

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

VIVIAN FERREIRA RECH

**AVALIAÇÃO DE ASPECTOS COMPORTAMENTAIS E ESTRESSE OXIDATIVO
HIPOCAMPAL EM ANIMAIS COM ACESSO A AÇÚCAR E ASPARTAME
DURANTE O DESENVOLVIMENTO**

PORTO ALEGRE

2017/2

VIVIAN FERREIRA RECH

**AVALIAÇÃO DE ASPECTOS COMPORTAMENTAIS E ESTRESSE OXIDATIVO
HIPOCAMPAL EM ANIMAIS COM ACESSO A AÇÚCAR E ASPARTAME
DURANTE O DESENVOLVIMENTO**

Trabalho apresentado à Faculdade de Veterinária como
requisito parcial para a obtenção da graduação em Medicina
Veterinária

Orientadora: Profa. Dra. Carla Dalmaz

PORTO ALEGRE

2017/2

*Dedico este trabalho à canina Candy
e sua paixão pelas guloseimas alheias.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus familiares. À minha mãe pela ausência de erros gramaticais no presente trabalho, ao meu pai pelas inúmeras análises estatísticas e à minha vó e tio, pelo apoio incondicional nos momentos mais difíceis dessa jornada.

Agradeço à minha orientadora Prof. Carla Dalmaz pela oportunidade, pela extrema dedicação, paciência, didática e por despertar e me acompanhar nessa rota da bioquímica, desde o primeiro semestre da faculdade.

Agradeço às pós-graduandas do lab 37 por toda ajuda ao longo dessa pesquisa, especialmente à Danusa pela introdução do assunto e, mesmo de longe, pelo apoio. Aos ICs, Emily e Rafael, pela ajuda nas intermináveis semanas de comportamentos, tabelas, vídeos e principalmente por todas as risadas.

Um agradecimento especial à Natividade, que atravessou o oceano para abraçar esse projeto comigo.

Agradeço a todos os amigos que conquistei ao longo da faculdade, em especial a Nathália Retamal, que esteve ao meu lado, me dando força, carona e me proporcionando as melhores e piores crises de riso, desde o primeiro dia na UFRGS e a Vanessa Dalla, por aturar todas as crises existenciais e a bagunça em casa.

Um agradecimento aos meus amigos do ensino médio Renata, Débora e William, que sempre acreditaram em mim e na realização desse sonho.

Por último, agradeço a minhas caninas Candy e Olívia e suas invejáveis sonecas enquanto eu escrevia esse trabalho.

RESUMO

A ansiedade de separação é uma doença comum em cães e não possui uma causa específica conhecida. Durante os períodos de desenvolvimento nos cães, o encéfalo está passando por processos de maturação, dessa forma, intervenções ambientais precoces podem alterar a programação metabólica no encéfalo. O manejo nutricional nesse período é extremamente importante para o desenvolvimento adequado. A ingestão de adoçantes, como o aspartame, está relacionada a diversas alterações cognitivas e ao comportamento do tipo ansioso, que estão associadas ao hipocampo. Foi realizada uma pesquisa online com 638 proprietários de cães, que constatou que alimentos contendo açúcar e adoçantes são frequentemente fornecidos aos animais. Adicionalmente, através de um modelo experimental com ratos Wistar de 21 dias, foram investigados danos no hipocampo dorsal e ventral, resultantes da ingestão crônica de aspartame ou sacarose. Foram realizadas tarefas comportamentais para avaliação de memória espacial de curta e longa duração e comportamento tipo ansioso, além de ensaios para determinação da atividade de enzimas antioxidantes, conteúdo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e conteúdo total de grupos tiol no hipocampo dorsal e ventral desses animais. As tarefas comportamentais não apresentaram alterações significativas. Nos estudos bioquímicos, alterações sexo-específicas e estrutura-específicas foram observadas: diminuição da atividade da catalase (CAT) no grupo aspartame e aumento na razão superóxido dismutase (SOD)/ [CAT+glutathione peroxidase (GPx)] no grupo sacarose no hipocampo dorsal das fêmeas. No hipocampo ventral das fêmeas foi constatado uma diminuição dos tióis no grupo aspartame e uma tendência a diminuição da atividade da SOD e da razão SOD/ (CAT+GPx) no grupo sacarose. No hipocampo dorsal dos machos, houve um aumento da atividade da GPx no grupo sacarose em relação ao grupo aspartame e uma diminuição dos tióis nos grupos aspartame e sacarose. Não houve alterações significativas no hipocampo ventral dos machos. Os resultados sugerem uma maior vulnerabilidade do hipocampo dorsal ao estresse oxidativo após tratamento com aspartame; além disso, o hipocampo ventral de fêmeas também mostrou-se vulnerável a danos oxidativos causados por adoçantes. Como perspectiva, seria interessante padronizar testes cognitivos aplicáveis para o período peripúbere.

Palavras-chave: aspartame; sacarose; ansiedade; hipocampo; estresse oxidativo; alterações cognitivas.

