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  
TNF – teste do nado forçado  
UCD – University College Dublin



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.7: Nutrientes recrutados para a produção de neurotransmissores relacionados ao controle do humor
- Figura 4.3.1: Teste do Nado Forçado (TNF)
- Figura 4.3.2: Teste dos filamentos de Von Frey
- Figura 4.4.1. Localização do *Locus coeruleus* (LC)
- Figura 4.4.2. Localização do Núcleo Magno da Rafe (NMR)
- Figura 4.4.3. Localização das áreas CA1, CA2, CA3 e GD do hipocampo
- Figura 4.5. Esquema com a sequência das atividades do experimento
- Figura 5.1.1A: Comparativo do consumo entre ração com açúcar e ração padrão
- Figura 5.1.1B: Comparativo do consumo de ração açucarada pelo grupo Escolha
- Figura 5.1.1C: Consumo total de ração
- Figura 5.1.1D: Consumo semanal de ração sem açúcar pelos grupos experimentais
- Figura 5.1.2A: Consumo de ração açucarada pelo grupo Escolha
- Figura 5.1.2B: Consumo semanal de ração açucarada pelo grupo Escolha
- Figura 5.1.3A: Consumo médio de calorias
- Figura 5.1.3B: Consumo semanal de calorias
- Figura 5.1.3C: Peso corporal
- Figura 5.1.3D: Peso corporal semanal
- Figura 5.1.4A: Consumo de água
- Figura 5.1.4B: Consumo semanal de água
- Figura 5.2.1: Respostas ao teste dos filamentos de Von Frey
- Figura 5.2.2A: Tempo de latência à imobilidade no TNF
- Figura 5.2.2B: Tempo de imobilidade no TNF
- Figura 5.2.2C: Frequência de imobilidade no TNF
- Figura 5.2.2D: Frequência nadando no TNF
- Figura 5.2.2E: Frequência de escaladas no TNF
- Figura 5.2.2F: Tempo gasto em mergulhos no TNF
- Figura 5.3.1A: Número de células Fos-ativadas no *Locus coeruleus* – direito

Figura 5.3.1B: Número de células Fos-ativadas no *Locus coeruleus* – esquerdo

Figura 5.3.2A: Número de células Fos-ativadas no núcleo magno da rafe – direito

Figura 5.3.2B: Número de células Fos-ativadas no núcleo magno da rafe – esquerdo

Figura 5.3.3A: Número de células Fos-ativadas no giro denteado do hipocampo – direito

Figura 5.3.3B: Número de células Fos-ativadas no giro denteado do hipocampo – esquerdo

Figura 5.3.3C: Número de células Fos-ativadas nas regiões CA1 do hipocampo – direito

Figura 5.3.3D: Número de células Fos-ativadas nas regiões CA1 do hipocampo – esquerdo

Figura 5.3.3E: Número de células Fos-ativadas nas regiões CA3 do hipocampo – direito

Figura 5.3.3F: Número de células Fos-ativadas nas regiões CA3 do hipocampo - esquerdo

Figura 5.4A: Teste de glicemia – final do experimento

Figura 5.4B: Teste de glicemia comparando início e final do experimento

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Valor nutritivo do açúcar mascavo comparado ao do açúcar refinado

Tabela 2 – Composição básica da ração industrializada específica para ratos (Nuvilab CR-1 -Nuvital®)





## RESUMO

O consumo de dietas com alto teor de açúcar é conhecido por sua potencialidade em promover o aumento de doenças cardiovasculares e obesidade, bem como por ter potencial para causar modificações na bioquímica cerebral induzindo a comportamentos depressivos. Além disso, alguns estudos demonstraram que o consumo de açúcar pode alterar a sensibilidade à dor. Com base nesses dados, o objetivo deste trabalho foi verificar em ratos a relação entre o consumo crônico de açúcar e os efeitos comportamentais tanto no que diz respeito ao limiar nociceptivo, através do teste com filamentos de Von Frey, quanto a um possível comportamento tipo-depressivo em ratos, utilizando como modelo comportamental o Teste do Nado Forçado (TNF). Para isto, utilizamos ratos Wistar machos (n=40), entre 60-80 dias de idade, alojados em ciclo claro/escuro de 12h (4-16h) e divididos em cinco grupos, sendo 1 grupo Controle alimentado apenas com ração padrão umedecida em água, e 4 grupos experimentais. Estes grupos possuíam a escolha entre ração sem açúcar e ração com tipos diferentes de açúcares, assim distribuídos: grupo Sacarose (ração com 10% de sacarose); grupo Branco (ração com 10% de açúcar branco refinado); grupo Mascavo (ração com 10% de açúcar mascavo) e; grupo Escolha (ração com 10% de açúcar branco refinado e ração com 10% de açúcar mascavo). Todos foram mantidos em dieta diária de privação por 12 horas, seguido por 12h de acesso alimentar a partir de 4 horas após o início da fase escura, e água disponível *ad libitum*. Após 28 dias os animais foram submetidos aos testes de TNF e de Von Frey para serem avaliados quanto aos comportamentos tipo-depressão e limiar nociceptivo, respectivamente. Foi realizada ainda, uma análise imunoistoquímica da ativação neuronal pela expressão da proteína Fos no *Locus coeruleus* (LC), núcleo magno da rafe (NMR) e hipocampo, utilizando 4 animais de cada grupo, selecionados aleatoriamente dentre os ratos que participaram da dieta com açúcar. Os resultados mostraram uma redução do limiar nociceptivo para os grupos Branco e Mascavo, bem como a presença de comportamentos tipo-depressivo nos grupos que ingeriram dieta açucarada, como menor tempo de latência para a imobilidade, maior frequência no comportamento de imobilidade e menor tempo de

mergulho no TNF. A diminuição da expressão da proteína Fos no LC de todos os grupos que ingeriam açúcar, e no giro denteado do hipocampo do grupo Branco, indicam uma relação entre o consumo de açúcar com a nocicepção e os comportamentos tipo-depressivo.

Palavras chave: Açúcar branco refinado. Açúcar mascavo. Comportamento tipo-depressivo. Nocicepção. Alimento palatável.

## ABSTRACT

The consumption of diets high in sugar is known for its potential to promote, among others, an increase of cardiovascular diseases, obesity and diabetes, as well as for the potential to cause alterations in the brain chemistry inducing depressive behavior. Besides, some studies demonstrated that the consumption of sugar can alter sensitivity to pain. Based on these facts, the goal of this study was to verify in rats the relation between the chronic consumption of sugar and the behavioral effects of nociceptive threshold using the Von Frey test as well as investigating a depressive-type behavior in rats, using the Forced Swimming Test (FST) model. For this, we used forty male Wistar rats, between 60-80 days old that were housed individually on a reversed 12-h light/dark schedule (4-16h) and were divided into five groups. One control group was fed only with standard chow moistened with water, and 4 experimental groups. These groups could choose between chow without sugar and chow with different types of sugars distributed in the following way: Sucrose group (chow with 10% of sucrose); White group (chow with 10% of white sugar); Brown Sugar group (chow with 10% of brown sugar); and the Choice group (chow with 10% of white sugar and chow with 10% of brown sugar). The rats were kept on a daily diet of 12 h deprivation, followed by 12-h access to food, starting 4 h after the dark phase. All rats had water available ad libitum. After 28 days, the animals were submitted to FST and Von Frey test to be evaluated concerning the depression-type behavior and nociceptive threshold, respectively. Furthermore, immunohistochemical analysis of neuronal activation was made for the expression of the Fos protein in the *locus coeruleus* (LC), *rafe magnus nuclei* (NMR), and hippocampus, using 4 animals of each group, selected at random from the rats that received the diet with sugar. The results showed reduction of the nociceptive threshold for the groups White and Brown, as well as the presence of depressive-type behavior in the groups that consumed sugar diet, with a lower latency period for immobility, higher frequency in the immobility behavior and shorter time of diving in the FST. The decrease of the expression of the Fos-protein in the *locus coeruleus* (LC) of all the groups that consumed sugar, and in the *dentate gyrus* of the

hippocampus of the White group indicates a link between sugar consumption with nociception and depressive-type behavior.

Keywords: Refined white sugar. Brown sugar. Depressive-type behavior. Nociception. Palatable food.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. O açúcar branco refinado

O processo de fabricação do açúcar envolve a extração do caldo por moagem da cana-de-açúcar, filtragem e concentração desse caldo, finalizando com a produção de diversos tipos de açúcares conhecidos como: mascavo, demerara, cristal, refinado, etc., de acordo com os objetivos específicos de cada usina.

Após a moagem da cana-de-açúcar, o caldo pode apresentar uma coloração naturalmente escura por causa de substâncias pigmentadas provenientes da própria cana. Essas substâncias também podem ser produzidas durante os processos utilizados no tratamento para o clareamento do caldo e do xarope na fabricação do açúcar branco (ARAÚJO, 2007).

A técnica mais utilizada atualmente pelas usinas açucareiras para clarear o caldo e produzir o açúcar branco é o método da sulfitação, que produz o  $\text{SO}_2$ , o principal agente da clarificação, mas que deixa resíduos de sais de enxofre que são prejudiciais à saúde humana.

A maioria das usinas que produzem o açúcar branco utiliza a sulfitação como método principal no processo do tratamento da clarificação do caldo de cana, e produz o uso de um gás, obtido pela combustão controlada do enxofre, o  $\text{SO}_2$ , também conhecido por vários nomes como gás sulfuroso, anidrido sulfuroso e dióxido de enxofre. O dióxido de enxofre é uma substância muito tóxica e tem proporcionado vários danos ao ser humano e ao meio ambiente, por ser cancerígeno, muito poluente, provocador de chuvas ácidas, destruidor da camada de ozônio, altamente corrosivo (ARAÚJO, 2007).

O açúcar resultante do processo acima descrito é composto de 99% de sacarose, praticamente isento de vitaminas e sais minerais, quando comparado ao açúcar mascavo (ORTIZ e MONCAYO, 2004).

## 1.2. O açúcar mascavo

Para a produção do açúcar mascavo são utilizadas as mesmas etapas iniciais do processo de fabricação do açúcar branco, como a extração do caldo por moagem da cana-de-açúcar, filtragem e concentração desse caldo. No entanto, o açúcar mascavo não passa pelos processos de clarificação do caldo como acontece na fabricação do açúcar branco, resultando assim num produto de aspecto marrom claro a escuro, denso e pesado, com sabor semelhante à rapadura moída (CHAVES, 1998), preservando os nutrientes originais da cana.

O processo de limpeza do caldo inclui a retirada de impurezas que se acumulam na espuma que se forma durante a fervura, antes do início da concentração do caldo, sob a ação de fogo forte. A espuma é retirada com uma escumadeira até que o caldo fique totalmente limpo. Após esta fase, o caldo é transferido para outra tacha menor para a concentração (Engetecno Online). Em seguida, a massa é transferida para cochos de madeira ou gamelas onde é agitada com uma espátula de madeira, até que a massa se resfrie e se solidifique, assumindo a condição de grânulos bem finos e secos (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE, 2004), característicos do açúcar mascavo.

A composição do açúcar mascavo é de sacarose e outros elementos como água, cinzas, proteínas e sólidos insolúveis, além da presença de um importante grupo de minerais (K, Ca, P, Mg, Na, Fe, Mn, Zn e Cu) e vitaminas, o que aumenta os benefícios nutricionais deste produto (GUERRA e MUJICA, 2010; SILVA, 2003), sendo muitas vezes recomendado na dieta de pessoas anêmicas. Entretanto, em termos de calorias é muito semelhante ao açúcar branco refinado e seu poder edulcorante é levemente inferior (ver tabela 1).

Elementos	Açúcar refinado	Açúcar mascavo
	Energia	387 Kcal
Carboidratos	99,9 g	97,3 g
Vitamina B1	-	0,010 mg
Vitamina B2	0,020 mg	0,010 mg
Vitamina B6	-	0,030 mg
Cálcio	1 mg	85 mg
Magnésio	-	29 mg
Cobre	0,040mg	0,300 mg
Fósforo	2 mg	22 mg
Potássio	2 mg	346 mg

Fonte: SEBRAE

**TABELA 1** – Valor nutritivo do açúcar mascavo comparado ao do açúcar refinado (para cada 100 gramas)

### 1.3. O açúcar na dieta

O consumo excessivo de açúcar na dieta ocidental tem causado grande preocupação aos profissionais da saúde e motivado muitas pesquisas quanto aos seus efeitos na saúde humana. O consumo de açúcar triplicou nos últimos 50 anos (LUSTIG, SCHMIDT e BRINDIS, 2012). As estatísticas populacionais revelam que as famílias brasileiras consomem muitos alimentos com alto teor de açúcar, principalmente refrigerantes, e pouca quantidade de frutas e hortaliças (FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2004). No Brasil, o consumo de açúcar excede em mais de 60% o limite máximo recomendado pela Organização mundial da Saúde (OMS), ou seja, 10% do total de calorias da dieta (LEVY *et al.*, 2012), e esse consumo vem aumentando com o tempo, sendo que na década de 1930, o consumo médio anual de açúcar por pessoa era de 15 quilos. Em 1990, o Brasil tornou-se um dos maiores consumidores mundiais *per capita* do produto, sendo que cada brasileiro consumia entre 51 e 55 quilos de açúcar por ano, enquanto a média mundial por habitante

correspondia a 21 quilos por ano (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA, 2009).

Nos últimos anos o açúcar tem sido adicionado em todos os alimentos industrializados, tornando mais difícil a escolha. Nos últimos 15 anos, a participação do açúcar de mesa foi reduzida, enquanto a contribuição do açúcar adicionado aos alimentos dobrou, especialmente por meio do consumo de refrigerantes, doces, balas, chocolates e biscoitos. Além disso, o consumo elevado de açúcares adicionados aos alimentos pode ser associado a uma diminuição no teor de proteínas e de micro-nutrientes na dieta (LEVY *et al.*, 2012).

Na natureza, o açúcar é difícil de ser obtido e o homem conseguiu tornar isso mais fácil. Em muitas partes do mundo, cada pessoa está consumindo em média mais de 500 calorias por dia proveniente apenas da adição de açúcar. Considerando o efeito tóxico do açúcar, um número crescente de evidências epidemiológicas e mecanicistas tem argumentado que o consumo excessivo de açúcar afeta a saúde humana, induzindo a todas as doenças associadas com a Síndrome Metabólica (SM), um grupo de distúrbios que inclui a obesidade, a resistência à insulina, a dislipidemia e a hipertensão, que tem sido associada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 (CHEN e BERENSON, 2007). Alguns transtornos mentais, como a esquizofrenia e a depressão, também têm sido propostos como participantes da SM, uma vez que compartilham alguns fatores etiológicos, como a resistência à insulina, por exemplo, demonstrada em pacientes com depressão (PEET, 2004).

Muito mais do que “calorias vazias”, a sacarose do açúcar consiste em glicose e frutose em partes iguais e há evidências de que o excesso de frutose pode desencadear processos que conduzem à toxicidade hepática da mesma forma que o álcool (LUSTIG *et al.*, 2012).

O comer em excesso é estimulado pela disponibilidade de alimentos ricos em gordura e açúcar. A regulação do apetite e a compreensão do efeito do alimento no sistema de recompensa, particularmente de alimentos ricos em energia, como a gordura e o açúcar, tornou-se um assunto de grande interesse científico. Técnicas da biologia molecular têm identificado um grande número de genes e produtos de genes que são responsáveis pelas sensações de fome e



saciedade. A ingestão alimentar é regulada por um sistema complexo que é influenciado pela disponibilidade de nutrientes e por vários fatores ambientais e psicológicos. Os sinais de fome e saciedade são gerados em órgãos periféricos, como o tubo digestivo, o tecido adiposo e no próprio cérebro. Os sinais são levados a certos neurônios do hipotálamo, identificados como liberadores de peptídeos da fome e saciedade (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005).

Segundo Colantuoni *et al.* (2002), os alimentos palatáveis liberam opióides cerebrais e dopamina no sistema límbico, ou seja, um alimento saboroso pode ativar receptores opióides na área tegmental ventral (VTA) e desta forma, estimular as células que liberam dopamina no núcleo *accumbens* (NAc). Por outro lado, injeções de opiáceos ou de dopamina (DA) no NAc podem estimular os animais a comer alimentos palatáveis. Existem duas explicações principais para o comportamento de comer compulsivamente alimentos palatáveis. Uma delas é o fenômeno da resistência, ou seja, uma capacidade diminuída para responder à ingestão de alimentos com uma cascata de sinalização que leva à saciedade, que pode ocorrer por diferentes mecanismos: 1) um aumento na expressão dos sinais da fome ou de seus receptores, 2) uma redução na expressão dos sinais de saciedade e de seus receptores, 3) uma alteração nas vias pós-receptoras de sinalização em resposta à alimentação palatável. Nestes três casos o resultado seria uma ingestão excessiva. A outra explicação é a ativação do sistema de recompensa, representado por opióides endógenos, dopamina e serotonina (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005). O NAc parece desempenhar um papel crucial no comportamento relacionado com reforçadores naturais, como a ingestão de alimentos, acasalamento ou procura por drogas viciantes. Essa região do cérebro recebe informações do tronco encefálico em resposta ao paladar e sensações gastrintestinais de alimentos ingeridos através de uma conexão direta com o núcleo do trato solitário. O núcleo *accumbens* também faz uma importante ligação com o hipotálamo lateral, para a homeostase energética. Embora nessa região haja muitos sistemas neurotransmissores, os estudos sobre o sistema de recompensa tem se concentrado em três sistemas de sinalização envolvendo os opióides endógenos, a dopamina e a serotonina (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005).

Segundo estudos demonstrados por Avena *et al.* (2008), o açúcar, por ser uma substância que libera opióides e dopamina, possui um poder viciante. Alimentos palatáveis produzem efeitos sobre o sistema mesolímbico de DA, que reforçam o comportamento ingestivo. Quando a ingestão de açúcar se torna compulsiva, pode haver uma liberação excessiva de DA, a qual provoca mudanças compensatórias que são comparáveis aos efeitos das drogas de abuso, incluindo a síndrome de abstinência (AVENA *et al.*, 2009).

O consumo exagerado de alimentos doces tem íntima relação com a busca do prazer. O açúcar é uma substância que ativa o sistema de recompensa onde substâncias neuroquímicas são liberadas interferindo no sistema normal de *feedback* entre fome e saciedade, responsável pelo controle do balanço energético do indivíduo, provocando um embotamento da resposta de saciedade e incentivando a preferência pelo alimento mais saboroso (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005).

Foi visto que o acesso intermitente ao açúcar também atua em regiões do estriado no cérebro de ratos por meio de opióides e DA, causando mudanças como a diminuição da expressão do mRNA para um tipo de receptor de DA ( $D_2$ ) e de genes das preproencefalinas, especialmente no NAc (SPANGLER *et al.*, 2004). Os mesmos neurônios associados com o sistema de recompensa são ativados por drogas de abuso, podendo gerar sinais de abstinência por dependência de opióides endógenos (COLANTUONI *et al.*, 2002).

Interessantemente, a diminuição dos receptores do tipo  $D_2$  de DA poderia representar um mecanismo compensatório para atenuar os efeitos de excessos abruptos de DA que é liberada pela ingestão de açúcar. Esses estudos sugerem um paralelismo com as doenças humanas, apontando para diferenças compensatórias e não causativas. Por exemplo, a diminuição de receptores  $D_2$  em pessoas obesas poderia ser uma resposta ao comer em excesso e não uma diferença que predispõe o indivíduo a comer em excesso.

#### **1.4. O metabolismo do açúcar**

Na dieta humana normal existem três fontes principais de carboidratos: a lactose, um dissacarídeo encontrado no leite, os amidos,

grandes polissacarídeos presentes em quase todos os alimentos de origem vegetal, notadamente as batatas e os diferentes tipos de grãos, e a sacarose, um dissacarídeo que, após a digestão, se desdobra em glicose e frutose e é liberada para a corrente sanguínea. Sua digestão é rápida e a glicose é prontamente absorvida, permitindo uma rápida elevação dos seus níveis no sangue (glicemia) logo após o consumo. A digestão dos carboidratos é realizada no lúmen do intestino delgado, na membrana borda em escova dos enterócitos (LONGO *et al.*, 2005).

A sacarose é digerida no intestino delgado pela enzima sacarase, presente nos enterócitos, células que forram a borda em escova das microvilosidades intestinais. Pela ação da sacarase, a sacarose é hidrolisada em duas moléculas de monossacarídeo, a glicose e a frutose, que são absorvíveis pelas células epiteliais do intestino. A glicose é absorvida por mecanismos que envolvem co-transporte de  $\text{Na}^+$ -glicose (SGLT 1), contra um gradiente eletroquímico, e a frutose é absorvida por difusão facilitada. Sendo um composto hidrofílico, o transporte da glicose para o citosol não pode ser realizado por difusão simples e depende de proteínas transportadoras específicas, como os transportadores GLUT, para passar através da bicamada lipídica. Desta forma, os transportadores GLUT's funcionam como reguladores do movimento de glicose entre os compartimentos extra e intracelulares, mantendo um fornecimento constante de glicose disponível para o metabolismo (MEDINA e OWEN, 2002). Esses transportadores são responsáveis não somente pela absorção da glicose no intestino delgado, mas também pela reabsorção de glicose do filtrado glomerular, absorção pelo cérebro através da barreira hematoencefálica, e captação e liberação de glicose em todas as células por todo o corpo (WRIGHT, HIRAYAMA e LOO, 2007).

Os carboidratos possuem um papel fundamental para o metabolismo energético do corpo utilizando a glicose como substrato importante para a formação de trifosfato de adenosina (ATP), o qual é essencial para os processos que envolvem utilização e produção de energia no organismo. O substrato para a geração de ATP pelo corpo é a energia proveniente da oxidação de carboidratos, proteínas e gorduras. O difosfato de adenosina (ADP) é convertido em ATP, o qual será consumido pelas várias reações envolvendo os diversos sistemas

orgânicos fundamentais para manter e propagar a vida. (MEDINA e OWEN, 2002).