ABSTRACT

Separation anxiety is a common disease in pet dogs and has no known specific cause. During development periods in dogs, the brain is undergoing maturation processes, so early environmental interventions can alter metabolic programming in the brain. Nutritional management during this period is extremely important for proper development. Ingestion of sweeteners, such as aspartame, is related to various cognitive changes and anxiety-like behaviors that are associated with the hippocampus. An online survey was conducted with 638 dog owners, in which it was found that foods containing sugar and sweeteners are often provided to animals. In addition, through an experimental model with 21-day Wistar rats, the damage in the dorsal and ventral hippocampus resulting from the chronic intake of aspartame or sucrose was investigated. Behavioral tasks were performed to evaluate the short and long term spatial memory and anxiety behavior, as well as tests to determine the activity of antioxidant enzymes, reactive oxygen and nitrogen species content and total content of thiol groups in the dorsal and ventral hippocampus of these animals. Behavioral tasks did not show significant changes. Biochemical measurements indicated sex-specific and structure-specific changes: decreased catalase (CAT) activity in the aspartame group and increased superoxide dismutase (SOD) / [CAT + glutathione peroxidase (GPx)] ratio in the sucrose group in the dorsal hippocampus of females. In the ventral hippocampus of females, a decrease of the thiols in the aspartame group and a tendency to decrease the SOD activity and SOD / (CAT + GPx) ratio in the sucrose group were observed. In the dorsal hippocampus of males, there was an increase in GPx activity in the sucrose group compared to the aspartame group and a decrease in thiols in the aspartame and sucrose groups. There were no significant changes in the ventral hippocampus of males. The results suggest a higher vulnerability of the dorsal hippocampus to the oxidative damages caused by sweeteners. In addition, female ventral hippocampus was also susceptible to oxidative stress. Cognitive tests should be standardized for the peripubertal period.

Keywords: aspartame; sucrose; anxiety; hippocampus; oxidative stress; cognitive impairments.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	- Molécula de aspartame (L-alfa-aspartil-L-fenilalanina metil éster)..	14
FIGURA 2	- Divisão dos animais em diferentes grupos aos 21 dias.....	20
FIGURA 3	- Linha do tempo do desmame dos animais ao seu sacrifício.....	21
FIGURA 4	- Gráficos do teste da tarefa do labirinto em Y.....	27
FIGURA 5	- Gráficos do teste da tarefa do reconhecimento de objetos.....	28
FIGURA 6	- Gráficos da tarefa do campo aberto.....	30
FIGURA 7	- Gráficos da tarefa do claro-escuro.....	31
FIGURA 8	Gráficos de parâmetros do estresse oxidativo do hipocampo dorsal - das fêmeas.....	33
FIGURA 9	Gráficos de parâmetros do estresse oxidativo do hipocampo ventral - das fêmeas.....	34
FIGURA 10	Gráficos de parâmetros do estresse oxidativo do hipocampo dorsal - dos machos.....	36
FIGURA 11	Gráficos de parâmetros do estresse oxidativo do hipocampo ventral - dos machos.....	37
FIGURA 12	Gráficos da técnica de citometria de fluxo no hipocampo dorsal e - ventral das fêmeas.....	38
FIGURA 13	Gráficos da técnica de citometria de fluxo no hipocampo dorsal e - ventral dos machos.....	39
FIGURA 14	- Fontes e geração de diferentes espécies reativas de oxigênio.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AAFCO	-	The Association of American Feed Control Officials
ANOVA	-	Análise de variância
CAT	-	Catalase
DAF	-	difluorofluoresceína diacetato
DCF	-	diclorofluoresceína diacetato
DCFH	-	diclorofluoresceína diacetato reduzido
GPx	-	Glutathione Peroxidase
NO	-	Óxido Nítrico
SOD		Superóxido Dismutase
TAAN	-	Transportador de aminoácidos neutros
UFRGS	-	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	Período de socialização e juvenil.....	10
1.2	Panorama atual sobre a alimentação canina.....	11
1.3	Açúcar e adoçantes artificiais.....	12
1.4	Aspartame.....	13
1.5	Comportamento do tipo ansioso em cães.....	16
1.6	Objetivo.....	17
2	DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1	Metodologia.....	17
2.1.1	Questionário Online.....	17
2.1.2	Avaliação dos efeitos de tratamento com aspartame e com sacarose durante a peripuberdade em um modelo animal utilizando ratos Wistar de ambos os sexos.....	19
2.1.2.1	Animais.....	19
2.1.2.2	Exposição às soluções.....	19
2.1.2.3	Avaliação da fase do ciclo estral.....	20
2.1.2.4	Tarefas comportamentais.....	21
2.1.2.4.1	Labirinto Y.....	21
2.1.2.4.2	Reconhecimento de objetos.....	22
2.1.2.4.3	Teste claro-escuro.....	22
2.1.2.4.4	Campo Aberto.....	23
2.1.2.5	Análises bioquímicas.....	23
2.1.2.5.1	Estresse oxidativo.....	23
2.1.2.5.2	Catalase.....	23
2.1.2.5.3	Glutathiona peroxidase.....	24
2.1.2.5.4	Superóxido Dismutase.....	24
2.1.2.5.5	Ensaio para determinação do conteúdo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	25
2.1.2.5.6	Ensaio para determinação do conteúdo total de grupos tióis.....	25

2.1.2.5.7	Determinação do conteúdo total de proteínas nas amostras.....	26
2.1.3	Análise estatística.....	26
2.2	Resultados	26
2.2.1	Medidas de consumo.....	26
2.2.2	Questionário.....	27
2.2.3	Labirinto em Y.....	27
2.2.4	Reconhecimento de Objetos.....	28
2.2.5	Campo aberto.....	29
2.2.6	Claro-escuro.....	31
2.2.7	Estresse Oxidativo.....	32
2.3	Discussão	39
2.3.1	Estresse Oxidativo.....	39
2.3.2	Labirinto em Y.....	43
2.3.3	Reconhecimento de Objetos.....	44
2.3.4	Exposição ao Campo Aberto.....	44
2.3.5	Transições claro-escuro.....	44
3	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47
	APÊNDICE A- Questionário online sobre hábitos dos cães e seus proprietários no Brasil	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 Período de socialização e juvenil

O cães possuem um período de desenvolvimento, quando filhotes, que pode ser dividido em quatro estágios. São eles: o período neonatal; o período de transição; o período de socialização; e o período juvenil. Esses períodos do desenvolvimento são seguidos pelo estágio adulto (GRANDJEAN; BUTTERWICK, 2012). Durante esses períodos, até a chegada da fase adulta, o encéfalo está passando por uma processo de vulnerabilidade, caracterizado pela extensa maturação – marcada por processos fundamentais de desenvolvimento, como organização funcional das redes neurais, podas sinápticas, proliferação neural, migração, diferenciação, além de gliogênese e mielinização (RICE; BARONE, 2000), que irão influenciar o processo final da maturação dos circuitos neuroquímicos do sistema nervoso central (PAUS; KESHAVAN; GIEDD, 2008). Dessa forma, intervenções ambientais precoces podem alterar a programação encefálica e metabólica, além de influenciarem na susceptibilidade a doenças ou na sua resiliência ao longo da vida (MENNELLA; CASTOR, 2012).

O período de socialização, que é representado entre a terceira e décima segunda semana de vida, é extremamente importante, por sua influência no desenvolvimento de um temperamento estável no cão adulto. Acredita-se que muitos dos problemas sociais e comportamentais observados em cães adultos são provenientes do tratamento insatisfatório ou da interação insuficiente durante esse estágio de desenvolvimento. No período juvenil, os filhotes já apresentam habilidades motoras semelhantes às dos cães adultos.

No decorrer do crescimento do animal, é essencial o fornecimento de uma alimentação equilibrada, específica para a espécie, dentro do padrão das exigências nutricionais para a idade. O uso de guloseimas e petiscos não destinados propriamente a cães não é recomendado, pelo risco de desbalanço nutricional (GRANDJEAN; BUTTERWICK, 2012).

1.2 Panorama atual sobre a alimentação canina

O mercado de produtos destinados a animais de estimação aumenta a cada ano, segundo dados da Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação (ANFAL-PET), além da grande diversidade de opções de alimentos comerciais para cães e gatos. Contudo, muitos proprietários ainda optam pela comida caseira para alimentação de seus animais. Um estudo realizado no Espírito Santo, por meio de questionários aplicados durante consultas veterinárias, atestou que, segundo as respostas de 90% dos proprietários, o principal alimento fornecido aos cães é ração comercial seca. Dentre os 16% que recebiam somente alimentação caseira, 74% destes cães ingeria o mesmo alimento preparado para consumo familiar, e 26% ingeria alimento preparado exclusivamente para o cão. Dos proprietários de cães que participaram da pesquisa supracitada, 81% buscavam informações sobre a alimentação para os animais, sendo as principais fontes lojas agropecuárias, *petshops*, consultas a veterinários e estudantes de veterinária, internet, revistas e amigos (APTEKMANN et al., 2013).

Um estudo realizado por Streiff et al., 2002, constatou que, na alimentação caseira preparada pelos proprietários, a energia, a gordura e a proteína estavam acima das recomendações da AAFCO (The Association of American Feed Control Officials), enquanto que o cálcio, a razão Ca: P e as vitaminas A e E estavam abaixo das recomendações. A análise mineral da comida caseira revelou que as concentrações de potássio, cobre e zinco estavam abaixo das recomendações da AAFCO, enquanto o magnésio, manganês, ferro e sódio excediam os mínimos de AAFCO. Na dieta comercial, todas as variáveis, exceto a razão Ca: P, estavam significativamente acima das recomendações da AAFCO. Apesar das semelhanças de conteúdo energético, possíveis preocupações nutricionais com alimentação caseira foram que alguns macrominerais, vitaminas lipossolúveis, incluindo antioxidantes e minerais, potássio, cobre e zinco, estavam abaixo das recomendações.

Berschneider (2012) afirma que à medida que os donos de animais de estimação se tornam mais conscientes de suas próprias dietas e do impacto que estas têm em sua saúde, naturalmente se tornam mais interessados no que seus animais de estimação estão comendo e como isso pode estar afetando a saúde do animal de estimação. Muitos estão explorando alternativas para alimentos comerciais padrão para animais de estimação, porém essa escolha

deve ser orientada por médicos veterinários, a fim de evitar deficiências nutricionais e diferentes complicações decorrentes de uma alimentação desbalanceada (KAWAGUCHI et al., 1993; STREIFF *et al.*, 2002; FORNEL-THIBAUD *et al.*, 2007).