O corpo humano necessita por volta de 200 gramas de glicose por dia para exercer as funções metabólicas do encéfalo. Caso a concentração de glicose caia para 40 mg/dL (2,2 mol/L) pode ocorrer coma, convulsões ou mesmo morte. Por outro lado, se os níveis excederem os 180 mg/dL (10 mmol/L), o que corresponde a uma hiperglicemia, podem surgir complicações a curto e a longo prazo. Numa tentativa de evitar essas consequências, a glicose plasmática está sujeita à regulação da sua concentração através de rigorosos mecanismos homeostáticos, o que constitui um importante fator de proteção em patologias associadas à SM.

### **1.5. Regulação do apetite**

A identificação dos sinais de regulação do apetite começou com a percepção de que os peptídeos sinalizadores da saciedade são de extrema importância nesse processo, controlando a sensação de fome. Entre os peptídeos da fome que foram identificados destacamos o neuropeptídeo Y (NPY) e a grelina (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005). O controle da preferência pela ingestão de determinados alimentos pode estar sob controle neurorregulatório, o que foi demonstrado em estudos animais, em que a ingestão de gordura foi aumentada por opióides e galanina e reduzida por enterostatina, enquanto a ingestão de carboidratos foi aumentada pelo NPY (LEVINE, KATZ e GOSNELL, 2003). O NPY possui 36 aminoácidos com sequência homóloga aos peptídeos pancreáticos e peptídeos YY (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005) e é abundantemente expresso no sistema nervoso central e periférico, sendo que uma grande densidade é observada no núcleo arqueado com projeções para o núcleo paraventricular, onde atua estimulando a ingestão alimentar (LEITE e BRANDÃO-NETO, 2009), particularmente de carboidratos e suprime o gasto energético a partir do tecido adiposo marrom (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005). O NPY é liberado no hipotálamo em situações de jejum e de aumento da demanda de energia, tais como o exercício físico e a lactação. A infusão de NPY em longo prazo no ventrículo lateral de camundongos causa hiperfagia, resistência à insulina e

obesidade (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005), e em ovinos, a ingestão aumentada de alimentos foi associada à expressão de NPY no núcleo arqueado (CUPPLES, 2005). Nesse sentido, uma regulação para cima (*up-regulation*) do NPY pela ingestão de sacarose seria uma razão para a hiperfagia induzida pelo alimento palatável. Tanto a leptina quanto a insulina, ambas inibem a expressão do NPY e seu receptor, dando a entender que a fome provocada pelo NPY é controlada pela leptina e insulina. (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005).

A leptina é um hormônio constituído por 167 aminoácidos e é produzida principalmente pelos adipócitos e os seus níveis circulantes aumentam proporcionalmente ao aumento do tecido adiposo. A leptina circulante transmite ao hipotálamo informações a respeito da quantidade de energia armazenada no tecido adiposo, suprimindo o apetite (SOUSA, BRÁS-SILVA e LEITE-MOREIRA, 2009). É importante para a regulação do apetite e sua deficiência total ou de seu receptor leva à hiperfagia e à obesidade em camundongos e humanos. O principal papel da leptina é controlar a expressão e a atividade de diversos peptídeos controladores do apetite (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005). Quando as reservas de energia estão baixas, a baixa produção de leptina a partir do tecido adiposo promove o aumento da produção de neurotransmissores hipotalâmicos, como o NPY, a galanina e a proteína relacionada com o *agouti* (AgRP), os quais induzem ao aumento da ingestão de alimentos (WILDING, 2002).

A leptina foi descrita como uma inibidora da resposta ao sabor doce, o que sugere que a ingestão de alimentos doces pode ser regulada pela leptina. A leptina estimula neurônios pró-opiomelanocorticotropina, enquanto inibe o NPY. Desta forma, o núcleo arqueado do hipotálamo controla a ingestão alimentar atuando sobre os neurônios NPY através dos neurônios pró-opiomelanocorticotropina para inibir a ingestão alimentar. Durante o processamento da molécula de pró-opiomelanocorticotropina, também são produzidas endorfinas, as quais estimulam ao invés de inibir o apetite (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005).

A grelina, por sua vez, é um iniciador de ingestão alimentar e seus níveis circulantes são elevados durante o jejum e suprimidos após uma refeição (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005). Ela é composta por 28 aminoácidos e é produzida pelas células Gr do trato gastrointestinal

(LEITE e BRANDÃO-NETO, 2009; ROMERO e ZANESCO, 2006), sendo que seus receptores ocorrem no núcleo arqueado, onde ativa o NPY (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005), ativando a ingestão de alimentos.

## **1.6. Nociceção e o consumo de açúcar**

O conceito da dor foi definido pela Associação Internacional Para o Estudo da Dor (IASP) em 1986, como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão”. A sensação dolorosa está associada ao processo de transmissão do impulso doloroso denominado nociceção, o qual desempenha um papel fisiológico de caráter subjetivo, regido por limites que não podem ser ultrapassados e atua como um sinal de alerta para denunciar que algo está ameaçando a integridade física do organismo (MERSKEY, 1979; CHAPMAN et al., 1999). O estudo da dor torna-se algo um tanto complexo, pois além de focar nos componentes anatômicos e fisiológicos, que estão diretamente relacionados às vias de transmissão, também está relacionado com as vias envolvidas com o comportamento motivacional, ilustrando seu caráter subjetivo frente às respostas individuais.

O processo doloroso é iniciado quando nociceptores periféricos são sensibilizados por um estímulo com potencial para lesão, ou seja, que excede um limite considerado fisiológico. Os nociceptores estão presentes nas terminações livres das fibras nervosas aferentes, na porção distal dos neurônios aferentes de primeira ordem, amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras (VITOR *et al.*, 2008), e são capazes de transformar um estímulo agressivo de natureza térmica, química ou mecânica em estímulo elétrico, permitindo a transmissão do estímulo nociceptivo até o sistema nervoso central (SNC), e no córtex cerebral é interpretado como dor (ROCHA *et al.*, 2007). Os nociceptores são divididos em três classes: mecanoceptores, que são sensíveis às deformações dos receptores, os termoceptores que são sensíveis a estímulos térmicos, e os nociceptores polimodais, sensíveis tanto a estímulos mecânicos e térmicos quanto a estímulos químicos (VITOR *et al.*, 2008).

A estimulação dos nociceptores, que ocorre devido a um dos

estímulos acima mencionados, pode promover uma liberação local de mediadores químicos como a bradicinina, histamina, serotonina substância P, opióides, entre outros, que ao agirem com os nociceptores, causam alterações na permeabilidade da membrana dando início ao potencial de ação. Os nociceptores periféricos situam-se nas terminações de neurônios primários (fibras do tipo A $\delta$  e C), cujos corpos celulares localizam-se nos gânglios das raízes dorsais da medula espinhal. A informação nociceptiva é então transmitida aos neurônios do corno dorsal e os principais neurotransmissores envolvidos são a substância P e o glutamato.

Quanto à velocidade de condução da dor, sabe-se que as fibras A $\delta$  são responsáveis por conduzir a “primeira dor”, caracterizada por ser rápida, enquanto que as fibras C, amielínicas, são mais lentas, transmitindo a dor de forma difusa e fraca (VITOR *et al.*, 2008).

Os estímulos transduzidos pelos nociceptores são então conduzidos para porção central dos axônios A $\delta$  e C que terminam no corno dorsal da medula espinhal. Posteriormente, os axônios se ramificam em colaterais ascendentes e descendentes em uma região chamada de *zona de Lissauer*, os quais se projetam para cima e para baixo de um ou dois segmentos medulares antes de penetrar na substância cinzenta da raiz dorsal.

Ao entrarem na raiz dorsal, os axônios se ramificam e fazem sinapses com neurônios localizados nas diversas lâminas dos cornos dorsais. Ambas as fibras A $\delta$  e C enviam colaterais para inervar neurônios na lâmina I (lâmina marginal) e lâmina II (substância gelatinosa). A informação da lâmina II é transmitida a neurônios de segunda ordem nas lâminas IV, V e VI. Essas células também recebem inervação direta de ramificações dos neurônios de primeira ordem. Os axônios dos neurônios de segunda ordem nas lâminas IV-VI decussam imediatamente e ascendem (*contralateralmente*) pelo *tracto espinotalâmico*, a via ascendente de maior importância no envio de informação referente a dor e temperatura, também denominado sistema anterolateral. As fibras espinotalâmicas projetam-se então para cima na medula espinhal por meio do bulbo, da ponte e do mesencéfalo, sem estabelecer sinapses, até alcançarem o tálamo (PURVES, 1997).

Portanto, a maioria das fibras segue para os núcleos intralaminares do tálamo e áreas reticulares do tronco encefálico,

importantes regiões na elaboração de reações motoras e emocionais diante de uma agressão. No tálamo ocorrem as sinapses com neurônios de terceira ordem, que emitem seus axônios ao córtex somatossensorial ou para o sistema límbico (MARTON *et al.*, 2009).

Durante muitos anos, tem sido notório que a percepção da dor é variável, dependendo de vários sinais de entrada sensorial não-dolorosos, do contexto comportamental, do comportamento cognitivo, entre outros. Na regulação descendente da dor, várias regiões do encéfalo tem sido implicadas na supressão da dor.

As vias descendentes que fazem parte do mesencéfalo e chegam ao corno dorsal da medula espinhal, exercem um efeito inibitório e modulador sobre as estruturas distais, em especial sobre o cordão posterior da medula (VITOR *et al.*, 2008). Uma das regiões mesencefálicas envolvidas é a substância cinzenta periaquedutal (PAG), que quando estimulada, pode produzir uma analgesia profunda. A PAG normalmente recebe aferências de várias estruturas do encéfalo, muitas delas envolvidas na transmissão de sinais ligados ao estado emocional.

Os neurônios da PAG projetam seus axônios para várias regiões descendentes, como o núcleo magno da rafe (NMR) no bulbo e núcleos adjacentes que recebem impulsos excitatórios da PAG e que utilizam a serotonina como neurotransmissor. A partir do bulbo, esses neurônios enviam axônios descendentes até os cornos dorsais da medula espinhal, onde podem inibir os neurônios nociceptivos. O processo analgésico ocorre também pela estimulação de locais como o *locus coeruleus*, um pequeno núcleo localizado na substância cinzenta da ponte, sob o assoalho do quarto ventrículo, e o bulbo raquidiano ventromedial rostral (BRVMR).

O córtex pré-frontal e insular, o hipotálamo, a amígdala e o tronco cerebral conectam-se diretamente com a PAG, que faz conexões com o BRVMR, o qual projeta-se para o corno dorsal da medula. Os neurônios do BRVMR ao serem excitados, liberam serotonina e encefalinas que tem o papel de inibir as respostas nociceptivas dos neurônios da raiz dorsal da medula (VITOR *et al.* 2008).

Os opióides endógenos são substâncias similares àquelas derivadas do ópio (como a morfina, codeína e a heroína), porém são produzidos pelo próprio corpo. Concentram-se principalmente em áreas do SNC que processam ou modulam a informação nociceptiva. Entre



eles, salientam-se as endorfinas, peptídios semelhante à morfina que produzem analgesia ao agirem no nível celular suprimindo a liberação de glutamato por terminais pré-sinápticos e inibindo os neurônios através de uma hiperpolarização de suas membranas pós-sinápticas. Dessa forma, esses neurônios endorfinérgicos na medula espinal e no tronco encefálico, impedem a passagem da informação nociceptiva pelo corno dorsal em direção aos níveis superiores, onde a percepção da dor é processada.

Clinicamente, o uso de substâncias adocicadas, particularmente soluções de sacarose, têm sido utilizadas como intervenções não farmacológicas para abrandar o sofrimento em procedimentos dolorosos, por aumentar o limiar da dor em neonatos (GASPARDO, LINHARES e MARTINEZ, 2005) e estudos vêm sendo realizados com o objetivo de ampliar a aplicação da sacarose durante procedimentos de rotina em unidades de tratamentos intensivo neonatal, como a punção e a aspiração endo-traqueal (STEVENS *et al.* 2005). As soluções de sacarose atuam liberando opióides endógenos, aliviando a dor aguda (LINHARES, 2010). Estudos têm demonstrado a eficácia da dose única da sacarose no alívio da dor aguda em neonatos e tem sido bem documentada na literatura, ao passo que quanto ao uso de sacarose em doses repetidas ainda não existe uma conclusão definitiva (GASPARDO, LINHARES e MARTINEZ, 2005).

Outra via inibitória da dor que se projeta a partir do *Locus coeruleus* é a via noradrenérgica, cujo principal neurotransmissor é a noradrenalina, que exerce um efeito inibitório sobre a transmissão da dor na raiz dorsal da medula. Neste sentido, os neurônios noradrenérgicos da via noradrenérgica proveniente do LC, fazem projeções também para o córtex, hipocampo e cerebelo, sendo que a analgesia desse sistema parece ser mediada apenas por receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos (MARTON *et al.*, 2009; CARVALHO e LEMÔNICA, 1998).

Tanto a noradrenalina quanto a serotonina têm papel fundamental na mediação da dor e estão envolvidas em múltiplos níveis de regulação da nocicepção e no mecanismo da ansiedade e da depressão (VITOR *et al.*, 2008; PIRES *et al.*, 2011). A serotonina também é conhecida por exercer efeito analgésico desempenhando um papel na via serotoninérgica descendente inibitória da dor, e existem evidências

experimentais que indicam que os receptores corticais de serotonina estão envolvidos na modulação descendente da dor. Os efeitos finais da serotonina sobre a modulação da dor são complexos e dependem de uma variedade de fatores, tais como o nível do neuroeixo (neurônio sensorial primário, a medula espinhal ou do cérebro), do tipo de receptor, e da condição de dor (MARTIKAINEN, 2009).

O núcleo magno da rafe (NMR), localizado bilateralmente na porção rostral e ventromedial do bulbo, envia fibras serotoninérgicas e noradrenérgicas que são projetadas para o corno dorsal da medula e bulbo. As fibras serotoninérgicas inibem seletivamente os neurônios nociceptivos das lâminas I, II e V, entre as células de transmissão nociceptiva (MARTON *et al.*, 2009).

Portanto, o processo inibitório da dor ocorre em vários locais do encéfalo como o sistema analgésico endógeno, representado pelos opióides endógenos e receptores opióides, a substância cinzenta periaquedutal (PAG) e periventricular que são ricas em encefalinas e receptores opióides, pelos neurônios noradrenergicos, originários no *Locus coeruleus*, e pelo núcleo magno da rafe (NMR) e núcleos adjacentes que recebem impulsos excitatórios da PAG (CARVALHO e LEMÔNICA, 1998; MARTON *et al.*, 2009).

Como explanado acima, os estímulos nociceptivos vindos dos tecidos periféricos são transmitidos às estruturas cerebrais, mas durante o trajeto, recebem influência dos mecanismos moduladores que podem modificar a qualidade e a intensidade da sensação dolorosa. Tais mecanismos são denominados sistema supressor de dor. Desta forma, a dor é o resultado de um desequilíbrio entre a quantidade e a qualidade da estimulação nociceptiva e a ativação do sistema supressor de dor (PORTNOI, 1999).

## **1.7. Depressão e o consumo de açúcar**

A depressão é descrita, segundo a Associação Psiquiátrica Americana, no *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, quarta edição (DSM-IV), como Transtorno Depressivo Maior ou Distímia, caracterizado pela presença de “um humor cronicamente deprimido que ocorre na maior parte do dia, na maioria dos dias, por pelo menos dois anos”, envolvendo pelo menos dois dos seguintes

sintomas adicionais: apetite diminuído ou hiperfagia, insônia ou hipersonia, baixa energia ou fadiga, baixa auto-estima, fraca concentração ou dificuldade em tomar decisões e sentimentos de desesperança. DUNBAR *et al.* (2008), em um estudo envolvendo 1690 homens e mulheres com idade entre 25 e 84 anos, demonstraram que a depressão tem uma importante associação com a SM, independente da condição diabética.

Este estudo ainda demonstrou que 409 dos participantes com SM apresentaram escores mais elevados para a depressão do que os 936 indivíduos sem SM, sendo que esta associação esteve presente em 338 participantes com SM e sem diabetes. Os autores defendem que a base fisiopatológica para associar a SM com a depressão envolve um estado inflamatório que é descrito como uma consequência da obesidade central.

Além disso, fatores psicossociais, incluindo a depressão, podem desencadear uma desregulação do eixo hipotalâmico (HPA) produzindo uma hipersecreção do hormônio liberador de corticotropina (CRH) e de cortisol, promovendo assim, a deposição de tecido adiposo visceral, que secreta citocinas inflamatórias tais como a interleucina (IL)-1, IL-6 e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ).

Tanto a IL-6 quanto o TNF- $\alpha$  têm sido implicados na resistência à insulina, a qual é considerada o fator chave nas anormalidades da SM. Portanto, a desregulação do eixo HPA pode ocorrer por meio da citocina induzida pela estimulação do sistema noradrenérgico central do estresse.

De acordo com a OMS, uma das maiores causas de adoecimento da população mundial hoje é a depressão, e atualmente, 15% da população do mundo é atingida pela depressão em pelo menos um momento de suas vidas e tanto pode ser afetada por fatores ambientais como por fatores genéticos (GOMES *et al.*, 2010).

Os estudos sobre a base biológica da depressão, apoiados na teoria das monoaminas por mais de três décadas, propõe que a depressão surge em virtude de uma diminuição na disponibilidade de aminas biogênicas cerebrais, particularmente a noradrenalina, a serotonina e a dopamina, suposição esta reforçada pelo conhecimento dos antidepressivos que aumentam a disponibilidade desses neurotransmissores na fenda sináptica (JUVER e VERÇOSA, 2008).

No entanto, muitas discussões ainda estão sendo feitas na tentativa de encontrar explicações mais precisas além da teoria monoaminérgica de depressão e seus desdobramentos, como as cascatas de sinalização intracelular, modulação da expressão dos genes, participação de fatores neurotróficos derivados do cérebro (BDNF), mantendo ainda incerta a etiologia da depressão (VISMARI, ALVES e PALERMO-NETO, 2008). Já foi estudada a maioria dos neurotransmissores conhecidos nos casos de depressão, sendo que a noradrenalina e a serotonina foram os que apresentaram resultados mais objetivos, embora a deficiência de outros hormônios e neurotransmissores possam ter participação em sua gênese e/ou manutenção (JUVER e VERÇOSA, 2008).

De acordo com um estudo realizado por Peet (2004), um consumo exagerado de açúcar refinado foi associado à piora da esquizofrenia e a uma maior prevalência da depressão. Isto parece combinar com outros estudos que demonstraram, segundo Lakhan e Vieira (2008), que a falta de nutrientes dietéticos específicos contribui para o desenvolvimento de transtornos mentais, sendo que vitaminas, minerais e ácidos graxos ômega-3 são frequentemente deficientes na população geral da América e de outros países desenvolvidos, e também são extremamente deficientes em pessoas que sofrem de distúrbios mentais. O uso de suplementos diários de nutrientes essenciais e que contenham aminoácidos, muitas vezes têm se mostrado eficazes na redução de sintomas dos pacientes porque eles são convertidos em neurotransmissores que melhoram a depressão e outros transtornos mentais (LAKHAN e VIEIRA, 2008).

Uma vez que o metabólito da vitamina B<sub>6</sub>, o piridoxal-5' fosfato (PLP) é uma coenzima na via do triptofano para a serotonina, a deficiência de vitamina B<sub>6</sub>, teoricamente pode causar depressão (HVAS *et al.*, 2004). Bioquimicamente, as vitaminas B<sub>6</sub>, o ácido fólico e a vitamina B<sub>12</sub> têm sido associados com a depressão, desempenhando um papel na metilação da homocisteína, proporcionando assim um grupo metil para a conversão da metionina em S-adenosilmetionina, influenciando o metabolismo da serotonina (TIEMEIER *et al.*, 2002; SKARUPSKI *et al.*, 2010). O ácido fólico ainda tem um papel importante na síntese de tetrahydrobiopterina, um co-factor essencial para a hidroxilação de fenilalanina e triptofano, etapas limitantes na

síntese da dopamina, da noradrenalina e da serotonina (BROCARDO *et al.*, 2008).

Um estudo realizado pelo Institute of Food and Health, University College Dublin (UCD) para verificar o impacto do consumo de açúcar adicionado à dieta de 594 crianças e 441 adolescentes irlandeses, concluiu que com o alto consumo de açúcar adicionado à dieta houve uma diminuição significativa de diversos micronutrientes incluindo Mg, Ca, Zn e vitaminas B<sub>12</sub> e C. Neste sentido, o consumo excessivo de açúcar pode induzir à perda nutricional de importantes eletrólitos e vitaminas (JOYCE e GIBNEY, 2008).

Holford (2003) defende que o catabolismo do açúcar adicionado à dieta depende de vitaminas do complexo B do organismo, já que o açúcar branco não possui estas vitaminas suficientemente em sua composição. De fato, as catecolaminas são dependentes de ácido fólico e vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> para serem sintetizadas (HAVS, *et al.*, 2004), sendo que sua deficiência pode levar a uma redução dos níveis desses neurotransmissores (LAKHAN e VIEIRA, 2008).