Após a realização de um estudo sobre as práticas de alimentação de criadores de cães nos Estados Unidos e no Canadá, Connolly *et al.* (2014) sugeriram que veterinários assumissem um papel mais proativo em relação à alimentação de animais de estimação e de canis de criação, por meio da orientação aos respectivos proprietários com fontes cientificamente comprovadas, além de explicar a importância dos padrões nutricionais atuais para reprodução e desenvolvimento inicial de cães.

1.3 Açúcar e adoçantes artificiais

O uso de açúcares em alimentos e bebidas teve um aumento significativo durante as últimas décadas, causando, conseqüentemente, um aumento nos índices de distúrbios metabólicos, e tendo em vista que muitos proprietários de cães os alimentam com o mesmo alimento utilizado por eles, cabe aqui considerar os efeitos do aumento do consumo de alimentos adoçados. Estudos epidemiológicos relacionam a ingestão diária de açúcar com o aumento da prevalência de obesidade, diabetes tipo II, hipertensão, doença cardiovascular e sobrepeso (SWITHERS; MARTIN; DAVIDSON, 2010; VAN BAAK; ASTRUP; 2008, JOHNSON et al., 2009; SWITHERS, 2013) De fato, alimentos nutritivos, como bebidas lácteas e cereais com adição de açúcares, trazem efeitos benéficos nas dietas infantis e de adolescentes (JOHNSON et al., 2009). Entretanto, para atender os limites recomendados por agências federais, os americanos deveriam reduzir sua ingestão diária de açúcar em até três vezes (WELLS; BUZBY, 2008). Bray et al. (2004) estimaram que entre 1978 e 1995 houve um aumento na ingestão de açúcares referente a 83 kcal/dia, chegando a uma média de 318 kcal/dia por pessoa. Durante o mesmo período, foi avaliado também o consumo de xarope de milho, rico em frutose, com um aumento de 80 para 132 kcal/dia por pessoa. Em 2005, Wells et al relataram um consumo aproximado de 477 kcal/dia por pessoa, equivalendo a 30 colheres de chá de açúcar, atingindo aproximadamente 24 por cento da ingestão calórica diária total para uma pessoa com uma dieta de 2.000 kcal por dia.

Alternativas não calóricas para atribuir sabor doce aos alimentos são os adoçantes artificiais. Estes foram popularizados na tentativa de evitar o ganho de peso e diminuir a incidência de doenças metabólicas provenientes da alta ingestão de açúcar. Seu consumo e acesso, até 2008, aumentaram aproximadamente 30 por cento em adultos e 15 por cento na faixa etária de 2 a 17 anos (SYLVETSKY *et al.*, 2012).

Entretanto, estudos revelaram diversos efeitos maléficos provenientes da ingestão diária de adoçantes artificiais. Após um estudo, Fowler et al (2008) reportaram que, dentre os participantes que estavam dentro do peso normal ou no limite mínimo do sobrepeso, os indivíduos que consumiam adoçantes artificiais tinham um maior risco de ganho de peso e obesidade comparado aos que não consumiam. Swithers (2013) analisou diversas pesquisas de coorte e concluiu um maior risco de síndrome metabólica em consumidores de adoçantes artificiais se comparado com indivíduos que não consumiam. Fagherazzi et al. (2013) e De Koning et al. (2011) constataram que o risco de desenvolvimento da diabetes tipo II foi maior que o dobro em indivíduos com níveis elevados de consumo de bebidas artificialmente adoçadas comparado a não-consumidores. O risco de doença arterial coronariana também foi significativamente elevado em mulheres que consumiam mais de 2 porções (1 porção= 1 colher de chá) por dia ou mais de 2 porções de açúcares por dia (FUNG et al., 2009). Segundo um estudo realizado por Romano et al. (1990), alguns efeitos adversos causados pelo aspartame incluem dor de cabeça, mudança de humor, insônia e convulsões. Além disso, outros efeitos, incluindo confusão mental, transtornos de personalidade, tonturas e dificuldades visuais, já foram relatados (PEPINO, 2015).