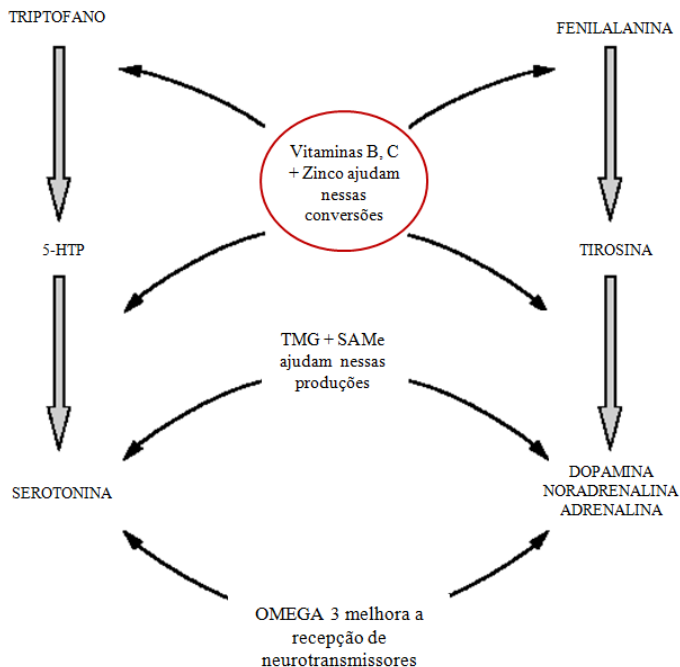
A deficiência de zinco também tem sido associada a uma dieta rica em carboidratos (CESAR, WADA e BORGES, 2005) e a deficiência de triptofano e tirosina, que são aminoácidos precursores da serotonina e da noradrenalina, bem como a deficiência de vitaminas do complexo B (Vitamina B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico) são desequilíbrios comuns da nutrição bem conhecidos por piorar o estado de humor e a motivação (HOLFORD, 2003). Estudos mostram que a depressão unipolar está conectada aos baixos níveis sanguíneos de zinco e apontam o benefício da terapia antidepressiva com suplementação de zinco (NOWAK, *et al.*, 2003).

A figura 1.7 mostra que as vitaminas B, C e o zinco atuam como cofatores tanto na conversão como no controle do equilíbrio dos principais neurotransmissores envolvidos na modulação do humor. A serotonina é produzida a partir do 5-Hidroxitriptofano (5-HTP), que é dependente do aminoácido triptofano proveniente da dieta. Tanto a serotonina quanto as catecolaminas, necessitam de folato e das vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> para serem produzidas. Os níveis elevados de homocisteína aumentam a tendência para a depressão e, para que esses níveis sejam controlados, o folato é requisitado para que ocorra a metilação da homocisteína por meio da S-adenosil-metionina (SAdMe) e

da tri-metil-glicina. Ambos são tipos de aminoácidos doadores do grupo metil (carboxila) (HOLFORD, 2003).

O hipocampo parece ter um papel fundamental na ocorrência da depressão segundo estudos de Campbell e Macqueen (2004) e Scorza, Guerra e Calil (2005) e tem um envolvimento na aprendizagem e consolidação de memórias explícitas e no armazenamento de memórias de curto e longo prazos. Estas características estão relacionadas com a função neurogênica (SKORZA, GUERRA e CALIL, 2005), especialmente na região do giro denteado. A atrofia hipocampal foi verificada em pacientes com depressão crônica (SHELIN, MITTLER e MINTUN, 2002).

O neurotransmissor mais abundante no hipocampo, representando 90% dos neurônios e células granulares, é o glutamato, que exerce um importante papel em mecanismos subjacentes à plasticidade sináptica, os quais fazem parte de processos comportamentais como a cognição e a memória (RUGGIERO *et al.*, 2011). Os 10% restantes são, entre outros, os receptores de noradrenalina e serotonina presentes na região CA1, com projeções dendríticas de células piramidais para a região CA3 e giro denteado. O tratamento com medicamentos antidepressivos promove um aumento nos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no giro denteado e na região CA3 do hipocampo de ratos (CAMPBELL e MACQUEEN, 2004).



**FIGURA 1.7.** Nutrientes recrutados para a produção de neurotransmissores relacionados ao controle do humor. A serotonina é produzida a partir do 5-HTP, convertida a partir do triptofano proveniente da dieta; as catecolaminas são produzidas a partir da tirosina, pela fenilalanina. Esses processos são dependentes de folato, zinco e vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>. Fonte: Holford, 2003.

## 1.8. Proteína Fos

A análise da expressão da imunorreatividade da proteína Fos tem sido uma ferramenta eficaz e utilizada para mapear a ativação neuronal nas células no sistema nervoso central de mamíferos, após uma variedade de estímulos (MATSUDA *et al.*, 1996; MIYATA, NAKASHIMA e KIYOHARA, 1994; FENELON, POULAIN e THEODOSIS, 1993). Embora a proteína Fos seja um marcador sensível para estímulos neuronais agudos, estudos exploraram a possibilidade da expressão persistente da proteína Fos em estimulações crônicas. Miyata

*et al.*, (1994) e Felon, Poulain e Theodosis (1993) analisaram em ratos a atividade da proteína Fos nos núcleos paraventricular (PVN) e supra-óptico (SON). Após estímulo osmótico agudo com injeção hipertônica intraperitoneal, esses pesquisadores verificaram uma atividade transitória da proteína Fos. No entanto, os resultados mostraram também uma ativação Fos-positiva dos neurônios magnocelulares persistente no SON e PVN dos ratos após a estimulação osmótica crônica com privação de água, mesmo 24 horas depois de serem autorizados a beber água de torneira (MIYATA, NAKASHIMA e KIYOHARA, 1994; FENELON, POULAIN e THEODOSIS, 1993).

Outro estudo realizou experimentos para elucidar se a ativação do sistema de recompensa pelo consumo crônico de sacarose causaria modificação na atividade neuronal do sistema central de oxitocina (PVN e SON), por meio da imunorreatividade da proteína Fos, durante 21 dias. Os resultados revelaram que os ratos mantidos com uma dieta crônica de sacarose apresentaram uma porcentagem significativamente menor de células Fos-positivas do que os animais que receberam uma dieta aguda (MITRA *et al.*, 2010).

Estes resultados contradizem a hipótese de que a proteína Fos é expressada apenas transitoriamente e não é útil para estudar os estímulos crônicos (MIYATA *et al.*, 1994).



## 2. JUSTIFICATIVA

Considerando-se que existe uma preferência pelo alimento palatável em animais (Erlanson-Albertsson, 2005; Avena *et al.*, 2008; Rada *et al.*, 2005; Levine *et al.* 2003), neste trabalho procuramos confirmar a preferência pela ração açucarada em detrimento da dieta padrão, disponibilizada aos animais de forma crônica durante um período de 28 dias, buscando também verificar se haveria preferência por determinado tipo de açúcar (sacarose, açúcar branco ou açúcar mascavo).

Além disso, já que dados da literatura relacionam o consumo do açúcar com vários tipos de transtornos comportamentais (agressão, ansiedade, depressão, entre outros) e indicam a influência do açúcar no controle do limiar da dor, nos propusemos a testar se uma dieta açucarada afetaria o comportamento dos ratos, levando-os a um aumento do comportamento tipo-depressivo e/ou alterando o limiar nociceptivo.

Estes são dados preliminares de início de um trabalho. Temos ainda muitas perguntas a serem respondidas.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivos Gerais

Investigar em ratos a escolha pelo consumo de açúcar em detrimento da dieta padrão, bem como a preferência por tipos diferentes de açúcares, e verificar se o consumo crônico do açúcar se relaciona com o comportamento tipo-depressivo e se influencia o controle do limiar da dor.

#### 3.2. Objetivos Específicos

1. Verificar/confirmar se há preferência pelo açúcar em detrimento da dieta padrão.
2. Verificar se há preferência na ingestão entre os tipos de açúcares (sacarose, açúcar branco ou açúcar mascavo) disponibilizados aos animais.
3. Verificar se o consumo crônico do açúcar induz ao comportamento tipo-depressivo e se há diferença entre os grupos que receberam tipos diferentes de açúcares.
4. Verificar se o consumo crônico do açúcar influencia o controle do limiar da dor e se há diferença entre os grupos que receberam tipos diferentes de açúcar.
5. Avaliar a expressão da proteína Fos em algumas áreas encefálicas ligadas ao desenvolvimento da depressão (*locus coeruleus* e hipocampo) pela expressão da proteína Fos.
6. Avaliar a expressão da proteína Fos em algumas áreas encefálicas relacionadas às vias inibitórias da dor (*Locus coeruleus* e Núcleo Magno da Rafe) pela expressão da proteína Fos;
7. Avaliar possíveis alterações no nível glicêmico dos ratos, após o período de ingestão crônica de ração com açúcar.



## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Animais

O experimento foi realizado com 98 ratos *Wistar* machos adultos, com idade média de 80 dias, provenientes do Biotério Central da UFSC. Estes animais foram adaptados ao ambiente experimental durante um período de cinco a sete dias, recebendo ração comercial Nuvilab Cr-1 e água à vontade, em sala climatizada ( $\pm 21^{\circ}\text{C}$ ), com ciclo claro/escuro (12h luzes acesas/12h luzes apagadas). Os ratos foram divididos aleatoriamente em cinco grupos, sendo um grupo controle tratado com ração comercial, outro grupo tratado com ração comercial adoçada com 10 % de sacarose e, finalmente, outros três grupos experimentais submetidos a uma ração comercial adoçada com açúcar branco refinado e/ou açúcar mascavo, conforme desenho experimental, por um período de 28 dias. Para o controle individual da ingestão da dieta, os ratos foram alojados individualmente em gaiolas de polipropileno, dispostas com a maior proximidade possível, distante apenas o suficiente para as gaiolas não se tocarem e, para minimizar o estresse do isolamento, foram utilizadas grades elevadas sobre as caixas, de forma que os animais, ao se levantarem sobre suas patas traseiras, podiam se comunicar visualmente. Todos os animais permaneceram todo o tempo que durou o experimento nos mesmos locais que foram inicialmente alojados, para evitar qualquer interferência adicional, concernente aos sons e cheiros dos ratos vizinhos. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o protocolo PP00465 aprovado em 11/06/2010 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), em conformidade com a lei número 11.794, de outubro de 2008 (lei AROUCA). Os animais foram cuidadosamente monitorados e mantidos em concordância com as recomendações do Conselho de Medicina Veterinária (CMV) e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### 4.2. Dieta

A dieta consistiu de porções de ração comercial (ver composição na tabela 2) umedecida com água potável, preparada na proporção de

um litro de água para cada quilo de ração. Todos os grupos receberam uma porção diária dessa ração umedecida e outra porção de ração umedecida e adoçada com 10% de açúcar, disponibilizadas em copos de vidro fixados ao interior de cada gaiola, de acordo com a seguinte distribuição: Grupo Controle (Ração comercial; N=19); Grupo Sacarose (Ração comercial adoçada com 10% de sacarose; N=19); Grupo Branco (Ração comercial adoçada com 10% de açúcar branco refinado; N=20); Grupo Mascavo (Ração comercial adoçada com 10% de açúcar mascavo; N=20); Grupo Escolha (Ração comercial adoçada com 10% de açúcar branco refinado e ração comercial adoçada com 10% de açúcar mascavo; N=20). A definição do número de ratos por grupo foi efetuada com base em dados da literatura (Avena *et al.*, 2004; Brocardo *et al.*, 2008; Rada *et al.*, 2005). Com o objetivo de observar a preferência por determinado tipo de açúcar, ao grupo Escolha foram disponibilizadas três diferentes porções de ração sendo uma porção de ração comercial umedecida, uma porção de ração adoçada com açúcar branco refinado e outra porção de ração adoçada com açúcar mascavo.

Os ratos foram mantidos com uma dieta diária intermitente com 12 horas de privação seguida de 12 horas de acesso à alimentação, conforme desenho experimental de Avena *et al.* (2009, 2004) e Colantuone *et al.*, (2002). A dieta foi disponibilizada aos animais a partir da quarta hora da fase escura para induzí-los à maior ingestão alimentar. Todos os grupos receberam água à vontade durante todo o período experimental.

O controle da ingestão de ração foi realizado mediante a pesagem da ração (incluindo a água adicionada à ração no momento da preparação, conforme descrito acima) residual, no início de cada manhã. A ingestão de água foi mensurada semanalmente quando se fazia a lavagem do frasco e a reposição da água, e o peso corporal, também era aferido semanalmente.

No cálculo do consumo de calorias foi considerado o total ingerido pelos ratos, somando-se tanto as calorias contidas na ração padrão, baseando-se nas informações fornecidas pela empresa Nuvital Nutrientes S/A, quanto as calorias da ração adoçada, incluindo aquelas contidas na sacarose, no açúcar branco refinado e no açúcar mascavo, de acordo com a dieta de cada grupo experimental.

O grupo Escolha foi observado e analisado somente com o objetivo de verificar se haveria preferência por determinado tipo de açúcar (açúcar branco ou açúcar mascavo).

<b>NUVILAB CR-1</b>	
<p><b>Composição básica do produto:</b></p> <p>Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico-mineral e de aminoácidos.</p>	<p><i>Valor calórico:</i> ..... 3,71 kcal/g</p> <p><i>Valor protéico:</i> ..... 19,9 g/%</p>
<b>Enriquecimento por quilo de produto:</b>	
<p><i>Vitaminas</i></p> <p>Vitamina A ..... 12.000UI</p> <p>Vitamina D3 ..... 1.800 UI</p> <p>Vitamina E ..... 30,0 UI</p> <p>Vitamina K3 ..... 3,0 mg</p> <p>Vitamina B1 ..... 5,0 mg</p> <p>Vitamina B2 ..... 6,0 mg</p> <p>Vitamina B6 ..... 7,0 mg</p> <p>Vitamina B12 ..... 20,0 mcg</p> <p>Niacina ..... 60,0 mg</p> <p>Ácido Pantotênico ..... 20,0 mg</p> <p>Ácido fólico ..... 1,0mg</p> <p>Biotina ..... 0,05 mg</p> <p>Colina ..... 600,0 mg</p>	<p><i>Microelementos minerais:</i></p> <p>Ferro ..... 50,00 mg</p> <p>Cobre ..... 10,00 mg</p> <p>Zinco ..... 60,00 mg</p> <p>Manganês ..... 60,00 mg</p> <p>Cobalto ..... 1,50 mg</p> <p>Iodo ..... 2,00 mg</p> <p>Selênio ..... 0,05 mg</p>
<p><i>Aditivos</i></p> <p>Antioxidante ..... 100,00 mg</p>	<p><i>Aminoácidos</i></p> <p>Lisina ..... 100,00 mg</p> <p>Metionina ..... 300,00 mg</p>

**TABELA 2** – Composição básica da ração industrializada específica para ratos (Nuvilab CR-1 -Nuvital®)

### 4.3. Testes Comportamentais

#### 4.3.1. Medida do comportamento tipo-depressivo no Teste do Nado Forçado (TNF)



**FIGURA 4.3.1.** Teste do Nado Forçado (TNF)

O teste do nado forçado é um dos modelos mais tradicionais para o estudo do comportamento tipo-depressivo (desespero comportamental) em animais de laboratório, por apresentar alto valor preditivo devido à resposta aos medicamentos antidepressivos existentes. A depressão em ratos é muito difícil de ser estudada, por isso foram desenvolvidos modelos comportamentais para testar comportamentos tipo-depressivos em animais, como o TNF, por exemplo.

Proposto inicialmente por Porsolt e colaboradores, em 1977, os roedores são expostos a uma situação aversiva, nadar em um tanque cilíndrico com água, onde eles não podem tocar o fundo do cilindro ou fugir (escape). Com o tempo os animais percebem que não têm como sair do local e desenvolvem uma postura de imobilidade. O teste é



filmado e avaliam-se os períodos de imobilidade e natação por um período de 5 minutos.

No primeiro dia, após o final do período de 28 dias em que os animais permaneceram em dieta experimental, de acordo com o protocolo já descrito, os animais dos grupos Controle, Sacarose, Branco e Mascavo foram colocados individualmente em tanques de PVC (60 cm de altura por 30 cm de diâmetro) contendo água aquecida a uma temperatura de 25°C (MEZADRI *et al.*, 2011). Nestas condições, os ratos não podiam tocar o fundo do tanque. A primeira sessão (pré-teste) foi realizada colocando o rato para nadar por 15 minutos e ao final da sessão o animal foi retirado do tanque, seco com uma toalha e secador com ar quente e devolvido à gaiola. Vinte e quatro horas depois, todos os animais foram submetidos a uma nova sessão de natação com duração de 5 minutos (teste), que foi monitorada por uma câmera de vídeo para posterior análise etológica do nado forçado.

O comportamento tipo depressivo foi medido em termos de duração total da imobilidade (quando o rato flutua na água ou quando realiza movimentos apenas para manter a cabeça acima do nível da água), de mergulho (quando o animal tenta fugir pelo fundo do tanque) e da latência para a imobilidade (tempo decorrido desde que o animal é colocado na água até o primeiro comportamento de imobilidade observado).

Após o teste os animais foram devolvidos às suas gaiolas e no dia seguinte foram submetidos ao teste de Von Frey.

### 4.3.2. Medida do Limiar da Dor - Teste dos Filamentos de Von Frey Mecânico



**FIGURA 4.3.2.** Teste dos filamentos de Von Frey

No dia seguinte, 24 horas após o teste de TNF, os ratos dos grupos Controle, Sacarose, Branco e Mascavo foram submetidos ao teste dos filamentos de Von Frey para testar sua sensibilidade mecânica. Para a realização deste teste os ratos foram colocados em um aparato dividido em dez compartimentos, sendo um para cada animal, separados por parede acrílica e assoalho de tela metálica, medindo 12x20x20cm cada um, apoiados em superfície elevada de madeira.

Os ratos foram colocados individualmente no aparato, após ambientação prévia de 30 minutos, e os estímulos foram aplicados utilizando-se os filamentos de Von Frey (North Coast Medical, Inc, USA) de 10 a 100 g, em ordem crescente de pressão sob a superfície plantar da pata posterior direita de cada animal. A força da pressão é verificada pelo abaulamento da fibra e foi aplicada uma vez em cada animal durante 6-8 segundos. Foram consideradas como respostas positivas aquelas em que o animal realizou o movimento de retirada da pata durante a estimulação e foram desconsideradas as respostas seguidas de caminhada. Este teste foi realizado sempre no período da manhã, em ambiente silencioso.

Após o teste, os animais foram devolvidos às suas gaiolas e no dia seguinte foram sacrificados após serem profundamente anestesiados

e posteriormente, submetidos à perfusão para a remoção dos encéfalos para a análise imunoistoquímica.

#### **4.4. Atividade neuronal - imunorreatividade à proteína Fos**

Após o período de 28 dias recebendo a dieta experimental com os diferentes açúcares, conforme protocolo exposto acima, e 24 horas depois de realizada o último teste comportamental (Von Frey), 4 animais de cada grupo foram aleatoriamente selecionados para a realização da imunoistoquímica para Fos.

Os ratos dos grupos Controle, Sacarose, Branco e Mascavo foram estudados para a detecção da proteína Fos no Locus coeruleus (LC) (Figura 4.4.1), núcleo magno da Rafe (MRN) (Figura 4.4.2), ambas as estruturas, LC e MRN (Vitor *et al*, 2008), relacionadas às vias descendentes inibitórias da dor. Também foram analisadas as regiões CA1, CA3 e o Giro Denteado do hipocampo (Figura 4.4.3), áreas relacionadas ao processamento de informação da dor (Liu *et al*, 2012) e à neurogênese (Campbell *et al.*, 2004; Skorza *et al.*, 2005;). Os animais foram profundamente anestesiados com xilasina (0,1 mL/100g peso corporal) e cetamina (0.1 ml/100g peso corporal, i.p.), utilizando como critério de determinação da anestesia o pinçamento da pata até que o animal não apresentasse reflexo algum, para que a perfusão transcardíaca fosse realizada (injetado 150 mL de solução salina, seguido de paraformaldeído a 4% diluído em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4; 150 ml). Em seguida, os encéfalos foram removidos da caixa craniana e permaneceram em solução fixadora (paraformaldeído 4% tamponado) por 8 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, os encéfalos foram crioprotégidos em solução de sacarose a 30% a 4°C.

A seguir, os encéfalos foram seccionados em cortes coronais de 50 µm de espessura em criostato da marca Leica, modelo CM1850-UV, sendo coletados em *ependorfs* (2 mL) contendo uma solução anticongelamento (PBS, água destilada, sacarose, propilenoglicol - Vetec, Brasil) e armazenados em freezer com temperatura de -70°C até o dia da imunoistoquímica para Fos. Todos os encéfalos foram processados juntos para a detecção da proteína Fos utilizando o método avidina-biotina-peroxidase, conforme Cezario *et al.* (2008). Os cortes dos encéfalos foram lavados 3 vezes em tampão PBS, durante 10

minutos cada vez e incubados em solução tampão com Triton X-100 (Sigma Chemicals Company, EUA), soro normal de cabra e anticorpo anti-Fos feito em coelho (Ab-5; Calbiochem, USA) em uma diluição de 1:20.000 durante 48h a 4°C de temperatura e sob agitação contínua.

Após esse período, os cortes foram incubados durante 90 minutos à temperatura ambiente em uma solução de 1:250 de anticorpo biotilado IgG de cabra anticoelho (Vector Laboratories, USA) e depois foram misturados em uma solução contendo complexo de avidina-biotina peroxidase na diluição de 1:200 (ABC Elite Kit; Vector Laboratories, EUA) durante o mesmo período de tempo. A visualização do complexo da peroxidase foi observada durante exposição de 10 minutos em uma solução de cromógeno contendo 0,02% de 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemicals Company, EUA) com 0,3% de sulfato de níquel em 0,05 M de tampão Tris (pH 7,6), seguida pela incubação durante 5 minutos em uma solução 0,01% de glicose oxidase (Glicose Oxidase Tipo VII de *Aspergillus Niger*, Sigma Chemicals Company, EUA) e 10% de p-D-glicose (Sigma Chemicals Company, Saint Louis, EUA) para produzir um resultado azul escuro.

Para o controle negativo da reação, alguns cortes foram randomicamente processados omitindo-se o anticorpo primário. Em seguida, todos os cortes foram lavados com tampão PBS, coletados em lâminas previamente gelatinizadas, desidratados em etanol, clarificados com xilol e montados com Entellan.