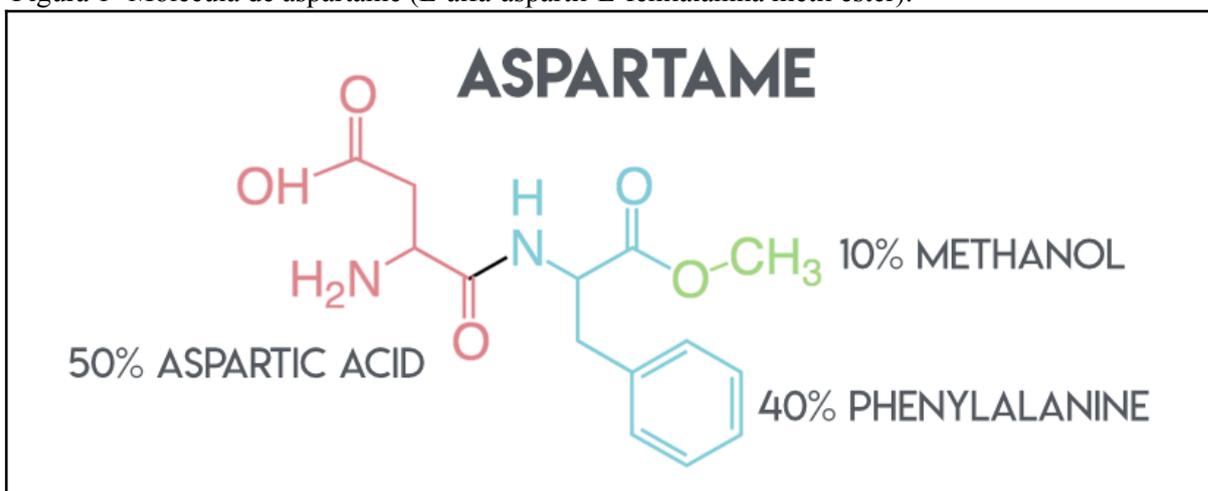
1.4 Aspartame

Atualmente, no Brasil, existem 15 edulcorantes aprovados para uso pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Um adoçante artificial amplamente conhecido e utilizado é o aspartame (figura 1), composto quimicamente pelos aminoácidos fenilalanina e aspartato, ligados por meio de uma ligação peptídica, com a carboxila da fenilalanina esterificada pelo metanol (L-alfa-aspartil-L-fenilalanina metil éster). Diferentemente de outros adoçantes artificiais, que são excretados em grande parte inalterados, o aspartame é

metabolizado no organismo após a ingestão. Seu poder adoçante é aproximadamente 200 vezes maior que o da sacarose.

Diversos estudos já apontaram efeitos negativos no consumo diário de aspartame, que, ao ser ingerido, forma, através de sua hidrólise no organismo, metabólitos fenilalanina (50% da massa do aspartame é convertido neste aminoácido), aspartato (40%) e metanol (10%) (BURGERT et al, 1991).

Figura 1- Molécula de aspartame (L-alfa-aspartil-L-fenilalanina metil éster).



Fonte: <https://aspartameffup.wordpress.com/2013/05/23/descricao/> adaptado.

O metanol, que representa, em massa, dez por cento dos metabólitos do aspartame, é posteriormente metabolizado para formaldeído. Ambos são tóxicos para o organismo quando acumulados, podendo causar problemas de visão, dores de cabeça, tontura, náusea, entre outros (EKONG, 2008; ASHOK; SHEELADEVI; WANKHAR, 2014; ASHOK et al., 2015). Além disso, o metanol e o formaldeído também são conhecidos por serem substâncias carcinogênicas e mutagênicas (HUMPHRIES; PRETERIOUS; NAUDE, 2008). Diversos estudos sobre a toxicidade do metanol proveniente da ingestão de aspartame vem sendo publicados e há posicionamentos divergentes. Ashok et al. (2014) reportaram, através da utilização de ratos deficientes em folato tratados com metotrexato (a fim de imitar o metabolismo do metanol), que o tratamento crônico com aspartame causou alterações no comportamento dos animais, consideradas pela observação de ansiedade e alteração locomotora, e sugerem que o metanol liberado após a ingestão de aspartame tem efeitos

negativos no cérebro. Já Rycerz et al. (2013) afirmam que o metanol contido no aspartame é insuficiente para provocar alterações no SNC.

A fenilalanina, além de desempenhar um papel essencial na formação e metabolismo de aminoácidos e na estruturação de proteínas em todos os tecidos, desempenha um papel importante na regulação dos neurotransmissores (CABALLERO; WURTMAN, 1988). Após sua ingestão, parte da fenilalanina é convertida em tirosina no fígado, através da ação da enzima fenilalanina hidroxilase e depois em L-3,4-di-hidroxifenilalanina, dopamina, noradrenalina e adrenalina (RYCERZ; JAWORSKA-ADAMU, 2013). O restante ingerido segue outra via e, para atravessar a barreira hematoencefálica, liga-se a um transportador de aminoácidos neutros (TAAN); (HUMPHRIES; PRETERIOUS; NAUDE, 2008). Todos os aminoácidos que podem atravessar a barreira hematoencefálica competem pelo transportador para realizar a passagem. Sua afinidade é proporcional à concentração de aminoácidos no sangue. Portanto, concentrações mais altas de determinado aminoácido no sangue aumentam a capacidade deste em se ligar a um transportador. O consumo de aspartame aumenta os níveis de fenilalanina no plasma e gera uma sobrecarga do aminoácido (HUMPHRIES; PRETERIOUS; NAUDE, 2008). Isso resulta na ligação da fenilalanina aos transportadores que cruzam a barreira e, desse modo, a saturação de TAAN faz com que outros aminoácidos necessários para a síntese de proteínas e neurotransmissores não possam chegar ao cérebro. Um dos aminoácidos não essenciais que utilizam a o transportador para atravessar a barreira hematoencefálica é a tirosina, que é necessária para a síntese de dopamina. Um exemplo de aminoácido essencial que também necessita do transportador é o triptofano, envolvido na formação de serotonina. Níveis mais baixos de serotonina na substância negra no mesencéfalo, hipocampo e núcleo da rafe do tronco cerebral afetam o sono, a memória, a percepção sensorial, a função neuroendócrina, o apetite e o humor. Além disso, essa situação pode levar a possíveis distúrbios de regulação da temperatura, depressão e ansiedade em adultos (RYCERZ; JAWORSKA-ADAMU, 2013; HUMPHRIES; PRETERIOUS; NAUDE, 2008). A elevação nos níveis sanguíneos de fenilalanina após a ingestão de aspartame já foi previamente documentada por Stegink et al. (1988).