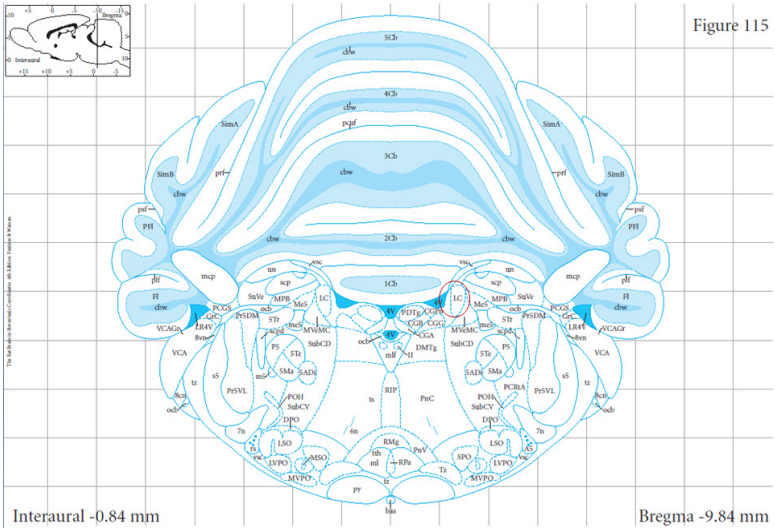
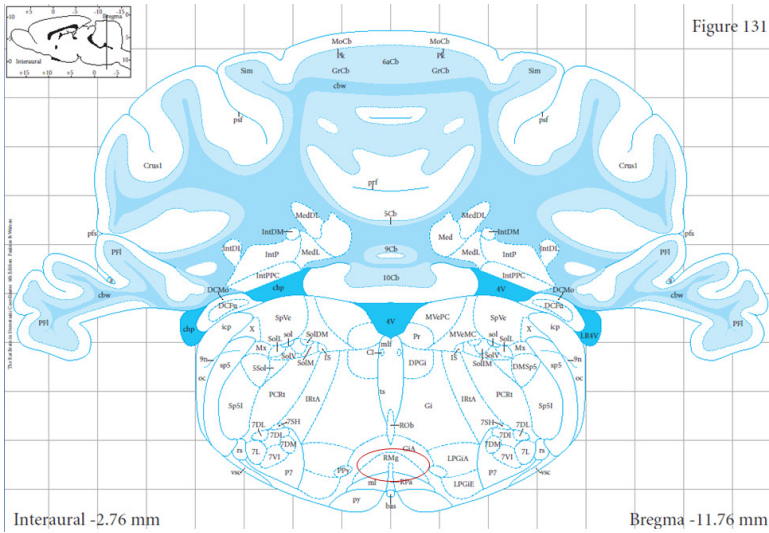
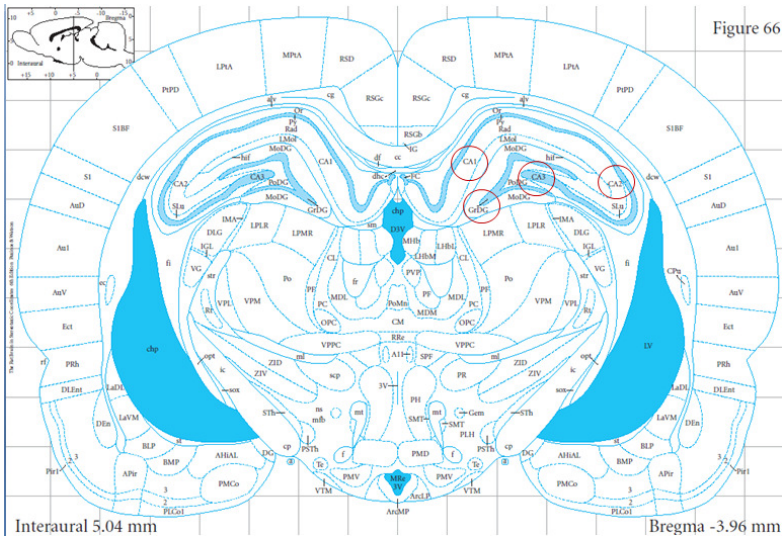


Figure 115

**FIGURA 4.4.1.** Localização do *Locus coeruleus* (LC) analisado nos ensaios imuno-histoquímicos (ilustrações adaptadas de Paxinos & Watson, 2007).



**FIGURA 4.4.2.** Localização do Núcleo Magno da Rafe (NMR) analisado nos ensaios imuno-histoquímicos (ilustrações adaptadas de Paxinos & Watson, 2007).



**FIGURA 4.4.3.** Localização das áreas CA1, CA2, CA3 e GD do hipocampo analisadas nos ensaios imuno-histoquímicos (ilustrações adaptadas de Paxinos & Watson, 2007).

#### **4.4.1. Quantificação de células Fos-positivas**

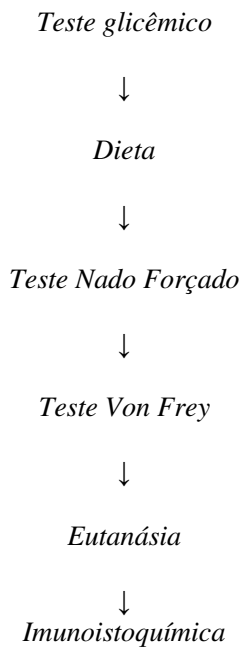
As estruturas encefálicas estudadas foram identificadas de acordo com o atlas do encéfalo de ratos (Paxinos e Watson, 1998). Para a quantificação das células marcadas imunoistoquimicamente para proteína Fos, foi utilizado um microscópio da marca Olympus modelo BX41, com uma lente de 40X e uma câmera de captura de imagem digital colorida com 3.3 mpxel, QColor 3C da Q-imaging, acoplada a um computador, no qual foi instalado o programa de captura de imagens Q-capture Pro 5.1, da Q-imaging. A contagem dos neurônios de cada região foi realizada em ambos os hemisférios, direito e esquerdo, usando uma área teste de  $2.100 \mu\text{m}^2$ . Foram contados os neurônios que se encontravam dentro desta área teste e aqueles que se posicionavam sobre duas linhas previamente definidas como linhas permitidas. Os neurônios que incidiam sobre as duas outras linhas (linhas proibidas) não foram contados (Camozzato *et al.*, 2009; Winkelmann-Duarte *et al.*, 2011). Os cortes de cada estrutura foram realizados em 4 séries ao longo de toda a sua extensão, com um intervalo de  $200 \mu\text{m}$ , ou seja, a cada quatro cortes de  $50 \mu\text{m}$  um foi analisado. Os dados representam a média do número de neurônios de cada estrutura dentro da área teste.

#### **4.5. Análise do nível glicêmico sanguíneo**

A avaliação do nível glicêmico foi realizada através de testes com tiras reativas da marca *Accu-Chek Performa*, do laboratório Roche, próprias para a determinação da glicemia. Todos os ratos foram submetidos ao teste no início do experimento, antes que a dieta fosse disponibilizada e os testes foram repetidos ao final do período com a dieta experimental.



## Protocolo Experimental



**FIGURA 4.5.** Esquema com a sequência das atividades do experimento.

#### **4.6. Análise Estatística**

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando a ANOVA.

Para as variáveis em que as unidades amostrais foram observadas ao longo do tempo (Consumo de Ração, Consumo de Água, Consumo de Calorias e Peso Corporal), a comparação entre os tratamentos foi realizada utilizando a metodologia de análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas, bem como a ANOVA de uma via. Este mesmo modelo avaliou o efeito de tratamento, efeito de tempo e efeito de interação tratamento versus tempo.

Para as variáveis em que a resposta observada foi uma contagem de tempo ou de frequência de respostas (Teste de Von Frey, TNF, Imunoistoquímica e Avaliação glicêmica), a comparação dos tratamentos foi feita utilizando a ANOVA de uma via.

Quando significativa, a ANOVA foi seguida do teste de Dunnett-Hsu ou Newman Keuls, conforme o caso. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de  $p < 0,05$ .

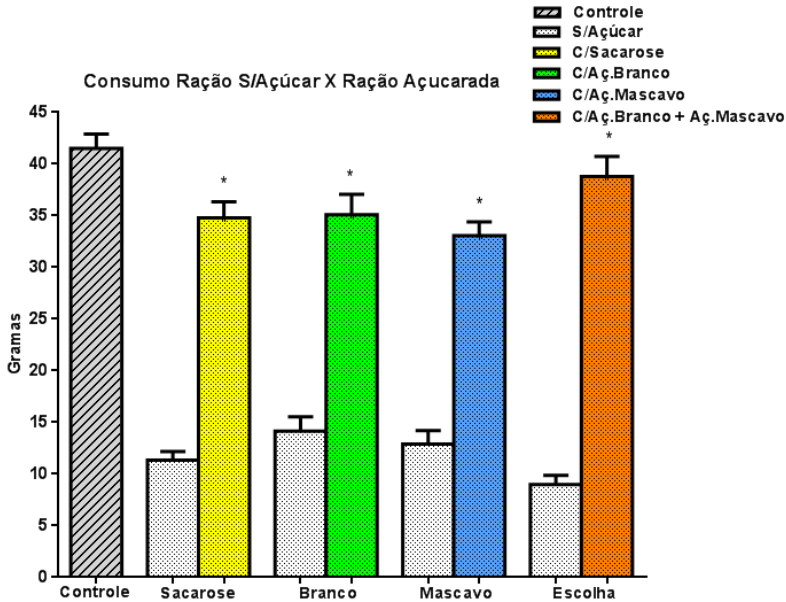
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Consumo de ração e água

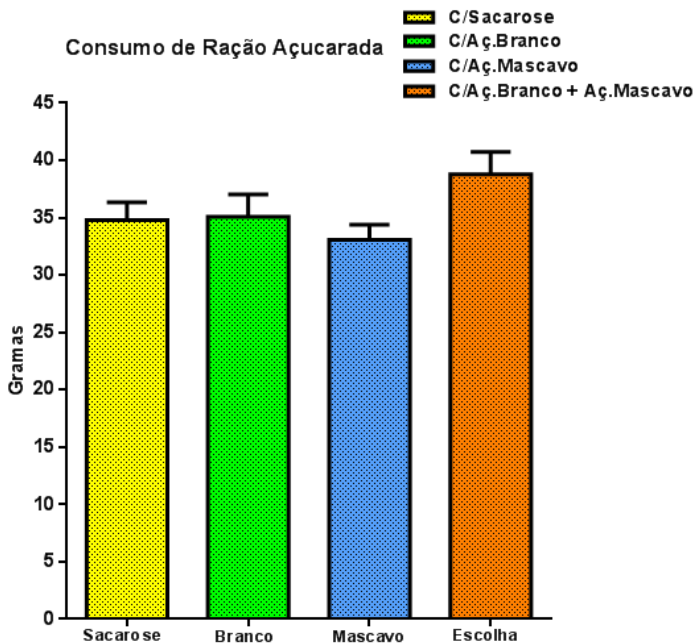
#### 5.1.1. Avaliação do consumo de ração com açúcar e sem açúcar

Como descrito anteriormente, cada grupo experimental - Sacarose, Branco, Mascavo e Escolha - era formado por ratos que tiveram opção por ração com açúcar ou sem açúcar. Conforme a metodologia utilizada para medir a quantidade de ração consumida pelos animais, foi verificado nesses grupos que o consumo de ração sem açúcar foi significativamente menor do que o consumo de ração açucarada em comparação com o grupo Controle. Os resultados da ANOVA de uma via apresentaram nitidamente a preferência de todos os grupos experimentais pela dieta palatável em detrimento da ração sem açúcar (Figura 5.1.1A; \*  $p < 0,05$ ), sendo que os histogramas coloridos em amarelo, verde, azul e vermelho estão representando o consumo significativamente maior de ração açucarada em comparação com o consumo de ração sem açúcar, o qual é representado pelos histogramas cor cinza. O histograma referente ao grupo Controle demonstra o consumo de ração sem açúcar por este grupo. O consumo de ração açucarada pelos grupos experimentais foi semelhante, como pode ser verificado na figura 5.1.1B ( $p < 0,05$ ). Entretanto, ao ser comparado o consumo total de ração (ração sem açúcar mais ração com açúcar) entre os grupos experimentais, notamos que os grupos Branco e Escolha apresentaram um consumo maior quando comparados ao grupo Controle (Figura 5.1.1C; \*  $p < 0,05$ ).

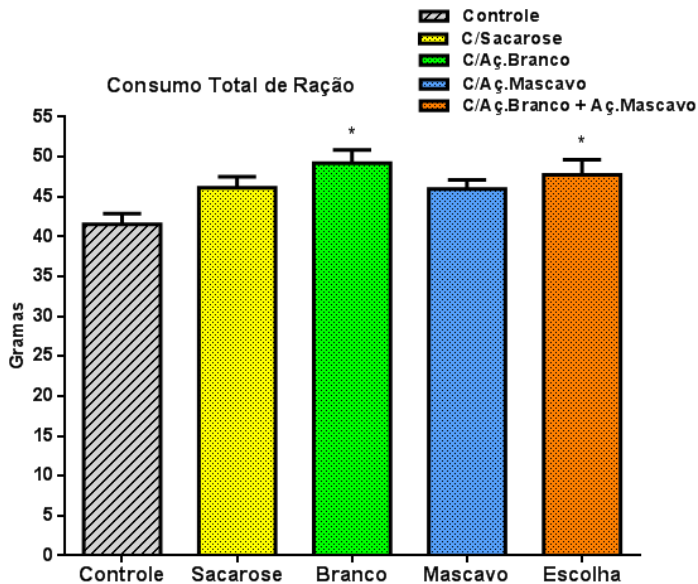
O ajuste de um modelo de análise de variância para medidas repetidas, para o consumo semanal de ração sem açúcar, mostrou efeito significativo de tratamento (valor da Estatística F: 140,17), de semana (valor da Estatística F: 8,43) e de interação tratamento versus semana (valor da Estatística F: 2,74). Para identificar a combinação tratamento versus semana que mostraram significância estatística foi utilizado o teste Dunnett-Hsu comparando com o grupo Controle (Figura 5.1.1D;  $p < 0,05$ ).



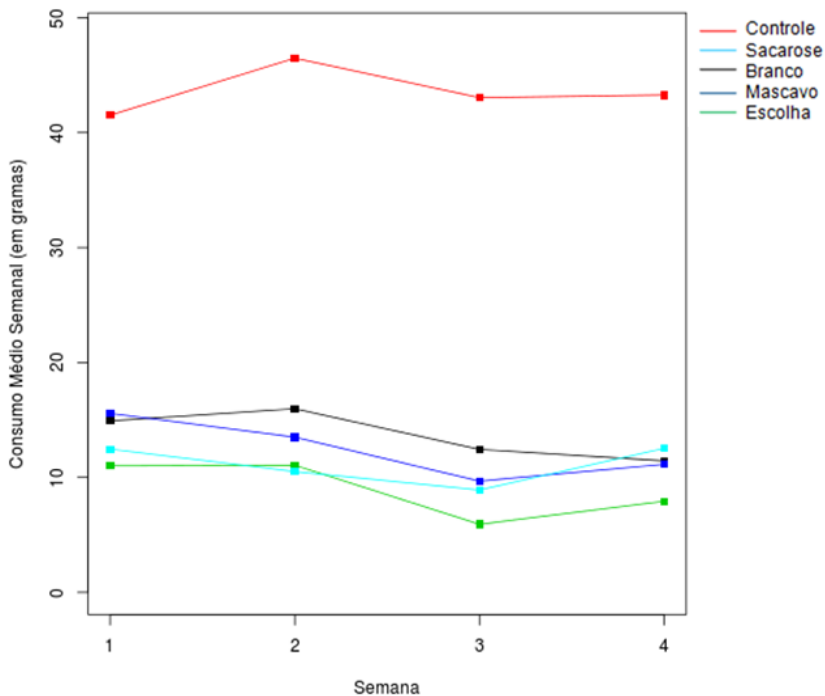
**FIGURA 5.1.1A.** Preferência pela ração com açúcar demonstrada durante o consumo alimentar pelos grupos que receberam ração com os diferentes tipos de açúcares. As partes dos histogramas em cor cinza representam o consumo de ração sem açúcar e as partes em amarelo, verde, azul e vermelho representam respectivamente o consumo de ração com sacarose, açúcar branco refinado, açúcar mascavo e grupo Escolha. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. \*  $p < 0,05$  contra o consumo de ração sem açúcar.



**FIGURA 5.1.1B.** Consumo de ração açucarada pelos grupos que receberam ração com os diferentes tipos de açúcares. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls.  $p < 0,05$  contra o consumo de ração sem açúcar.



**FIGURA 5.1.1C.** Consumo total de ração (ração sem açúcar mais ração açucarada) pelos grupos. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. \*  $p < 0,05$  contra o consumo de ração sem açúcar.



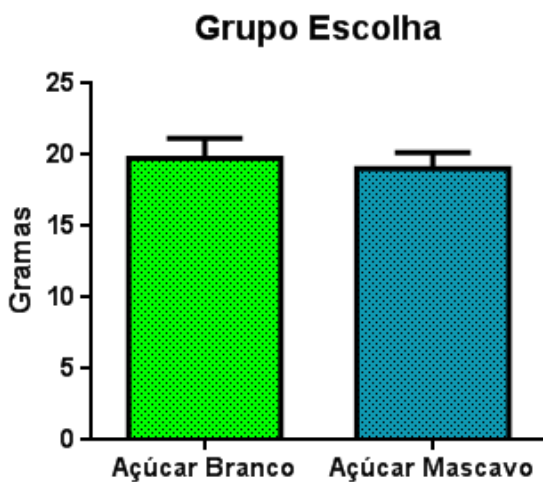
**FIGURA 5.1.1D.** Consumo semanal de ração padrão (sem açúcar). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de medidas repetidas mostrando efeito ( $p < 0,05$ ) de semana, de tratamento e da interação tratamento versus semana, seguido do pós-teste de Dunnnett-Hsu, \*  $p < 0,05$  contra o grupo controle.

### 5.1.2. Comparação do consumo de ração com os diferentes tipos de açúcar

O grupo Escolha que, além da ração sem açúcar, também recebeu opção de escolha entre ração com açúcar branco e ração com açúcar mascavo, consumiu porções equivalentes destes açúcares, mostrando que não há preferência por nenhum deles. Portanto, independentemente do tipo de açúcar oferecido, a ANOVA de uma via não mostrou

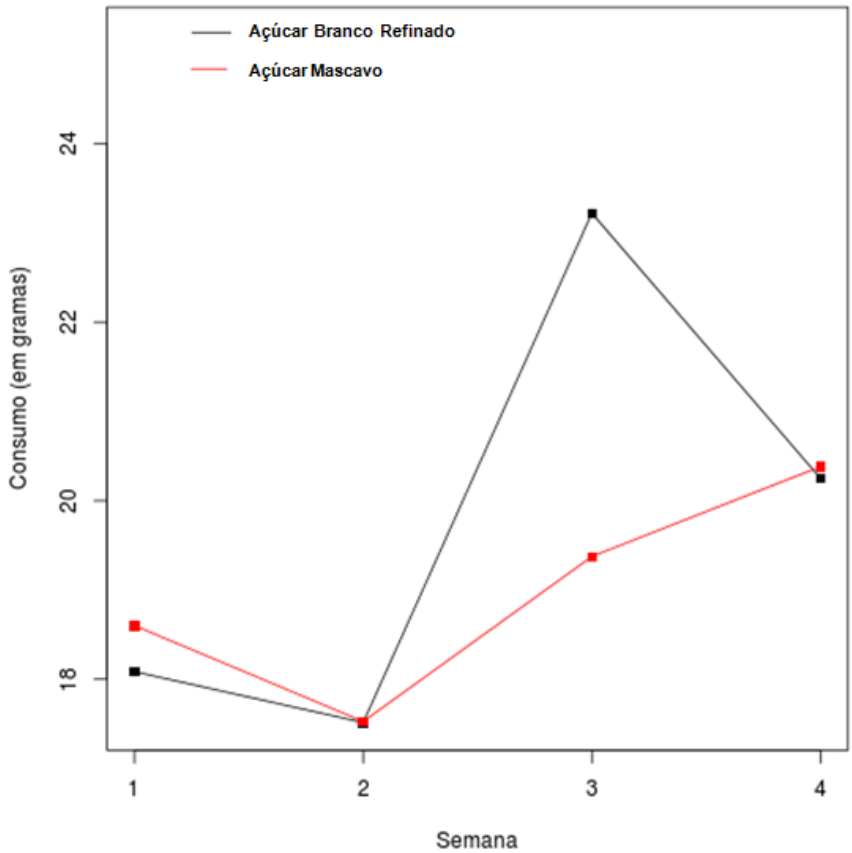
diferença no consumo dos tipos diferentes de açúcares entre os grupos experimentais, como mostram os histogramas coloridos da figura 5.1.2A.

O ajuste de um modelo de ANOVA para medidas repetidas, comparando o consumo de ração com açúcar branco refinado com o consumo de ração com açúcar mascavo pelo grupo Escolha, mostrou apenas efeito significativo (Figura 5.1.2B;  $p < 0,05$ ) de semana (valor da Estatística F: 4,96). O pós-teste utilizado foi o teste Tukey-Kramer.



**FIGURA 5.1.2A.** Consumo de ração açucarada pelo grupo Escolha. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls, considerando significativo o valor de  $p < 0,05$ .





**FIGURA 5.1.2B.** Consumo semanal de ração açucarada pelo grupo Escolha. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de medidas repetidas mostrando apenas efeito significativo de semana, seguido do pós-teste de Tukey-Kramer,  $p < 0,05$ .