O aspartato é outro metabólito do aspartame que também tem seus níveis no sangue e no encéfalo aumentados com o consumo crônico de aspartame (EKONG, 2008). Este se caracteriza por ser um aminoácido não essencial e atuar como neurotransmissor no cérebro,

sendo responsável pela transmissão de impulsos entre os neurônios. É precursor de aminoácidos como asparagina, glutamato e glutamina, que também desempenham funções como neurotransmissores. Tanto a absorção quanto a liberação desses neurotransmissores dependem de íons de cálcio. O excesso dos neurotransmissores no meio extracelular causa desregulação da concentração iônica nas células, e o aumento dos níveis de cálcio intracelular leva à liberação de quantidades substanciais de glutamato, causando hiperexcitabilidade dos neurônios. Esse fenômeno é denominado excitotoxicidade, sendo aspartato e glutamato as excitotoxinas (HAMILTON; ATTWELL, 2010). Essa estimulação contínua das células nervosas gera consequências como o esgotamento das reservas de ATP com resultante acometimento das respostas fisiológicas. Há, em função disso, um dano mitocondrial na célula e alterações do metabolismo energético. Há também um dano na membrana celular, sendo liberadas espécies reativas de oxigênio, causando estresse oxidativo e degeneração de células nervosas e glia (RYCERZ; JAWORSKA-ADAMU, 2013).

É interessante observar os metabólitos do aspartame geram um desequilíbrio entre neurotransmissores e possibilidade de estresse oxidativo, que podem ser fatores relacionados a indução do comportamento do tipo ansioso. (ASHOK; SHEELADEVI; WANKHAR, 2014; ONAOLAPO; ONAOLAPO; NWOHA, 2017; HUMPHRIES; PRETERIOUS; NAUDE, 2008; RYCERZ; JAWORSKA-ADAMU, 2013)

1.5 Comportamento do tipo ansioso em cães

A ansiedade é uma doença presente em cães que normalmente possuem comportamentos de hipervinculação ao dono e, na sua ausência, tendem a apresentar comportamento destrutivo, de vocalização, isolamento e até depressão. Estes são classificados como sintomas da ansiedade de separação, presente em cães sem predileção por raça; estudos apontam, contudo, uma maior frequência em cães de rua recolhidos em canis de adoção, sendo o terceiro problema de comportamento mais frequente da Clínica de Comportamento Animal da Universidade de Cornell, nos Estados Unidos. Seus sinais costumam aparecer ainda na fase de desenvolvimento (TAKEUCHI et al., 2001). Seu diagnóstico normalmente é clínico, pelo histórico do animal. O diagnóstico é feito por um médico veterinário e seu tratamento consiste em terapia e, em casos extremos, a associação de medicação como

benzodiazepínicos. (DIAS et al., 2012). Um estudo de natureza experimental (SOARES; PEREIRA; PAIXÃO, 2010) realizado em Niterói (RJ), com proprietários que viviam em apartamentos, revelou que 55,9% dos 92 cães que participaram do projeto apresentaram resultado positivo para o teste de diagnóstico de ansiedade de separação.

1.6 Objetivo

Neste estudo, aplicou-se uma pesquisa com o objetivo de conhecer os principais hábitos da alimentação de cães no Brasil e aspectos comportamentais relacionados à ansiedade nos mesmos. Além disso, na tentativa de entender como o consumo precoce de açúcar e de aspartame pode influenciar o comportamento do tipo ansioso e cognitivo durante a pré-puberdade e a puberdade de animais, essa presente pesquisa também teve por objetivo, em um modelo animal experimental, realizar uma avaliação de diferentes aspectos comportamentais, além de correlacionar com possíveis alterações em parâmetros de estresse oxidativo hipocampal usando ratos machos e fêmeas, que foram submetidos ao consumo crônico de aspartame e sacarose desde a pré-puberdade até a adolescência. O propósito do trabalho é elucidar eventuais dúvidas de veterinários e proprietários em relação ao uso de alimentos adoçados na alimentação de seus cães de estimação.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 Metodologia