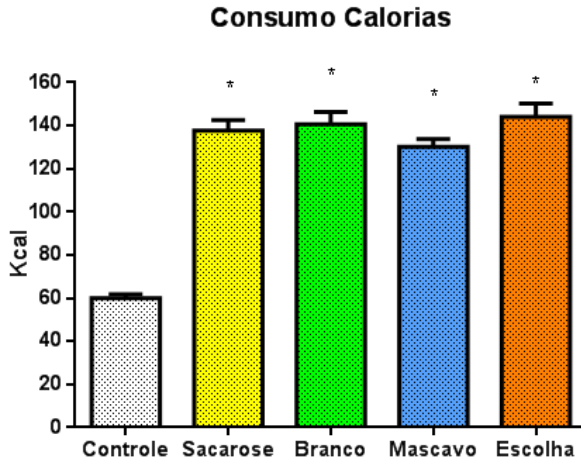
### **5.1.3. Comparação do consumo em calorias e avaliação da variação da massa corporal**

O alto consumo de ração com açúcar resultou num maior consumo de calorias pelos grupos Sacarose, Branco, Mascavo, Escolha, como mostra a Figura 5.1.3A, uma média de 28,18% mais calorias que o grupo Controle.

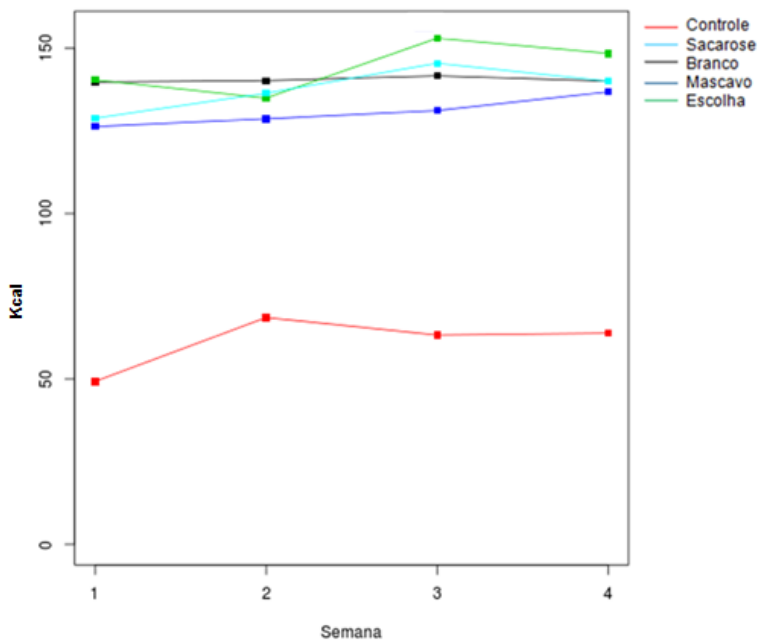
O ajuste de um modelo de ANOVA para medidas repetidas, para o consumo em calorias, mostrou efeito significativo (Figura 5.1.3B;  $p < 0,05$ ) de tratamento (Valor da Estatística F: 136,32), semana (valor da Estatística F: 7,43) e da interação tratamento versus semana (valor da Estatística F: 6,73). Para identificar a combinação tratamento versus semana que mostraram significância estatística foi utilizado o teste Dunnett-Hsu comparando com o grupo Controle.

Apesar do maior consumo de calorias pelos grupos que ingeriram ração com açúcar, a ANOVA de uma via não mostrou diferença no aumento do peso corporal desses animais comparado ao grupo Controle ( $p < 0,05$ ; Figura 5.1.3C).

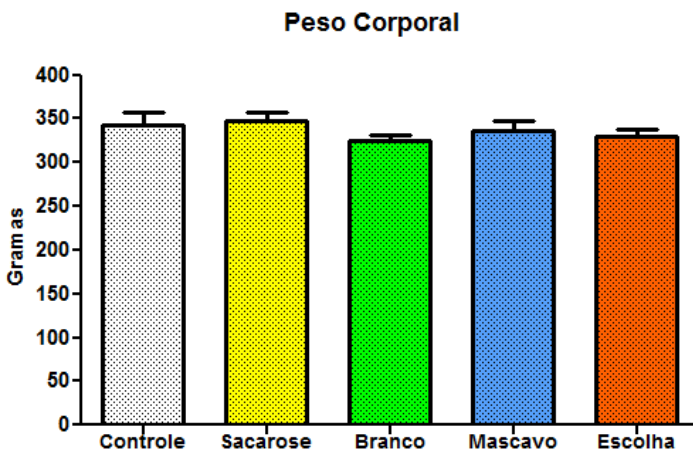
A figura 5.1.3D mostra o ajuste de um modelo de ANOVA para medidas repetidas, para o peso corporal semanal dos grupos, indicando efeitos estatisticamente significativos de base (valor da Estatística F: 1.353,81), de tratamento (valor da Estatística F: 4,85) e de semana (valor da Estatística F: 85,2), mas não de interação entre tratamento versus semana. O pós-teste utilizado foi o teste Tukey-Kramer, comparando com o grupo Controle.



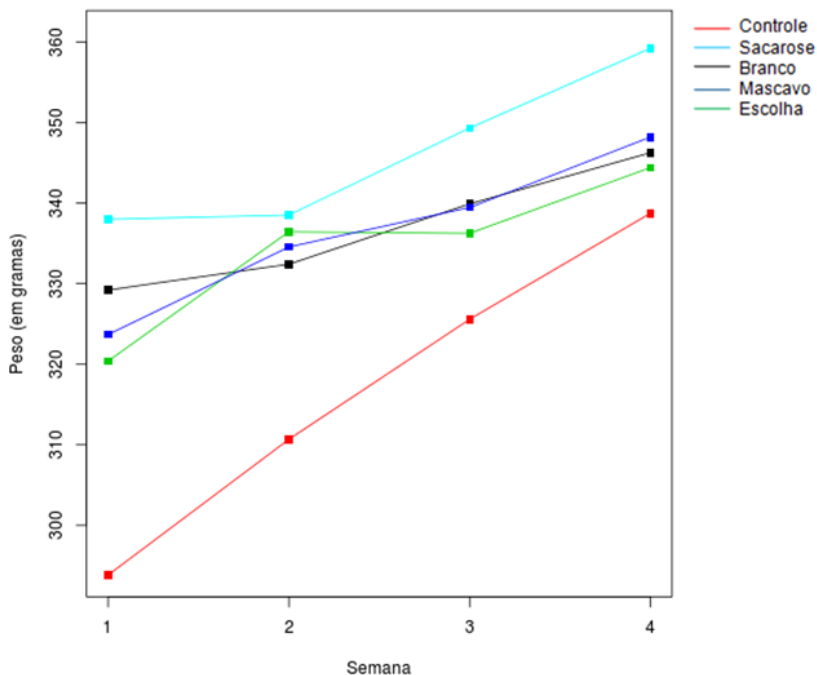
**FIGURA 5.1.3A.** Consumo de calorias. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais, somando-se as calorias da ração padrão com as calorias do tipo de açúcar adicionado; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls, \*  $p < 0,05$  contra o grupo controle.



**FIGURA 5.1.3B.** Consumo semanal de calorias. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de medidas repetidas mostrando efeito significativo de semana, de tratamento e de interação entre semana e tratamento, seguido do pós-teste de Dunnett-Hsu,  $p < 0,05$  contra o grupo controle.



**FIGURA 5.1.3C.** Peso corporal. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls, considerando significativo o valor de  $p < 0,05$  contra o grupo controle.

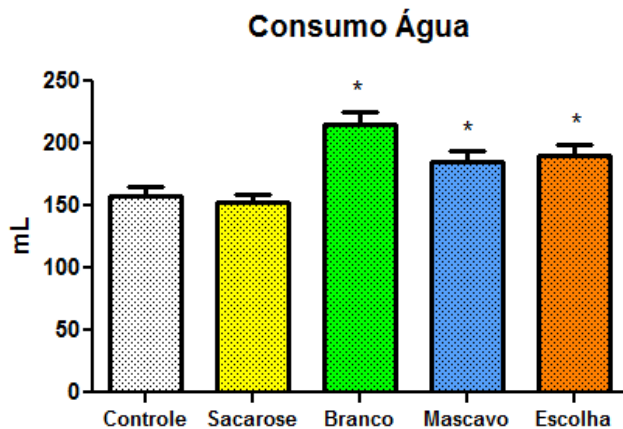


**FIGURA 5.1.3D.** Peso corporal semanal. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP) dos grupos de animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de medidas repetidas mostrando efeito significativo de base, de tratamento e de semana, mas não de interação entre tratamento versus semana, seguido do pós-teste de Tukey-Kramer,  $p < 0,05$  contra o grupo Controle.

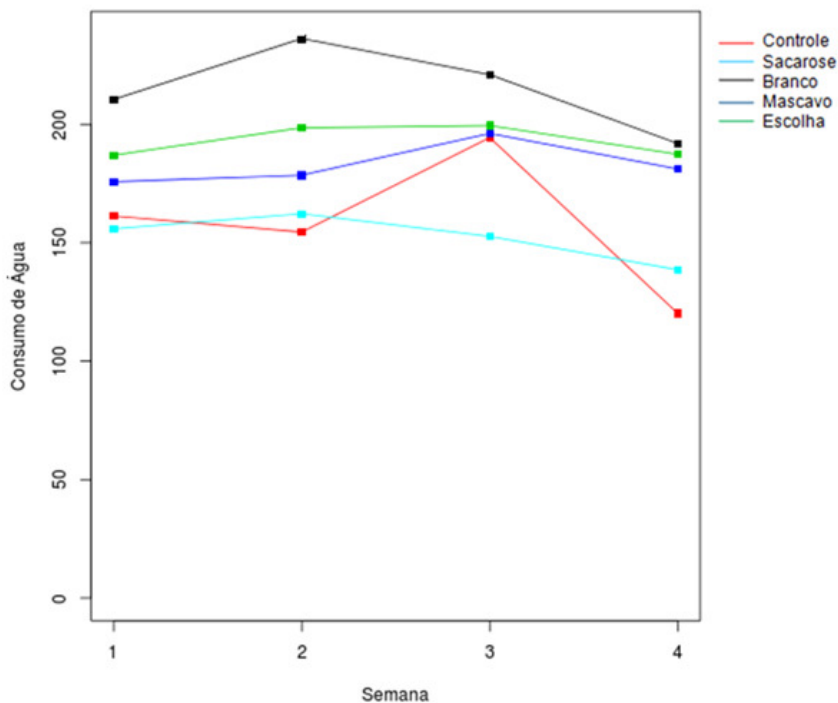
#### 5.1.4. Avaliação do consumo semanal de água

A ANOVA de uma via mostrou que a média do consumo semanal de água foi significativamente maior nos grupos Branco, Mascavo e Escolha em relação ao controle e ao grupo Sacarose ( $p < 0,05$ ; Figura 5.1.4A). O ajuste de um modelo de análise de variância para medidas repetidas, para o consumo semanal de água mostrou efeito significativo (Figura 5.1.4B;  $p < 0,05$ ) de tratamento (valor da Estatística F: 8,51), semana (valor da Estatística F: 14,54) e da interação tratamento versus semana (valor da Estatística F: 5,46). Para identificar

a combinação tratamento versus semana que mostraram significância estatística foi utilizado o teste Dunnett-Hsu comparando com o grupo Controle.



**FIGURA 5.1.4A.** Consumo de água. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls, \*  $p < 0,05$  contra o grupo controle.



**FIGURA 5.1.4B.** Consumo semanal de água em mL por grupo de animais. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de medidas repetidas mostrando efeito significativo de tratamento, de semana e de interação entre tratamento versus semana, seguido do pós-teste de Dunnett-Hsu,  $p < 0,05$  contra o grupo Controle.

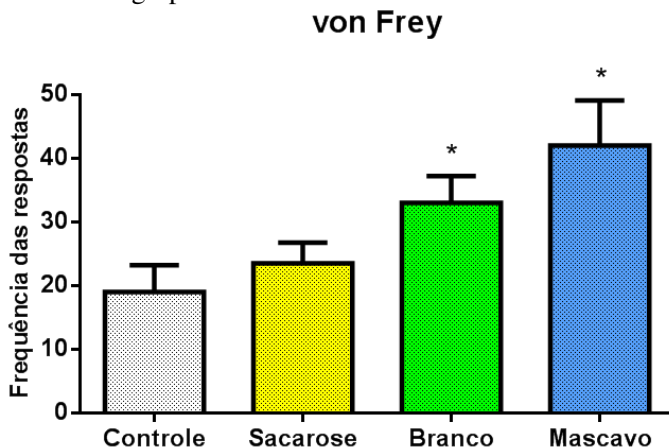
## 5.2. Testes comportamentais

### 5.2.1. Teste dos filamentos de Von Frey

O teste com filamentos de Von Frey mostrou que os grupos Branco (Média e Desvio Padrão:  $3,30 \pm 1,34$ ) e Mascavo (Média e Desvio Padrão:  $4,20 \pm 2,25$ ) apresentaram maior número de respostas em comparação com o grupo Controle (Média e Desvio Padrão:  $1,90 \pm 1,89$ ), e o grupo Sacarose (Média e Desvio Padrão:  $2,35 \pm 1,46$ ) que



apresentou número de respostas aos estímulos do teste semelhante ao grupo Controle ( $p < 0,05$ ; Figura 5.2.1), significando que o consumo de açúcar branco ou mascavo teve alguma participação na diminuição do limiar da dor dos grupos Branco e Mascavo.



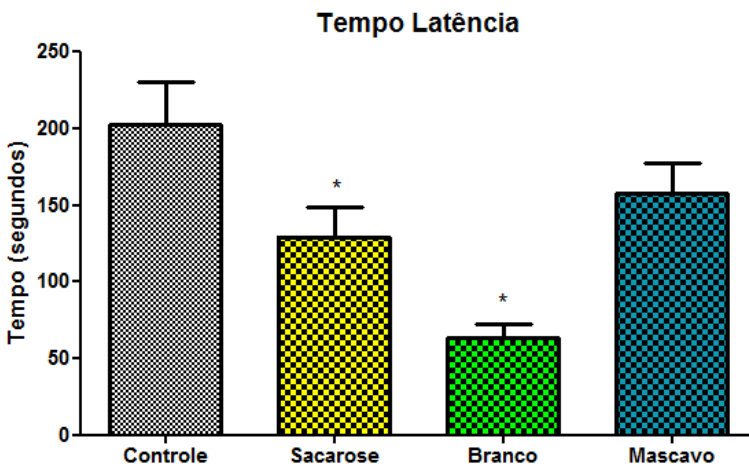
**FIGURA 5.2.1.** Respostas ao teste de sensibilidade mecânica aos filamentos de Von Frey em ratos submetidos às dietas padrão e com diferentes tipos de açúcares. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls, \*  $p < 0,05$  contra o grupo controle.

### 5.2.2. Teste do Nado Forçado

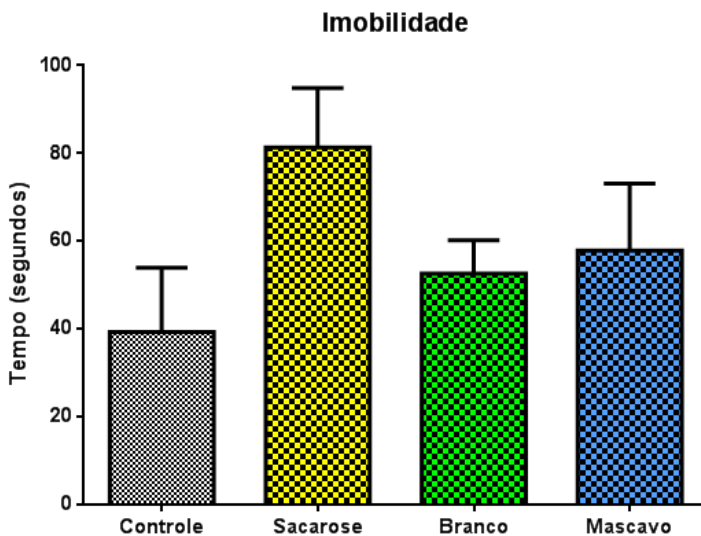
A avaliação do comportamento tipo-depressivo no Teste do Nado Forçado mostrou que os grupos Sacarose (Média e Desvio Padrão: 129,30  $\pm$  60,91) e Branco (Média e Desvio Padrão: 63,31  $\pm$  29,13) apresentaram menor tempo de latência (período de tempo que é cronometrado a partir do momento em que o animal é colocado na água até que apresente o primeiro comportamento de imobilidade) quando comparados aos grupos Controle (Média e Desvio Padrão: 202,71  $\pm$  86,28) e Mascavo (Média e Desvio Padrão: 157,75  $\pm$  60,34) (Figura 5.2.2A; \*  $p < 0,05$ ). Da mesma forma, na análise dos comportamentos de imobilidade (Média e Desvio Padrão: Controle 8,20  $\pm$  9,98; Sacarose 33,20  $\pm$  23,32; Branco 38,00  $\pm$  8,35; Mascavo 23,44  $\pm$  16,02) e de

natação (Média e Desvio Padrão: Controle  $9,70 \pm 10,18$ ; Sacarose  $33,60 \pm 22,75$ ; Branco  $39,50 \pm 8,91$ ; Mascavo  $23,89 \pm 15,23$ ) os dados também mostraram que os grupos Sacarose e Branco foram estatisticamente mais frequentes quando comparados aos grupos Controle e Mascavo ( $p < 0,05$ ; Fig.5.2.2C e D), embora o tempo total de imobilidade não tenha mostrado diferença significativa (Média e Desvio Padrão: Controle  $39,31 \pm 46,34$ ; Sacarose  $81,33 \pm 42,76$ ; Branco  $52,63 \pm 23,89$ ; Mascavo  $57,85 \pm 45,79$ ;  $p < 0,05$ ; Figura 5.2.2B), comparados ao grupo Controle.

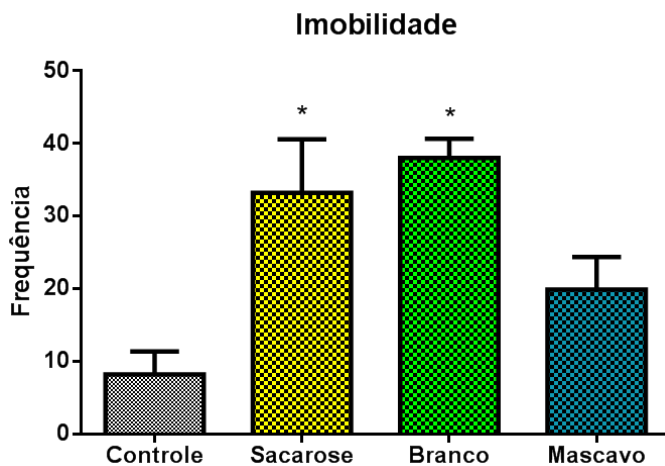
Os comportamentos de escaladas (*climbing*), aquele em que o animal se movimenta vigorosamente com as patas dianteiras, geralmente em direção às laterais do tanque (LINO-de-OLIVEIRA, LIMA e CAROBREZ, 2005) como se procurasse escalar a parede do tubo na tentativa de escapar, não apresentou diferença significativa em relação ao grupo Controle (Média e Desvio Padrão: Controle  $1,20 \pm 1,23$ ; Sacarose  $0,50 \pm 0,53$ ; Branco  $0,90 \pm 0,57$ ; Mascavo  $0,56 \pm 0,73$ ;  $p < 0,05$ ; Figura 5.2.2E). No entanto, os grupos Sacarose, Branco e Mascavo gastaram significativamente menor tempo que o grupo Controle, mergulhando e explorando o fundo do tubo (Média e Desvio Padrão: Controle  $15,08 \pm 14,50$ ; Sacarose  $3,39 \pm 5,95$ ; Branco  $4,99 \pm 7,46$ ; Mascavo  $2,90 \pm 5,07$ ;  $p < 0,05$ ; Figura 5.2.2F).



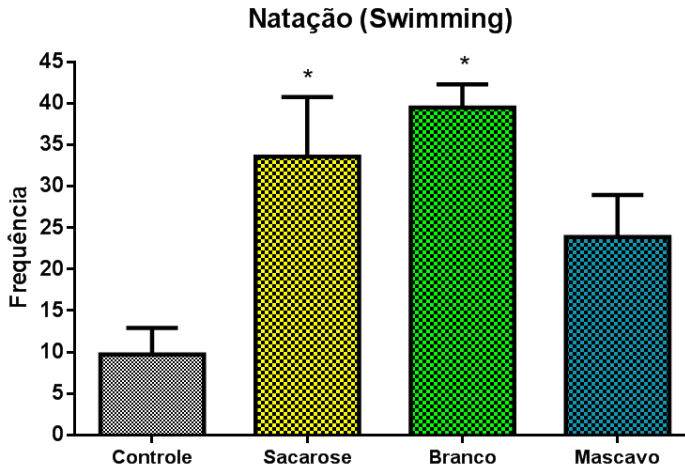
**FIGURA 5.2.2.A.** Tempo de latência para a imobilidade no TNF dos ratos submetidos às dietas padrão e com diferentes tipos de açúcares. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls, \*  $p < 0,05$  contra o grupo controle.



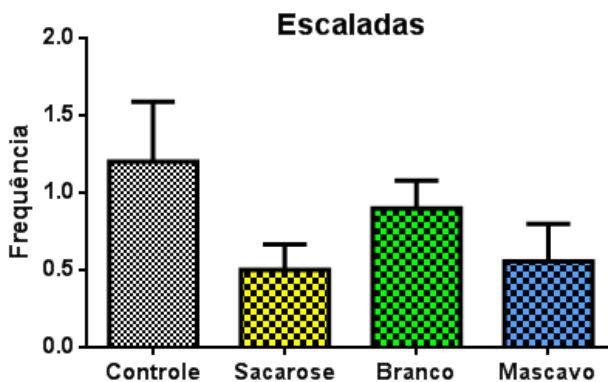
**FIGURA 5.2.2.B.** Tempo de imobilidade no TNF dos ratos submetidos às dietas padrão e com diferentes tipos de açúcares. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls, considerando significativo o valor de  $p < 0,05$  contra o grupo controle.