2.1.1 Questionário Online

Para realização de um experimento é necessária aprovação previa do comitê de ética. Contudo, se o experimento for aplicado de forma a salvaguardar a identidade do informante, o que ocorre em formulários preenchidos via internet, tal autorização não é requerida. Este foi o procedimento adotado em parte desta pesquisa. Foi aplicado um questionário, via formulários Google e divulgado via Facebook, com o objetivo de depreender os fatores que estão relacionados direta ou indiretamente com comportamento do tipo ansioso e sua relação com

hábito de ingestão de alimentos que contêm em sua fórmula açúcar ou adoçantes artificiais. A metodologia empregada nesta pesquisa seguiu os parâmetros indicados em Kenedy (2015) com relação a proporção de sentenças distratoras e controle em relação às sentenças alvo: para um número 8 de sentenças alvo, criou-se 12 distratoras e 2 sentenças controle. As sentenças alvo foram distribuídas em dois grupos: 4 referentes ao comportamento do tipo ansioso do cão; e 4 referentes a frequência de ingestão de alimentos que contêm açúcar ou aspartame em sua composição. As questões sobre ansiedade foram construídas com base em Soares et al., 2010; já as questões referentes aos alimentos foram formuladas a partir de uma pesquisa prévia da autora em rótulos de alimentos destinados a cães e pela realização de entrevistas informais com pessoas conhecidas. A importância das distratoras em um experimento como o que aplicamos é de obter uma resposta mais confiável, uma vez que não manipulada pelo informante. O ideal para pesquisas desta natureza é que o informante não tenha a ciência dos fatores que estão sendo investigados, não conduzindo, dessa forma, as respostas. Já as sentenças controle têm como finalidade avaliar o grau de atenção do participante no preenchimento do questionário. Uma sentença controle deve perguntar sobre algo que não dê margem para mais de uma resposta e que seja de fácil compreensão; dessa forma, é esperado que qualquer participante, atento ao questionário, dê a mesma resposta. Os participantes que responderam as sentenças controle diferentemente do esperado foram descartados na análise estatística. Antes da socialização do questionário via internet, foi aplicada uma versão a informantes, com o objetivo de avaliar possíveis problemas na construção do experimento. Esse teste foi enviado pela pesquisadora para 8 participantes não vinculados à área da pesquisa e sem conhecimento sobre o assunto a ser investigado pelas questões do questionário. A realização desta etapa permitiu a correção de um dos contextos formulados (ANEXO 1). O objetivo das sentenças alvo era verificar se os cães dos participantes ingeriam alimentos que continham açúcar ou adoçantes artificiais. A questão 8 indagava se o participante costumava dar gelatina aos cães; o resultado do piloto indicou uma resposta negativa de todos os participantes para essa questão. Por esta razão foram inseridos os itens sorvete e picolé juntamente à gelatina para a versão final do experimento, seguido de uma solicitação da indicação de qual das três opções.

A versão final do questionário (ver ANEXO 1) foi divulgada na rede social Facebook no dia cinco de dezembro de 2017. O questionário ficou disponível por um período de quatro dias e

teve a participação de 638 informantes. Os dados foram organizados em planilha do excel, separando as sentenças alvo das distratoras e das controle. Nesta etapa, foram descartados três participantes que haviam dado uma resposta não esperada para uma ou as duas sentenças controle. Logo, foram considerados os dados de 635 informantes para este relatório. A etapa seguinte foi o tratamento estatístico dos dados. Para isso utilizou-se o programa SPSS®.

2.1.2 Avaliação dos efeitos de tratamento com aspartame e com sacarose durante a peripuberdade em um modelo animal utilizando ratos Wistar de ambos os sexos

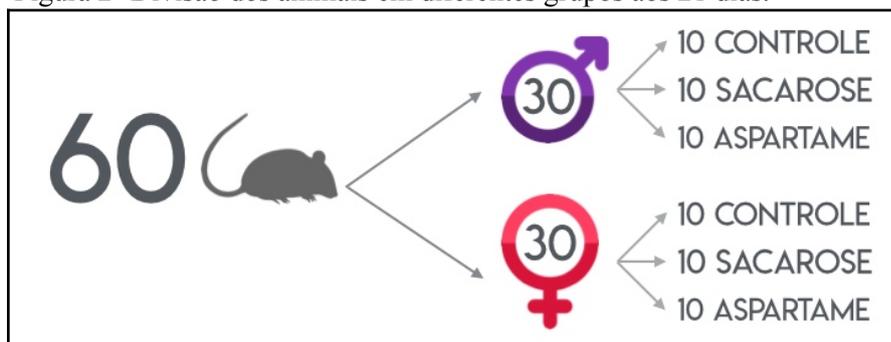
2.1.2.1 Animais

Conjuntamente, foi realizada uma pesquisa experimental, utilizando ratos Wistar machos e fêmeas de 21 dias – randomicamente selecionados, provenientes do Centro de Produção e Experimentação Animal (CEPEA) do biotério Central do Departamento de Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. Este projeto é parte de um projeto maior, já aprovado pela CEUA/ UFRGS (32823). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica – UFRGS, em sala destinada a animais em experimentação, permanecendo em caixas-moradia (4 animais por caixa), confeccionadas em *Plexiglas* medindo 41 x 34 x 16 cm, com assoalho recoberto de maravalha, em um ambiente controlado: ciclo normal claro/escuro de 12 horas, salas climatizadas ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), e com limpeza das caixas duas vezes por semana. Os animais foram mantidos com alimentação padrão *ad libitum*.

2.1.2.2 Exposição às soluções

Os animais foram divididos em três grupos (Figura 2), conforme a solução que iriam receber na água de beber: (1) controle (recebeu somente água); (2) sacarose (45g/L); e (3) aspartame (2g/L). As soluções foram disponibilizadas desde o desmame (21 dias pós-natal), e permaneceram até 55 dias de idade.