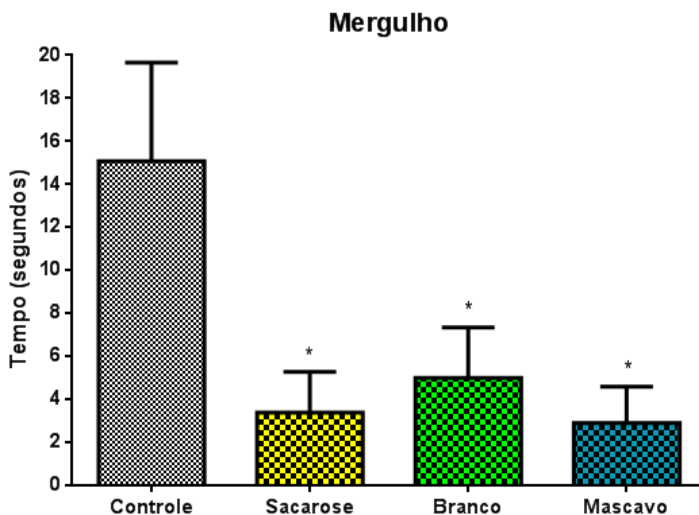
**FIGURA 5.2.2.C.** Frequência do comportamento de imobilidade no TNF dos ratos submetidos às dietas padrão e com diferentes tipos de açúcares. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls, \*  $p < 0,05$  contra o grupo controle.



**FIGURA 5.2.2.D.** Frequência do comportamento de natação no TNF dos ratos submetidos às dietas padrão e com diferentes tipos de açúcares. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls, \*  $p < 0,05$  contra o grupo controle.



**FIGURA 5.2.2.E.** Frequência do comportamento de escaladas no TNF dos ratos submetidos às dietas padrão e com diferentes tipos de açúcares. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls, considerando significativo o valor de  $p < 0,05$  contra o grupo controle.



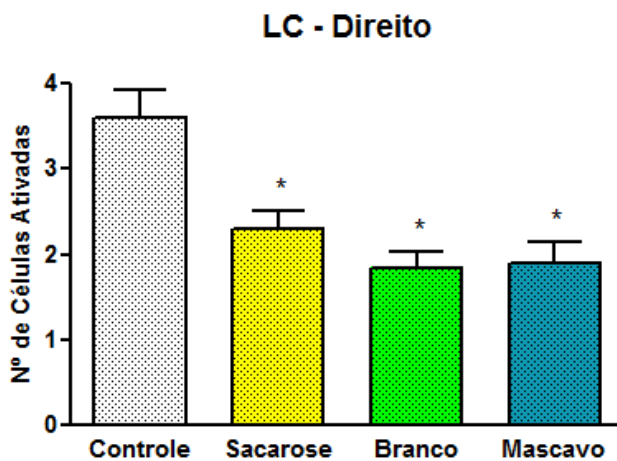
**FIGURA 5.2.2.F.** Tempo do comportamento de mergulho no TNF dos ratos submetidos às dietas padrão e com diferentes tipos de açúcares. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls, \*  $p < 0,05$  contra o grupo controle.

### 5.3. Imunoistoquímica

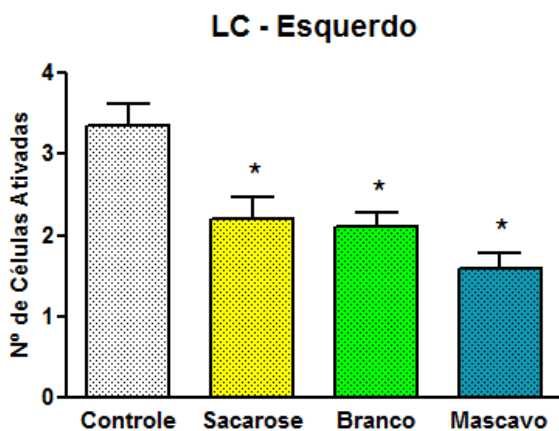
#### 5.3.1. Quantificação de células Fos-positivas no *Locus coeruleus*

No *Locus coeruleus* (LC), região encefálica relacionada com as vias inibitórias da dor e de grande importância na produção de noradrenalina, um neurotransmissor envolvido no controle da motivação, foi observada uma redução do número de neurônios que expressam a proteína Fos nos grupos Sacarose, Branco e Mascavo, tanto no lado direito como no lado esquerdo do tronco encefálico em comparação com o grupo Controle (\*  $p < 0,05$ ; Figura 5.3.1A; B).





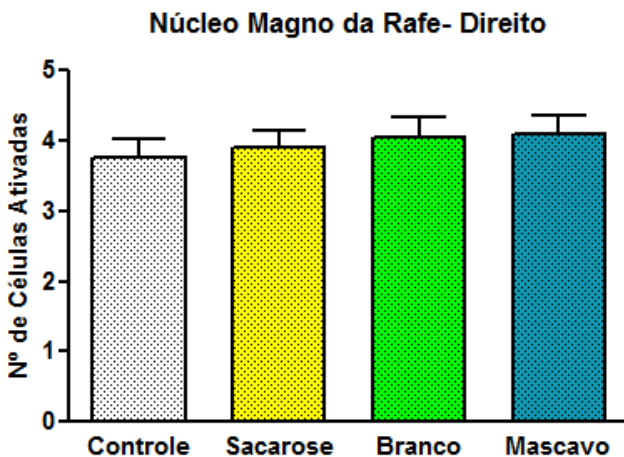
**FIGURA 5.3.1.A.** Quantidade de células ativadas pela proteína Fos no lado direito do LC de ratos submetidos às dietas padrão e com diferentes tipos de açúcares. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls, valor da Estatística F: 2,95; \*p < 0,05 contra o grupo controle.



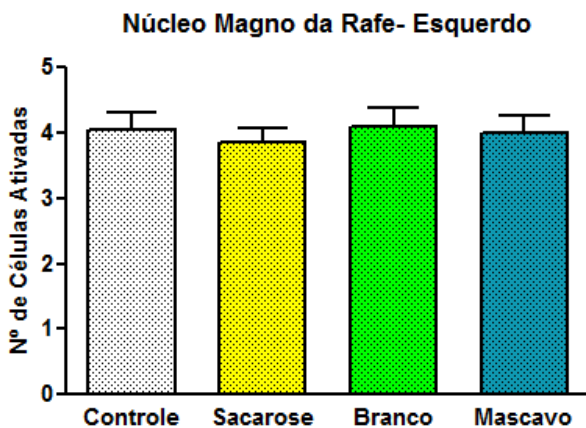
**FIGURA 5.3.1.B.** Quantidade de células ativadas pela proteína Fos no lado esquerdo do LC de ratos submetidos às dietas padrão e com diferentes tipos de açúcares. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls, valor da Estatística F: 3,28; \*  $p < 0,05$  contra o grupo controle.

### 5.3.2. Quantificação de células Fos-positivas no Núcleo Magno da Rafe

Entretanto, no núcleo magno da Rafe (NMR), a quantificação de células ativadas pela proteína Fos foi semelhante para todos os grupos em ambos os lados do tronco encefálico ( $p < 0,05$ ; Figura 5.3.2A; B).



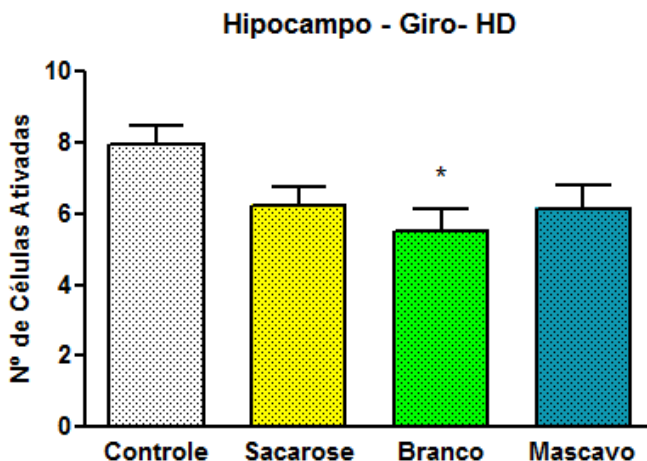
**FIGURA 5.3.2.A.** Quantidade de células ativadas pela proteína Fos no lado direito do NMR de ratos submetidos às dietas padrão e com diferentes tipos de açúcares. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls, valor da Estatística F: 0,25;  $p < 0,05$  contra o grupo controle.



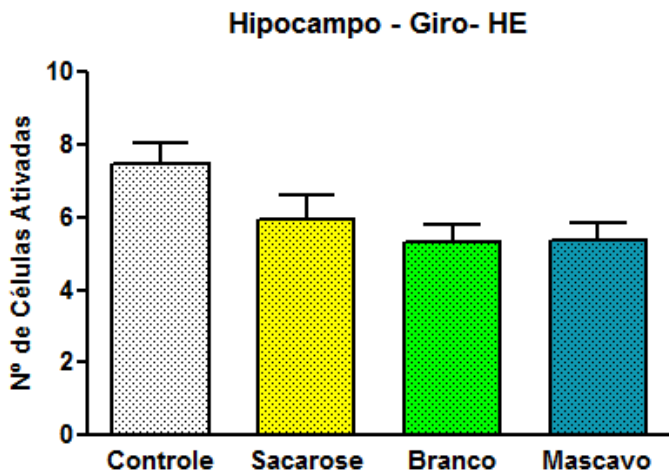
**FIGURA 5.3.2.B.** Quantidade de células ativadas pela proteína Fos no lado esquerdo do NMR de ratos submetidos às dietas padrão e com diferentes tipos de açúcares. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls, valor da Estatística F: 0,13;  $p < 0,05$  contra o grupo controle.

### 5.3.3. Quantificação de células Fos-positivas no Hipocampo

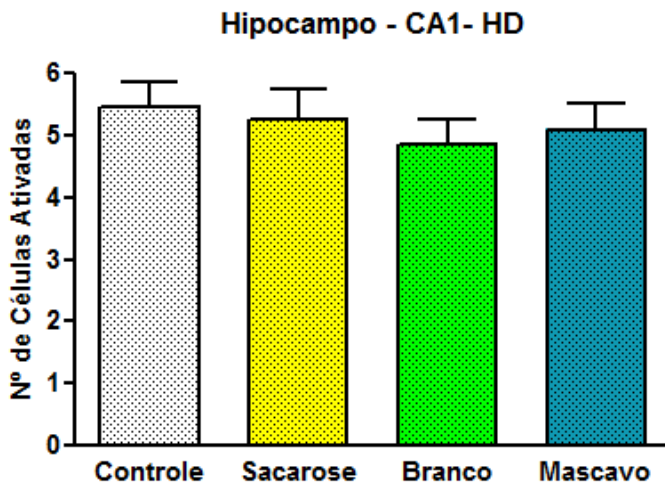
A contagem de células Fos-positivas apresentou diferença significativa apenas no hemisfério direito do giro denteado do hipocampo, mostrando que o número de células Fos-positivas foi estatisticamente menor para o grupo Branco em comparação com o grupo Controle ( $p < 0,05$ ; Fig. 5.3.3A), sendo que os grupos Sacarose e Mascavo também apresentaram número diminuído de células, porém, não com significância estatística. O hemisfério esquerdo do giro denteado não mostrou diferença entre os grupos ( $p < 0,05$ ; Fig. 5.3.3B). As regiões hipocâmpais CA1 e CA3 mostraram números semelhantes de células Fos-positivas entre todos os grupos ( $p < 0,05$ ; Fig. 5.3.3C, D, E e F).



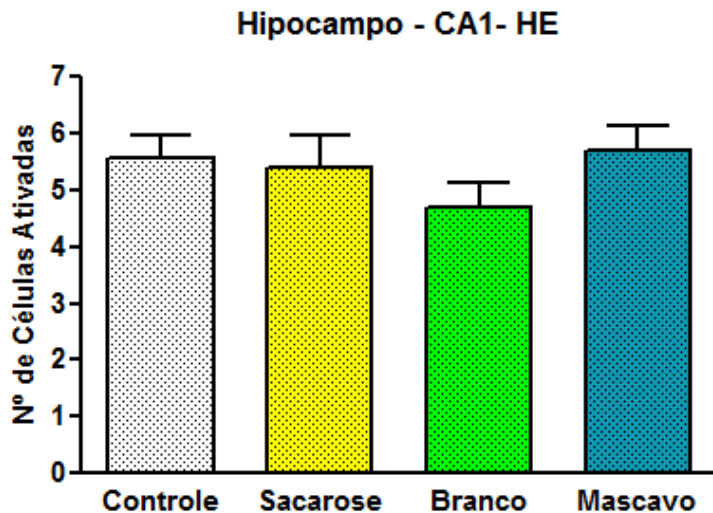
**FIGURA 5.3.3.A.** Quantidade de células ativadas pela proteína Fos no hemisfério direito do giro denteado do Hipocampo de ratos submetidos às dietas padrão e com diferentes tipos de açúcares. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls, valor da Estatística F: 1,69;  $p < 0,05$  contra o grupo controle.



**FIGURA 5.3.3.B.** Quantidade de células ativadas pela proteína Fos no hemisfério esquerdo do giro denteado do Hipocampo de ratos submetidos às dietas padrão e com diferentes tipos de açúcares. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls, valor da Estatística F: 1,09;  $p < 0,05$  contra o grupo controle.

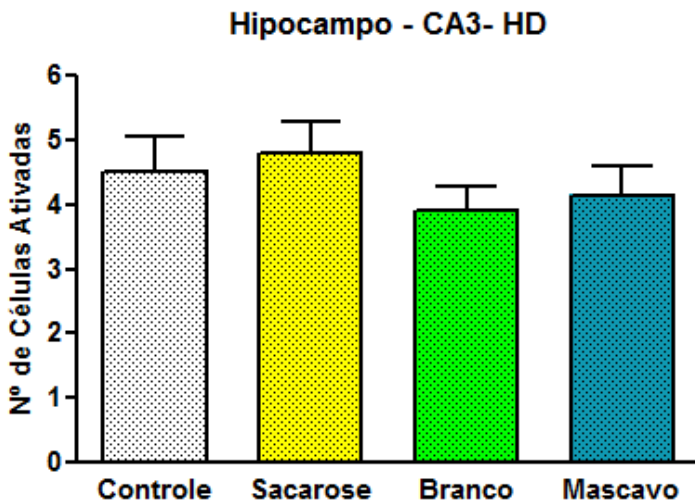


**FIGURA 5.3.3.C.** Quantidade de células ativadas pela proteína Fos no hemisfério direito da sub-região CA1 do Hipocampo de ratos submetidos às dietas padrão e com diferentes tipos de açúcares. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls, valor da Estatística F: 0,21;  $p < 0,05$  contra o grupo controle.

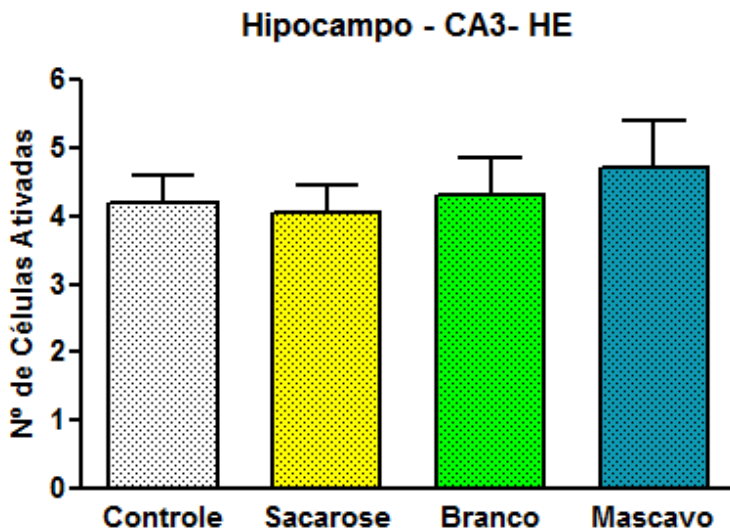


**FIGURA 5.3.3.D.** Quantidade de células ativadas pela proteína Fos no hemisfério esquerdo da sub-região CA1 do Hipocampo de ratos submetidos às dietas padrão e com diferentes tipos de açúcares. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls, valor da Estatística F: 0,67;  $p < 0,05$  contra o grupo controle.





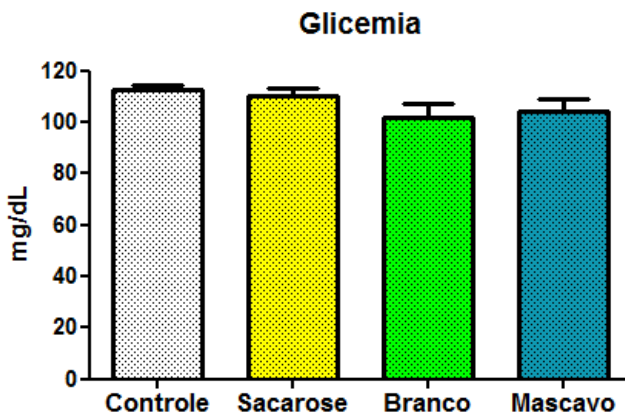
**FIGURA 5.3.3.E.** Quantidade de células ativadas pela proteína Fos no hemisfério direito da sub-região CA3 do Hipocampo de ratos submetidos às dietas padrão e com diferentes tipos de açúcares. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls, valor da Estatística F: 0,48;  $p < 0,05$  contra o grupo controle.



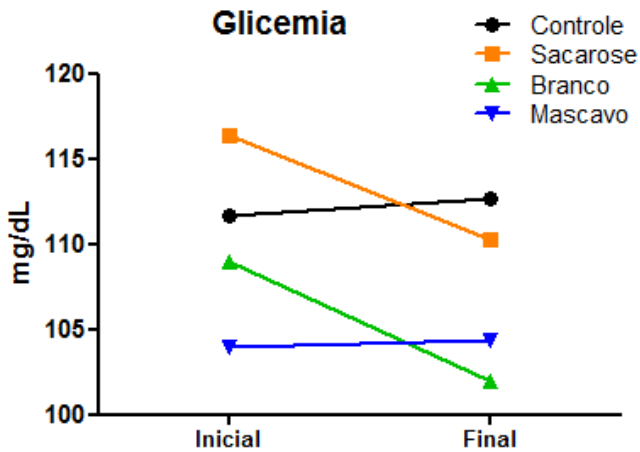
**FIGURA 5.3.3.F.** Quantidade de células ativadas pela proteína Fos no hemisfério esquerdo da sub-região CA3 do Hipocampo de ratos submetidos às dietas padrão e com diferentes tipos de açúcares. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls, valor da Estatística F: 0,23;  $p < 0,05$  contra o grupo controle.

#### 5.4. Avaliação glicêmica

Conforme os testes sanguíneos realizados no início do experimento e após o período de 28 dias, os níveis glicêmicos dos grupos de animais que receberam as dietas padrão e açucaradas se mantiveram constantes ( $p < 0,05$ ; Figura 5.4A; B). O gráfico de histogramas mostra os valores coletados ao final do período experimental.



**FIGURA 5.4.A.** Teste glicêmico de ratos submetidos às dietas padrão e com diferentes tipos de açúcares, realizado ao final do experimento. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls,  $p < 0,05$  contra o grupo controle.



**FIGURA 5.4.B.** Teste glicêmico de ratos submetidos às dietas padrão e com diferentes tipos de açúcares. O teste foi realizado antes (Inicial) e após (Final) do período de 28 dias da dieta experimental. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EPM) dos grupos animais; N=19-20. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls,  $p < 0,05$  contra o grupo controle.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Preferência alimentar, consumo de calorias e ingestão de água

Sendo que o nosso primeiro objetivo para esta pesquisa foi confirmar a preferência pela ração açucarada como alimento palatável, os dados referentes ao consumo de ração mostraram que os grupos experimentais (Sacarose, Branco, Mascavo e Escolha) ingeriram quantidade significativamente maior de ração açucarada (sacarose; açúcar branco refinado; açúcar mascavo), quando comparado ao consumo que esses grupos fizeram da ração sem açúcar (Fig 5.1.1A).

A Fig. 5.1.1B demonstra que não houve diferença significativa nas quantidades de rações açucaradas ingeridas pelos diferentes grupos experimentais (Sacarose, Branco, Mascavo e Escolha). Porém, a ingestão total de ração (ração sem açúcar mais ração com açúcar) entre os grupos experimentais foi significativamente maior para os grupos Branco e Escolha (Fig. 5.1.1C). No grupo Branco, essa diferença foi devida ao maior consumo de ração sem açúcar (Fig. 5.1.1A). Esse fato indica que não houve ingestão compulsiva pelo açúcar branco, apenas uma preferência, pelo menos não na concentração de açúcar (10%) misturada à ração desses animais. Já no grupo Escolha, a diferença foi devida ao maior consumo de ração com açúcar (apesar de não ter sido observada diferença significativa do consumo de ração doce em relação aos demais grupos; Fig. 5.1.1B), talvez por serem dadas aos animais duas opções de dieta muito palatável, ou seja, dois tipos diferentes de açúcares. Na Fig. 5.1.1C, os grupos Sacarose e Mascavo ficaram com valores muito próximos aos grupos Branco e Escolha quando comparados ao grupo Controle, apesar de não ter apresentado uma diferença significativa. Portanto, os resultados ilustrados na Fig. 5.1.1C confirmam uma preferência ao açúcar e não um comportamento compulsivo na ingestão dos tipos diferentes de açúcar também pelos grupos Sacarose e Mascavo.

Já os pesquisadores Avena *et al.* (2008, 2009) demonstraram em seus estudos que a ingestão de alimentos palatáveis como o açúcar e a gordura produzem um comportamento compulsivo (bingeing). Apesar do modelo experimental utilizado por esses pesquisadores ter sido diferente, esse comportamento está relacionado com a concentração de

sacarose (10%) oferecida na água desses animais. Em outros estudos, Roane e Martin (1990) adicionaram 20% de sacarose à água, que foi maior do que a concentração de açúcar adicionada à ração em nosso estudo. Seria interessante em nosso trabalho testar, em experimentos futuros, concentrações maiores de açúcares para verificar se haveria uma possível compulsão, já que “binge eating” (comer compulsivamente) está também associado a comportamentos como depressão, ansiedade, entre outros (Colantuoni *et al.*, 2002; Avena *et al.*, 2009).

Esse resultado confirma dados já publicados de que o açúcar é uma substância que ativa o sistema de recompensa desses animais. Além disso, interfere no sistema normal de *feedback* entre fome e saciedade que controla o balanço de energia do animal, afetando seu comportamento ingestivo e incentivando-o a preferir o alimento mais palatável disponibilizado a ele (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005).

Assim, nossos resultados se mostraram de acordo com dados de estudos publicados por diversos pesquisadores, que demonstraram a existência de uma clara preferência por alimentos palatáveis (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005; AVENA *et al.*, 2008; RADA, AVENA e HOEBEL, 2005; LEVINE, KOTZ e GOSNELL, 2003). Todos os grupos que receberam açúcar (sacarose, açúcar branco refinado ou açúcar mascavo) ingeriram quantidades semelhantes de ração doce em detrimento da ração padrão, o que reforça a preferência pelo gosto doce.

Outro objetivo do nosso trabalho foi investigar a preferência entre o açúcar branco refinado e o açúcar mascavo, oferecidos ao grupo Escolha. Observamos que neste grupo a ingestão de ração adoçada com açúcar branco refinado foi semelhante ao consumo de ração adoçada com açúcar mascavo, evidenciando que a escolha foi pela ração doce, independentemente do tipo de açúcar experimentado (Fig. 5.1.2A).

Muitos pesquisadores têm procurado desvendar os mecanismos metabólicos e neuroquímicos envolvidos na preferência pelo alimento palatável, notadamente, o açúcar. Alimentos saborosos induzem ao consumo de forma semelhante ao abuso de drogas, justamente porque compartilham certos substratos neurais do sistema límbico, atuando como reforçadores positivos (AVENA *et al.*, 2008 e 2009; RADA, AVENA e HOEBEL, 2005; SPANGLER *et al.*, 2004; LEVINE, KATZ e GOSNELL, 2003).

Existem duas explicações para a preferência por alimentos palatáveis. Uma delas é a ativação do sistema de recompensa, representado pelos opióides endógenos e pela dopamina e serotonina, que afetam o comportamento ingestivo incentivando a procura por esse tipo de alimento (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005). A sacarose ativa o sistema opióide de recompensa no núcleo *accumbens* aumentando a liberação de endorfina, que estimula o apetite, um comportamento descrito como “voltar para comer mais” (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005). Quanto à dopamina, diferentes vias parecem modular o comportamento de ingestão alimentar (WANG *et al.* 2001; DEL PARIGI *et al.* 2003). A serotonina, por sua vez, inibe a expressão do neuropeptídeo Y (NPY) no hipotálamo e, portanto inibe o comportamento ingestivo, mas não está clara sua participação na ingestão de carboidratos (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005).

A outra explicação está ligada a uma deficiência na habilidade do organismo de responder à ingestão do alimento com uma cascata de sinalizadores que levariam à saciedade. Ou seja, esta procura por alimento palatável é regulada, em parte, por um *feedback* do sistema que controla o balanço de energia do animal, e envolve uma complexa interação de sinais de fome e saciedade entre os órgãos periféricos e o hipotálamo. Na ingestão de alimentos palatáveis, como alimentos ricos em gordura e açúcar, a expressão dos sinais da fome e da saciedade sofrem uma regulação para cima (*up-regulation*) e, ao mesmo tempo, um embotamento da resposta aos sinais de saciedade, ativando o sistema de recompensa. Desta forma, o alimento palatável dribla a regulação normal do apetite incentivando ao maior consumo (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005). Nesse sentido, uma dieta rica em sacarose estimula a expressão hipotalâmica do NPY e este estimula a ingestão de alimento (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005).

Em relação ao consumo de calorias, como a ingestão diária de ração açucarada entre nossos grupos experimentais foi mais significativa do que o consumo da ração sem açúcar, era de se esperar que o consumo calórico também tivesse sido maior entre esses animais em comparação com o consumo calórico do grupo Controle (Fig. 5.1.3A), uma vez que a adição de açúcar acarretou em aumento do aporte calórico da ração padrão.

Foi interessante notar que, apesar do consumo energético ter sido maior entre os grupos experimentais, não houve diferença significativa quanto ao aumento da massa corporal em comparação com o grupo Controle, como pode ser observado na figura 5.1.3C. Este resultado foi semelhante a outros estudos de pesquisadores, como Roane e Martin (1990), Colantuoni *et al.*, (2001), Avena e Hoebel (2003), Avena *et al.*, (2008; 2009), e Coelho *et al.*, (2010). Nesses estudos, diferentemente do modelo utilizado em nosso estudo em que o açúcar foi acrescentado à ração padrão, os autores utilizaram um modelo em que disponibilizavam a sacarose ou a glicose diluída na água em concentrações que variavam entre 10% e 20% de sacarose ou 25% de glicose, por períodos entre 25 a 30 dias sem, contudo, encontrarem diferenças significativas no peso corporal entre seus grupos experimentais. A explicação sugerida por esses autores é a de que os ratos, nesse modelo, parecem compensar as calorias da sacarose ou da glicose adicionada à água, diminuindo a ingestão de ração, ganhando peso em uma taxa normal.

A avaliação dos níveis glicêmicos foi realizada com o objetivo de verificar se haveriam alterações que indicassem intolerância à glicose. No entanto, os resultados não mostraram nenhuma alteração entre os grupos, comparativamente ao grupo Controle. Esses dados são compatíveis com os resultados dos estudos de Roane e Martin (1990) e de Coelho *et al.* (2010) que, mesmo ofertando solução de 20% de sacarose aos ratos, também não encontraram diferença nas medições de glicemia, entre os grupos avaliados. Uma hipótese que podemos levantar é a de que a concentração de açúcar utilizada e o tempo de uso (28 dias) foram insuficientes para causar alterações significativas nos níveis glicêmicos dos ratos, além de que o açúcar que era ofertado vinha acompanhado das fibras da própria ração, o que poderia levar a um atraso na disponibilização do açúcar para o sangue.

Interessantemente, verificamos que o maior consumo calórico pelos grupos que ingeriram dieta com açúcar foi semelhante ao consumo semanal de água, uma vez que os grupos Branco, Mascavo e Escolha ingeriram maior volume que o grupo Controle, exceto o grupo Sacarose (Fig. 5.1.4A). Este resultado faz sentido, uma vez que a sede é estimulada, entre outros fatores, pelo aumento da osmolaridade do líquido extracelular, motivando o animal a ingerir mais água, restabelecendo assim a osmolaridade normal (SILVA *et al.*, 2011).



Este raciocínio é plausível, pois a ração adoçada certamente pode ter causado um aumento momentâneo da osmolaridade plasmática naqueles ratos. Entretanto, não sabemos explicar porque a ração adoçada com sacarose não teve o mesmo efeito, já que aumentou o consumo calórico dos ratos que a ingeriram, porém, sem aumentar a ingestão de água desses animais. O açúcar mascavo, sendo rico em vitaminas e sais minerais (SILVA, 2003; GUERRA e MUJICA, 2010; ORTIZ, MONCAYO e CORONEL, 2004), e o açúcar branco refinado que, mesmo sendo extremamente pobre em nutrientes (SILVA, 2003; GUERRA e MUJICA, 2010; ORTIZ, MONCAYO e CORONEL, 2004; CORDAIN *et al.*, 2005), conforme pode ser visto na tabela 1, contém resíduos tóxicos provenientes do processo de clareamento do caldo da cana (ARAÚJO, 2007), podem ter ocasionado uma alteração na osmolaridade após a ingestão da ração adoçada com esses açúcares, induzindo a maior ingestão de água por esses animais.

## **6.2. Nociceção e Depressão**

Alguns estudos têm sido realizados sobre o efeito antinociceptivo da utilização de solução de sacarose. Em sua revisão sobre esse tema, Gaspardo, Linhares e Martinez (2005) concluíram que a literatura está bem documentada quanto à eficácia da dose única de sacarose no alívio da dor em neonatos, mas que ainda faltam estudos mais consistentes quanto ao uso da sacarose em doses repetidas. Pesquisas recentes têm demonstrado que a administração aguda de soluções de sacarose proporciona alívio da dor em recém-nascidos em eventos dolorosos (GASPARDO, LINHARES e MARTINEZ, 2005; STEVENS, YAMADA e OHLSSON, 2010; CIGNACCO *et al.*, 2012). A sacarose é segura e eficaz para reduzir a dor quando é administrada em soluções contendo entre 0,012 e 0,12g de sacarose, aproximadamente dois minutos antes dos procedimentos dolorosos (STEVENS, YAMADA e OHLSSON, 2010).

Portanto, foi constatado que a ingestão de substâncias doces e altamente palatáveis parece interagir com sistemas opióides endógenos, de forma aguda, o que pode ser atribuído a uma liberação de beta-endorfina hipotalâmica logo após um “estímulo prazeroso”, inibindo a

dor, mas muito pouco tem sido relatado sobre os efeitos do açúcar a longo prazo, de como se relaciona com a percepção da dor e da analgesia mediada por opióides. O componente de recompensa de ingestão de açúcar pode desempenhar um importante papel na alteração do limiar da dor e da função de opiáceos (ROANE e MARTIN, 1990).

Os pesquisadores Roane e Martin (1990) demonstraram que a alimentação sustentada (a longo prazo) de sacarose em ratos resulta em uma aparente diminuição mediada por opiáceos no limiar da dor. Nesse estudo, os pesquisadores trataram ratos com uma solução com 20% de sacarose e, com o objetivo de avaliar o limiar da dor aplicaram o teste de retirada da cauda, imediatamente antes da introdução da solução de sacarose e de novo 20 horas mais tarde, repetindo nos dias 7, 10, 12, 16, 18 e 25, obtendo resultados que confirmaram sua hipótese de que a alimentação contínua com sacarose altera a nocicepção mediada por opióides endógenos.

A redução do limiar da dor na ingestão crônica de açúcar parece ser atribuível a alguma alteração na função dos opióides endógenos. Pode ser que a ingestão de sacarose em longo prazo desencadeie um mecanismo que inibe a liberação de opióides endógenos. Na ingestão aguda de açúcar, os opióides potencializam processos de recompensa a serviço de um estado motivacional apetitivo que pode, simultaneamente, diminuir a resposta emocional a estímulos aversivos. Desta forma, parece haver um período refratário da atividade dos opióides endógenos após um longo período de alimentação com sacarose e que o consumo sustentado de sacarose mantém a diminuição do limiar da dor, mas por um mecanismo que ainda é desconhecido (ROANE e MARTIN, 1990).

O teste de Von Frey no nosso experimento mostrou que tanto o grupo Branco, que ingeriu açúcar branco refinado, quanto o grupo Mascavo, que ingeriu açúcar mascavo, tiveram o limiar da dor diminuído e, curiosamente, o grupo Sacarose mostrou resultados semelhantes ao grupo Controle (Fig. 5.2.1). Consideramos que estes resultados foram compatíveis com os resultados do estudo de Roane e Martin (1990), diferindo apenas no tipo de açúcar, já que esses pesquisadores utilizaram apenas a sacarose. Uma explicação que pode ser plausível é que o nosso experimento utilizou uma concentração de 10% de açúcar adicionado à ração, enquanto que os pesquisadores citados utilizaram uma solução com 20% de sacarose adicionada à água

dos ratos, o que poderia justificar seus resultados. Portanto, houveram diferenças tanto na concentração quanto na forma de disponibilizar o açúcar aos animais.

Quando os resultados dos testes comportamentais foram confrontados com os dados obtidos na contagem do número de células Fos-positivas no *Locus coeruleus* por imunistoquímica, percebemos uma consonância, já que esta contagem mostrou uma significativa redução de neurônios ativados em ambos os lados do tronco encefálico, em todos os grupos que ingeriram ração açucarada (Figs. 5.3.1A e B), uma vez que o *Locus coeruleus*, que é ativado por estímulos dolorosos, está envolvido na antinocicepção (KERPPERS, SAMPAIO e OLIVEIRA, 2009). Assim, os impulsos dolorosos estão sujeitos a influências modulatórias centrais e a via noradrenérgica, proveniente do *Locus coeruleus*, exerce um efeito inibitório sobre a transmissão da dor no corno dorsal (VITOR *et al.*, 2008).

Essa redução no número de neurônios que expressam a proteína Fos nos grupos Sacarose, Branco e Mascavo poderia ser explicada da seguinte forma: como a população de neurônios nessa região é amplamente caracterizada por neurônios noradrenérgicos, poderíamos sugerir que com a dieta açucarada crônica, poderia ter havido uma diminuição no número desses neurônios que acarretaria numa diminuição de noradrenalina que, por sua vez, diminuiria a inibição das vias noradrenérgicas e os animais sentiriam mais dor. E como o açúcar branco e a sacarose são desprovidos de vitaminas e sais minerais, e a noradrenalina depende desses cofatores para sua síntese (como mostra a figura 1.7), a falta deles poderia acarretar em baixas taxas de catecolaminas, portanto, mais dor.

Contudo, essa é apenas uma hipótese que precisa de maiores confirmações com estudos futuros. No momento, não sabemos explicar por que o grupo Mascavo também demonstrou o mesmo comportamento e por que o grupo Sacarose não deu diferença significativa no teste Von Frey.

Por sua vez, no núcleo magno da rafe (NMR), cuja região também está relacionada à modulação da dor, estudos sugerem que opióides endógenos aumentam a atividade de neurônios relacionados à inibição descendente do sistema endógeno modulatório da dor (Pan *et al.*, 1990). O NMR recebe projeções da substância cinzenta

periaquedutal (PAG) e envia esses estímulos por meio de fibras serotoninérgicas que se projetam através do infundíbulo dorsolateral para o corno dorsal da medula, onde inibem seletivamente neurônios nociceptivos, incluindo interneurônios e neurônios dos tratos ascendentes (CARVALHO e LEMÔNICA, 1998). Entretanto, como nossos resultados não apresentaram diferença significativa entre os grupos, acreditamos que esta via serotoninérgica antinociceptiva, provavelmente não sofreu alterações significativas a ponto de impedir sua função.

Uma refeição rica em carboidratos aumenta os níveis de triptofano no cérebro, acelerando a síntese de serotonina (WURTMAN, 1986). Abildgard (2010) defende que uma dieta densamente calórica pode ser capaz de afetar o humor independente do ganho de peso, aparentemente mais pela qualidade do que pela quantidade calórica, apresentando influências tanto sobre o humor quanto sobre o metabolismo.

No teste do nado forçado (TNF), embora a imobilidade (quando o rato flutua na água ou realiza movimentos apenas para manter a cabeça acima do nível da água) seja considerada importante para descrever o comportamento tipo-depressivo do animal, o menor tempo de latência para a imobilidade (tempo decorrido desde que o animal é colocado na água até o primeiro comportamento de imobilidade observado) também é um indicativo da sensibilidade dos indivíduos a um estressor incontrolável (LEUSSIS e ANDERSEN, 2008), e o menor tempo gasto no mergulho (quando o animal tenta fugir pelo fundo do tanque), pode indicar menor disposição para explorar o tanque para tentar a fuga. Acredita-se que o tempo diminuído da latência para a imobilidade indica que o animal é mais propenso ao comportamento tipo-depressivo e aos efeitos negativos do estresse do TNF (ABILDGARD, 2010).

Em nosso experimento, o tempo de latência foi indicativo do comportamento tipo-depressivo para os grupos Sacarose e Branco, que apresentaram menor duração em comparação com o grupo controle e o grupo Mascavo (Fig. 5.2.2A). Embora o tempo de imobilidade não tenha mostrado diferenças significativas entre os grupos (Fig. 5.2.2B), a frequência, ou seja, o número de vezes que os grupos Sacarose e Branco emitiram comportamento de imobilidade foi significativamente maior do que os grupos Controle e Mascavo.

Por sua vez, os ratos do grupo Mascavo demonstraram menor tendência aos comportamentos tipo-depressivos nesses três comportamentos (latência, frequência de imobilidade e frequência de natação) no TNF, em relação aos ratos dos grupos Sacarose e Branco (Figura 5.2.2A, C e D), que evidenciaram comportamentos tipo-depressivos.

Nossa sugestão é que o consumo de açúcar branco refinado e de sacarose (que são compostos basicamente de sacarose, sem os demais nutrientes que se fazem presentes no açúcar mascavo), possa ter contribuído para uma diminuição de neurotransmissores envolvidos na modulação do humor por causa da perda nutricional de vitaminas do complexo B, vitamina C e zinco, importantes cofatores na síntese de serotonina e catecolaminas (Figura 1.7), segundo argumentos de Holford (2003).

Quanto ao tempo gasto no mergulho, este foi estatisticamente menor para todos os grupos que ingeriram açúcar quando comparado ao grupo Controle (Fig. 5.2.2F), o que pode sugerir que o acréscimo de açúcar à dieta, independente do tipo, se é refinado ou mascavo, pode induzir a alguns tipos de comportamentos tipo-depressivos, provavelmente por causa do excesso de carboidrato que, segundo Cesar, Wada e Borges (2005), pode ser associado à deficiência de zinco e, de acordo com Nowak *et al.* (2003), os baixos níveis sanguíneos de zinco estão ligados à depressão.

Esses resultados também são compatíveis com estudos de pesquisadores como Joyce e Gibney (2008), Cesar, Wada e Borges (2005), que demonstraram que o consumo excessivo de açúcar pode levar à diminuição de eletrólitos e vitaminas do complexo B, importantes nutrientes que atuam como cofatores na síntese de neurotransmissores como a serotonina e a noradrenalina.

Todos esses comportamentos com diferença significativa em relação ao grupo Controle demonstram que os ratos que ingeriram dieta açucarada apresentaram algum nível de comportamentos tipo-depressivos, sendo que o consumo crônico de açúcar mascavo parece ter causado menos prejuízos ao sistema nervoso dos ratos do que o consumo crônico de açúcar branco refinado ou de sacarose. Entretanto, são necessárias novas pesquisas, possivelmente com maior concentração de açúcar adicionada à ração, que possam confirmar o envolvimento do

consumo crônico de açúcar como um fator potencializador de comportamentos tipo-depressivos.

Já o hipocampo, uma estrutura com alta plasticidade, envolvida na aprendizagem e consolidação de memórias explícitas e no armazenamento de memórias de curto e longo prazos e associado à neurogênese, parece ter um papel central na ocorrência de depressão (CAMPBELL e MACQUEEN, 2004; SCORZA, GUERRA e CALIL, 2005;) relacionada à atrofia hipocampal, verificada em pacientes com depressão crônica (SHELINE, MITTLER e MINTUN, 2002). O neurotransmissor predominante no hipocampo é o glutamato, relacionado à plasticidade neuronal, mas outros neurotransmissores também estão presentes, entre eles a serotonina e a noradrenalina (RUGGIERO *et al.*, 2011), envolvidos na modulação do humor.

No entanto, estes dados nos ajudam a concluir que o período de 28 dias de dieta com açúcar provavelmente foi insuficiente para causar um dano maior ao hipocampo, uma vez que os resultados imunoistoquímicos das regiões CA1, CA3 em ambos os hemisférios, e no hemisfério esquerdo do giro denteado não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, embora o número de células Fos-positivas no hemisfério direito do giro denteado se tenha mostrado significativamente menor no grupo Branco em comparação com o grupo Controle (Fig. 5.3.3B), o que pode nos sinalizar que, mesmo sendo um período relativamente pequeno, houve algum prejuízo nesse local, possivelmente relacionado a fatores nutricionais relativos ao uso do açúcar branco refinado, uma vez que nessa região ocorre a presença de serotonina e esta depende de nutrientes como vitaminas do complexo B e minerais como o zinco e o magnésio, para serem sintetizadas, como ilustrado na figura 1.7 (HAVS, *et al.*, 2004; CESAR, WADA e BORGES, 2005; HOLFORD, 2003).

Neste sentido, existem evidências de que o sistema serotoninérgico está envolvido com a atividade antidepressiva no hipocampo, interagindo com receptores glutamatérgicos. Um estudo mostrou uma tendência para a diminuição de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A</sub> no hipocampo de pessoas deprimidas com idade entre 22 a 69 anos, comparados com controles pareados por idade  $\pm$  2 anos (SHELINE *et al.*, 2002). Sendo que 90% dos neurotransmissores hipocampais são glutamatérgicos (RUGGIERO *et*

*al.*, 2011), os dados dos estudos de Sheline *et al.* (2002) apontam para a importância do sistema serotoninérgico na modulação do humor, já que a serotonina tem um papel significativo na modulação do sistema glutamatérgico (PALUCHA-PONIEWIERA *et al.*, 2010). Poderíamos inferir que a diminuição do número de células Fos-positivas no giro denteado, em comparação com o grupo Controle, nos ratos que ingeriram açúcar, poderia estar relacionada a uma diminuição da atividade dos neurônios serotoninérgicos e/ou glutamatérgicos nessa região, envolvida com o comportamento tipo-depressivo nesses animais (Fig.5.3.3A).

Tem sido dada pouca atenção no estudo da depressão e na modulação da nocicepção ao aspecto nutricional. No entanto, é do conhecimento científico que o cérebro utiliza nutrientes para regular seu próprio metabolismo. Isto evidencia como uma nutrição inadequada, como a falta de aminoácidos como o triptofano e a tirosina, que são precursores de serotonina e noradrenalina respectivamente, além da falta de vitaminas do complexo B e do zinco, pode contribuir para a depressão (HOLFORD, 2003).

Por outro lado, uma suplementação nutricional pode ser um antidepressivo eficaz, como, por exemplo, a suplementação de triptofano, além de vitaminas e minerais como a vitamina B<sub>12</sub> e o ácido fólico, que ajudam a transformar 5-HTP em serotonina (HOLFORD, 2003). As catecolaminas são dependentes de vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> para serem sintetizadas e a serotonina é produzida pelo organismo a partir do aminoácido triptofano na presença da vitamina B<sub>6</sub> (piridoxal-5-fosfato) (HAVS, *et al.*, 2004), sendo que a deficiência de vitaminas B pode conduzir a níveis reduzidos de serotonina e catecolaminas.

Além disso, estudos clínicos demonstraram que o zinco e o magnésio desempenham papel na fisiopatologia da depressão, apresentando atividade antidepressiva (SZEWCYK *et al.*, 2008; BROCARDI *et al.*, 2008). Estudos consistentes têm demonstrado que a ausência de zinco na alimentação tem sido associada à ingestão elevada de alimentos ricos em carboidratos refinados (CESAR, WADA e BORGES, 2005).

Portanto, em relação ao comportamento tipo-depressivo, podemos especular que o uso crônico da dieta açucarada em nosso estudo poderia estar relacionado a uma redução das vitaminas e minerais

requeridos na produção da serotonina e noradrenalina, neurotransmissores importantes no controle de comportamentos tipo-depressivos, tendo em vista que o grupo que ingeriu açúcar branco refinado e o que ingeriu sacarose foram os que apresentaram maior tendência aos comportamentos tipo-depressivos no TNF, em contraste com o grupo Mascavo, que na maioria dos comportamentos analisados foi semelhante ao grupo Controle.

A mesma dieta poderia também estar interferindo, por mecanismos ainda não desvendados, na modulação da dor através da participação dos mesmos cofatores necessários para a síntese das catecolaminas, como a noradrenalina, relacionada com as vias inibitórias da dor.



## 7. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho corroboram dados de pesquisadores como Avena *et al.* (2008) e Levine, Kotz e Gosnell (2003) ao demonstrar em ratos a preferência por alimentos palatáveis. Além disso, demonstramos que os ratos não apresentaram preferência entre os tipos de açúcares oferecidos, já que o consumo de ração açucarada, tanto daquela que continha açúcar branco refinado quanto aquela que continha açúcar mascavo, foi equitativo.

Demonstramos também que, na concentração de açúcar adicionado à ração (10%) em nossos experimentos, não houve ingestão compulsiva de açúcar, já que a ingestão total de ração foi maior apenas para os grupos Branco (que ingeriu mais da ração sem açúcar) e Escolha (que ingeriu mais ração doce por ter tido duas opções diferentes: açúcar branco e mascavo).

Assim como nas pesquisas de Roane e Martin (1990), também sugerimos que o consumo crônico de açúcar adicionado à dieta pode alterar mecanismos das vias descendentes antinociceptivas, diminuindo o limiar da dor.

Em relação ao comportamento tipo-depressivo, encontramos que o consumo crônico de açúcar branco refinado e de sacarose levou os ratos a emitir comportamentos tipo-depressivos significativamente mais pronunciados do que o consumo crônico de açúcar mascavo.

Certamente novos estudos são necessários a fim de esclarecer os mecanismos relacionados ao sistema de recompensa e do controle da dor pelo consumo prolongado de açúcar.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABILDGARD, A.; SOLSKOV, L.; VOLKE, V.; HARVEY, B. H.; LUND, S.; WEGENER, G. A high-fat diet exacerbates depressive-like behavior in the Flinders Sensitive Line (FSL) rat, a genetic model of depression. Journal Psychoneuroendocrinology, 2010.

ARAÚJO, F. A. D. Processo de clarificação do caldo de cana pelo método da bicarbonatação. Revista Ciências e Tecnologia, Ano 1(1), 1-5, 2007.

ARAÚJO, J. A.; MARTEL, F. Regulação da absorção Intestinal de glicose. Arquivos de Medicina, 23 (2) 35-43, 2009.

AVENA, N. M.; RADA P.; HOEBEL, B. G. Evidence of sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. Neuroscience Biobehavioral Reviews, v. 32, 20-39, 2008.

AVENA, N. M.; RADA, P.; HOEBEL, B. G. Sugar and fat bingeing have notable differences in addictive-like behavior. The Journal of Nutrition, v. 139, 623-28, 2009.

BAHLS, S-C. Depressão: uma breve revisão dos fundamentos biológicos e cognitivos. InterAÇÃO, v. 3, 49-60, jan/dez, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. Agência de Informação Embrapa. Cana-de-açúcar. Açúcar. Disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_109\\_22122006154841.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_109_22122006154841.html). acesso em 28/06/2012.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sala de Imprensa: Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF 2002-2003. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=278](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=278) Acesso em: jun. 2012.

BROCARD, P. S.; BUDNI, J.; KASTER, M. P.; SANTOS, A. R. S.; RODRIGUES, A. L. S. Folic acid administration produces an antidepressant-like effect in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. Neuropharmacology, v. 54, 464-73, 2008.

CAMOZZATO, T. S. C.; WINKELMANN-DUARTE, E. C.; PADILHA, C. B.; MIGUEL, S. P. R.; BONZANINI, L.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; FERNANDES, M. C.; LUCION, A. B. Neonatal handling reduces the number of cells in the medial preoptic area of female rats. Brain research, 1247, 92-9, 2009.

CAMPBELL, S.; MACQUEEN, G. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. Journal of Psychiatry Neuroscience, v. 29 (6), 417-26, 2004.

CARVALHO, A. C.; LEMÔNICA, L. Mecanismos centrais de transmissão e de modulação da dor. Atualização terapêutica, Revista Brasileira de Anestesiologia, v. 48 (3), 221-40, 1998.

CESAR, T. B.; WADA, S. R.; BORGES, R. G. Zinco plasmático e estado nutricional em idosos. Revista de Nutrição, v. 18, 357-65, 2005.

CEZARIO, A. F.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; BALDO, M. V. C.; CANTERAS, N. S. Hypothalamic sites responding to predator threats – the role of the dorsal premammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior, European Journal of Neuroscience, v. 28, 1003–15, 2008.

CHAPMAN, C. R.; GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. The Lancet, v.353, (9171), 2233-7, 1999.

CHAVES, J. B. P. Como produzir rapadura, melado e açúcar mascavo. CPT-Centro de Produções Tecnológicas: Viçosa, p. 120, 1998.

CHEN, W.; BERENSON, G. S. Síndrome metabólica: definição e prevalência em crianças. Jornal de Pediatria, v. 83, (1), 1-2, 2007.

CIGNACCO, E. L.; SELAM, G.; STOFFEL, L.; GERULL, R.; NELLE; KANWALJEET, J. S. A.; ENGBERG, S. Oral sucrose and “facilitated tucking” for repeated pain relief in preterms: a randomized controlled trial. Official Journal of the American Academy of Pediatrics, v. 129 (2), 2012.

COELHO, M. S.; LOPES, K. L.; FREITAS, R. A.; OLIVEIRA-SALES, E. B.; BERGASMASCHI, C. T.; CAMPOS, R. R.; CASRINI, D. E.; CARMONA, A. K.; ARAÚJO, M. S.; HEIMANN, J. C.; DOLNIKOFF, M. S. High sucrose intake in rats is associated with increased ACE2 and angiotensin-(1-7) levels in the adipose tissue. Regulatory Peptides, 162, 61-7, 2010.

COLANTUONI, C.; RADA, P.; MCCARTHY, J.; PATTEN, C.; AVENA, N. M.; CHADEAYNE, A.; HOEBEL, B. G. Evidence That Intermittent, Excessive Sugar Intake Causes Endogenous Opioid Dependence. Obesity Research, v. 10 (6), 2002.

CORDAIN, L.; EATON, S. B.; SEBASTIAN, A.; MANN, N.; LINDEBERG, S.; WATKINS, B. A.; O’KEEFE, J. J.; BRAND-MILLER, J. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. The American Journal of Clinical Nutrition, v. 81, 341-54, 2005.

COSTANZO, L. S. Fisiologia. Trad. Vilma Ribeiro de Souza Varga. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

DEL PARIGI, A.; CHEN, K.; SALBE, A. D.; REIMAN, E. M.; TATARANNI, P. A. Are We Addicted to Food?. Obesity Research, v. 11 (4), 2003.

DUNBAR, J. A.; REDDY, P.; DAVIS-LAMELOISE, N.; PHILPOT, B.; LAATIKANEN, T.; KILKKINEN, A.; BUNKER, S. J.; BEST, J. D.; VARTIAINEN, E.; LO, S. K.; JANUS, E. D. Depression: an

important comorbidity with metabolic syndrome in a general population. Diabetes Care, v. 31 (12), 2368-73, 2008.

Engetecno Online. Fabricação de açúcar mascavo. Disponível em <http://www.engetecno.com.br/port/acucar-mascavo.htm>. Acessado em 29/03/2012.

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

FENELON, V. S.; POULAIN, D. A.; THEODOSIS, D. T. Oxytocin neuron activation and fos expression: a quantitative immunocytochemical analysis of the effect of lactation, parturition, osmotic and cardiovascular stimulation. Neuroscience, v 53 (1), 77-89, 1993.

GASPARDO, C. M.; LINHARES, M. B.; MARTINEZ, F. E. A eficácia da sacarose no alívio de dor em neonatos: revisão sistemática da literatura. Jornal de Pediatria (RJ), v. 81, 435-42, 2005.

GOMES, M. M.; QUINHONES, M. S.; ENGELHARDT, E. Neurofisiologia do sono e aspectos farmacoterapêuticos dos seus transtornos. Revista Brasileira de Neurologia, 46 (1) 5-15, 2010.

GOTTLIEB, M. G. V.; CRUZ, I. B. M. da; BODANESE, L. C. Origem da síndrome metabólica: aspectos genético-evolutivos e nutricionais. Scientia Medica (Porto Alegre), v. 18 (1), 31-8, 2008.

GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA, [WWW.graphpad.com](http://WWW.graphpad.com).

GUERRA, M. J.; MUJICA, M. V. Physical and chemical properties of granulated cane sugar “panelas”. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 2010.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. Trad. Barbara de Alencar Martins. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

Holford, P. Depression: the nutrition connection. Primary Care Mental Health, v. 1, 9-16, 2003.

HVAS, A. M.; JUUL, S.; BECH, P.; NEXØ, E. Vitamin B<sup>6</sup> level is associated with symptoms of depression. Psychotherapy and Psychosomatics, v. 73, 340-43, 2004.

IBIRONKE, G. F.; SABA, O. J.; OLOPADE, F. O. Glycemic control and pain threshold in alloxan diabetic rats. African Journal of Biomedical Research, v. 7, 149-51, 2004.

Joint WHO/FAO Expert Consultation, diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO Technical Report Series 916, 2003.

JOYCE, T.; GIBNEY, M. J. The impact of added sugar consumption on overall dietary quality in Irish children and teenagers. Journal of Human Nutrition and Dietetics, v. 21, 438-50, 2008.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. Nature, 413, 203-210, 2001.

JUVER, J. P. S.; VERÇOSA, N. Depressão em pacientes com dor no câncer avançado. Revista Brasileira de Anestesiologia, v. 58 (3), 287-98, 2008.

KERPPERS, I. I. SAMPAIO, L. M. M.; OLIVEIRA, C. S. Estudo da participação do locus coeruleus na antinocicepção induzida por sacarose em modelo experimental de hiperalgesia por capsaicina. Revista Biociências, v. 15, 2009.

LAKHAN, S. E.; VIEIRA, K. F. Nutritional therapies for mental disorders. Nutrition Journal, 7, 2, 2008.

LEUSSIS, M. P.; ANDERSEN, S. L. Is adolescence a sensitive period for depression? behavioral and neuroanatomical findings from a social stress model. *Synapse*, 62, 22–30, 2008.

LEVINE, A. S.; KOTZ, C. M.; GOSNELL, B. A. Sugars and Fats: The Neurobiology of Preference. *The Journal of Nutrition*, 2003.

LEVY, R. B.; CLARO, R. M.; BANDONI, D. H.; MONDINI, L. MONTEIRO, C. A. Disponibilidade de “açúcares de adição” no Brasil: distribuição, fontes alimentares e tendência temporal. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 15(1), 3-12, 2012.

LINHARES, M. B. M.; DOCA, F. N. P. Dor em neonatos e crianças: avaliação e intervenções não farmacológicas *Temas em Psicologia*, v. 18 (2), 307–25, 2010.

LONGO, F. A.; MENTEN, J. F. M.; PEDROSO, A. A.; FIQUEIREDO, A. N.; RACANICCI, A. M. C.; GAIOTTO, J. B.; SORBARA, J. O. B. Carboidratos na dieta pré-inicial de frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecologia*, v. 34 (1), 123-33, 2005.

LUSTIG, R. H.; SCHMIDT, L. A.; BRINDIS, C. D. Public health: the toxic truth about sugar. *Nature*, v. 482, 27-9, 2012.

MARTIKAINEN, I. K. Brain dopamine and Serotonin receptors in the perception of pain: positron emission tomography studies in healthy subjects. (Dissertation in neuroscience) – University of Turku, Turun Yliopiston, Turku, 2009. Disponível em: <http://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/50434/AnnalesD878Martikainen.pdf?sequence=1>. Acesso em 26/06/2012.

MARTON, B. C. V.; HONDA, F. C. S.; PIRES, O. C.; POSSO, I. P. Efeito do tratamento com reserpina sobre a dor aguda em ratos submetidos ao teste de formalina modificado. *Revista Dor*, v. 10 (4), 325-30, 2009.



MATSUDA, S.; PENG, H.; YOSHIMURA, H.; WEN, T-C.; FUKUDA, T.; SAKANAKA. Persistent *c-fos* expression in the brains of mice with chronic social stress. Neuroscience Research, v. 26, 157-70, 1996.

MEDINA, R. A.; OWEN, G. I. Glucose transporters: expression, regulation and cancer. Biological Research, v. 35 (1), Santiago, 2002.

MERSKEY, H.; ALBE-FESSARD, D. G.; BONICA, J. J.; CARMON, A.; DUBNER, R.; KERR, F. W. L. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Pain, v. 6, 249-52, 1979.

MEZADRI, T. J.; BATISTA, G. M.; PORTES, A. C.; MARINO-NETO, J.; LINO-DE-OLIVEIRA, C. Repeated rat-forced swim test: reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. Journal of Neuroscience Methods, 195, 200-5, 2011.

MIYATA, S.; NAKASHIMA, T.; KIYOHARA, T. Expression of *c-fos* immunoreactivity in the hypothalamic magnocellular neurons during chronic osmotic stimulations. Neuroscience Letters, v. 175, 63-6, 1994.

MITRA, A.; GOSNELL, B. A.; SCHIÖTH, H. B.; GRACE, M. K.; KLOCKARS, A.; OLSZEWSKI, P. K.; LEVINE, A. S. Chronic sugar intake dampens feeding-related activity of neurons synthesizing a satiety mediator, oxytocin. Peptides, v. 31, 1346-52, 2010.

NOWAK, *et al.*, 2003 effect of zinc supplementation on Antidepressant therapy in unipolar depression: A preliminary placebo-controlled study. Polish Journal of Pharmacology, 55, 1143–7, 2003.

ORTIZ, MONCAYO e CORONEL Proyecto de inversión: elaboración y comercialización de la panela granulada “nutripanela” en la ciudad de Guayaquil. 2004. Disponível em: <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/642>. Acessado em 09/07/2012.

PALUCHA-PONIEWIERA, A.; BRANSKI, P.; LENDA, T.; PILC, A. The antidepressant-like action of metabotropic glutamate 7 receptor

agonist *N,N'*-bis(diphenylmethyl)-1,2-ethanediamine (AMN082) is serotonin-dependent. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 334 (3), 1066-74, 2010.

PAN, Z. Z.; WILLIAMS, J. T.; OSBORNE, P. B. Opioid actions on single nucleus raphe magnus neurons from rat and guinea-pig *in vitro*. Journal of Physiology, 427, 519-32, 1990.

PAXINOS G., WATSON C. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. 3<sup>a</sup> ed., San Diego, CA: Academic.

PEET, M. International variations in the outcome of schizophrenia and the prevalence of depression in relation to national dietary practices: an ecological analysis. Journal of Psychiatry, v. 184, 404-8, 2004.

PIRES, O. C.; ASHMAWI, H. A.; CONSTANTINO, E.; PELOGIA, N. C. C.; POSSO, I. P. Antagonistas serotoninérgico e noradrenérgico por via subaracnoidea aumentam a resposta álgica em ratos. Revista Brasileira de Anestesiologia, v. 61 (2), 202-10, 2011.

PORSOLT, R. D.; PICHON, M. Le; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. Nature, v. 266, 730-2, 1977.

PORTNOI, A. G. Dor, stress e coping: grupos operativos em doentes com síndrome de fibromialgia. São Paulo, 1999. 256p. tese (Doutorado), Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo.

PURVES, D. (Org.). Neuroscience. Duke, MA: Duke University Medical Center, 1997.

RADA, P.; AVENA, N. M.; HOEBEL, B. G. Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell. Neuroscience, 737-44, 2005.

ROANE, D. S.; MARTIN, R. J. Continuous sucrose feeding decreases pain threshold and increases morphine potency. Pharmacology Biochemistry & Behavior, v. 35, 225-9, 1990.

ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. Revista de Nutrição, v. 19 (1), 85-91, 2006.

RUGGIERO, R. N.; BUENO-JUNIOR, L. S.; ROSS, J. B.; FACHIM, H. A.; PADOVAN-NETO, S. M.; ROHNER, C. J. S.; IKEDA, E. T.; BRUSCO, J.; MOREIRA, J. E. Neurotransmissão glutamatérgica e plasticidade sináptica: aspectos moleculares, clínicos e filogenéticos. Medicina (Ribeirão Preto), v. 44 (2), 143-56, 2011.

SCORZA, F. A.; GUERRA, A. B. G.; CAVALHEIRO, E. A.; CALIL, H. M. Neurogênese e depressão: etiologia ou nova ilusão? Revista Brasileira de Psiquiatria, v. 27 (3), 249-53, 2005.

Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas-SEBRAE. Estudos Técnicos das Alternativas de Aproveitamento da Cana-de-Açúcar, 2004. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/setor/derivados-de-cana/outros-derivados/acucar-mascavo/>, acesso e 09/07/2012.

SHELINE, Y. I.; MITTLER, B. L.; MINTUN, M. A. The hippocampus and depression. Eur Psychiatry, 17, Suppl 3: 300-5, 2002.

SKARUPSKI, K. A.; TANGNEY, C.; LI, H.; OUYANG, B.; EVANS, D. A.; MORRI, M. C. Longitudinal association of vitamin B-6, folate, and vitamin b-12 with depressive symptoms among older adults over time. The American Journal of Clinical Nutrition, v. 92, 330-5, 2010.

SOUSA, M.; BRÁS-SILVA, C.; LEITE-MOREIRA, A. O papel da leptina na regulação da homeostasia energética. Acta Medica Portuguesa, v. 22 (2), 291-8, 2009.

SPANGLER, R.; WITTKOWSKI, K. M.; GODDARD, N. L.; AVENA, N. M.; HOEBEL, B. G.; LEIBOWITZ, S. F. Opiate-like effects of sugar on gene expression in reward areas of the rat brain. Molecular Brain Research, v. 124, 134-42, 2004.

STEVENS, B.; YAMADA, J.; OHLSSON, A. Sucrose for analgesia in newborn infants undergoing painful procedures (review). John Wiley & Sons Ltd., 2010. Disponível em: <http://www.thecochranelibrary.com>. Acessado em 21/06/2012.

SZEWCYK, B.; POLESZAK, E.; SOWA-KUÆEMA, M.; SIWEK, M.; DUDEK, D.; RYSZEWSKA-POKRAOENIEWICZ, B.; RADZIWOÑ-ZALESKA, M.; OPOKA, W.; CZEKAJ, J.; PILC, A.; NOWAK, G. Antidepressant activity of zinc and magnesium in view of the current hypotheses of antidepressant action. Pharmacological Reports, v. 60, 588-599, 2008.

TIEMEIER, H.; TUIJL, R. V.; HOFMAN, A.; MEIJER, J.; KILIAAN, A. J.; BRETELER, M. M. B. Vitamin B12, Folate, and Homocysteine in Depression: The Rotterdam Study. The American Journal of Psychiatry, v. 159, 2099-101, 2002.

VISMARI, L.; ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Depressão, antidepressivos e sistema imune: um novo olhar sobre um velho problema, Revista de Psiquiatria Clínica, v. 35 (5), 196-204, 2008.

VITOR, A. O. PONTE, E. L.; SOARES, P. M.; RODRIGUES, M. E. S.; LIMA, R. C. S.; CARVALHO, K. M.; PATROCÍNIO, M. C. A.; VASCONCELOS, S. M. M. Psicofisiologia da dor: uma revisão bibliográfica. Revista Eletrônica de Comunicação Informação & Inovação em Saúde (RJ), v. 2, 87-96, 2008.

WANG, G. J.; VOLKOW, N. D.; LOGAN, J.; PAPPAS, N. R.; WONG, C. T.; ZHU, W.; NETUSIL, N.; FOWLER, J. S. Brain dopamine and obesity. Lancet, v. 357, 354-7, 2001.

WILDING, J. P. H. Neuropeptides and appetite control. Diabetic Medicine, v. 19, 619-27, 2002.

Winkelmann-Duarte, E. C.; -H., C. B. P.; MARTINS, D. F.; SCHUH, A. F. S.; FERNANDES, M. C.; SANTIN, R.; MERLO, S.; SANVITTO, G. L.; LUCION, A. B. Early-life environmental intervention may increase the number of neurons, astrocytes, and cellular proliferation in the hippocampus of rats. Experimental Brain Research v. 215 (2), 163-72, 2011.

WRIGHT, E. M.; HIRAYAMA, B. A.; LOO, D. F. Active sugar transport in health and disease. Journal of Internal Medicine, v. 261, 32-43, 2007.

WURTMAN, R. J. Ways that foods can affect the brain. Nutrition reviews, supplement, may, 1986.