Figura 2- Divisão dos animais em diferentes grupos aos 21 dias.



Fonte: Própria autora, 2018.

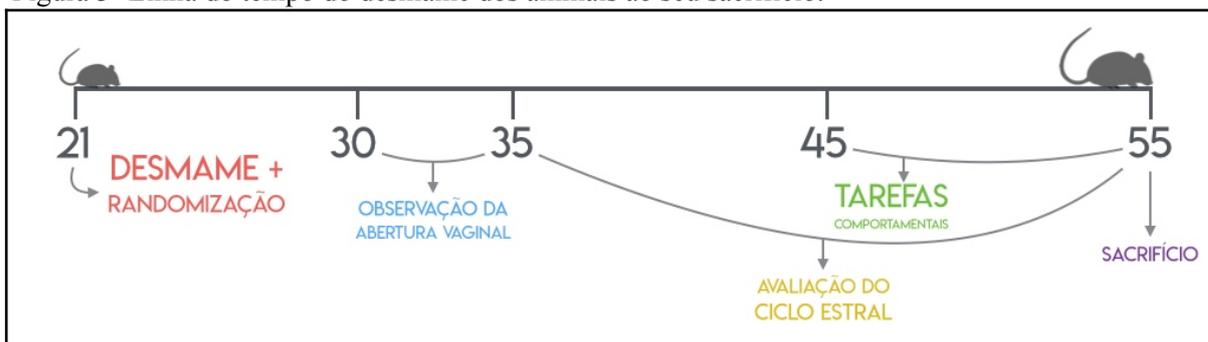
As concentrações das soluções de sacarose e aspartame foram calculadas de forma que contivessem valores equivalentes de doçura e se mantivessem dentro dos níveis de consumo diários considerados aceitáveis. Os componentes (sacarose e aspartame) foram solubilizados em água e oferecidos *ad libitum*. Da mesma forma, o grupo controle que recebeu somente água também a recebeu *ad libitum*.

O consumo das diferentes soluções e da ração padrão foi monitorado diariamente desde o desmame até o término dos comportamentos, durante a adolescência. Os consumos foram medidos por caixa-moradia, sendo os valores divididos pelo número de animais por caixa. Além disso, os animais foram pesados uma vez por semana até o fim do experimento, para controle do ganho de peso.

2.1.2.3 Avaliação da fase do ciclo estral

O ciclo estral das fêmeas foi avaliado através da retirada das ratas da caixa-moradia, introdução da ponteira fixada a uma micropipeta, contendo 50 µl de solução fisiológica (0,9%) na entrada da vagina do animal. A solução dispensada dentro do canal vaginal é coletada pela pipeta e colocada em lâmina de vidro. A amostra é imediatamente analisada em microscópio óptico, para determinação da fase do ciclo estral. Este procedimento foi realizado desde a abertura vaginal até o último dia de tarefas comportamentais (figura 3). Também foi avaliado o ciclo estral dos animais no dia do sacrifício, de forma a relacionar a influência hormonal sobre os dados obtidos.

Figura 3- Linha do tempo do desmame dos animais ao seu sacrifício.



Fonte: Própria autora, 2018.

2.1.2.4 Tarefas comportamentais

Os animais foram submetidos às tarefas comportamentais após atingirem 45 dias de idade (período da adolescência); (figura 3).

2.1.2.4.1 Labirinto Y

Esta tarefa foi realizada para avaliar memória espacial de curta duração. O labirinto Y consiste em um aparato de madeira, pintado de preto, contendo 3 braços fechados lateralmente, colocado em uma sala com dicas espaciais de formatos diferentes nas paredes. Na sessão de Treino, o acesso a um dos braços (braço novo) foi bloqueado por uma porta de guilhotina; o animal foi colocado na extremidade de um braço (braço fixo), de costas para o centro do aparato, e pôde explorar os dois braços acessíveis, durante 5 minutos. A sessão de Teste foi realizada uma hora após o treino. O rato foi colocado no braço fixo, de costas para o centro do aparato, e foi dado livre acesso aos três braços por 5 minutos. Foram registrados o número de entradas e o tempo passado em cada braço. A porcentagem de tempo que o animal passou no braço novo, na sessão de Teste, foi utilizada como indicativo da aquisição de memória espacial. Observações: O aparato foi limpo com uma solução de etanol a 30% e, em seguida, seco com uma toalha de papel após cada ensaio. Considerou-se entrada em um braço quando o animal entrou com as 4 patas no braço [CONRAD et al., 1996; PANIZ et al., 2014].

2.1.2.4.2 Reconhecimento de objetos

Esta tarefa foi realizada para avaliar memória declarativa de curta e de longa duração [ANTUNES; BIALA, 2012]. O aparato consistiu em uma caixa de madeira revestida de fórmica preta, com dimensões 50 x 50 x 50 cm. Para habituação ao aparato, os animais foram colocados neste por 20 minutos, durante 3 dias consecutivos. Na sessão de Treino, 2 objetos iguais (A e A') foram fixados no aparato, equidistantes entre si e das paredes laterais, e os animais puderam explorá-los livremente por 5 minutos. Foi realizado um teste para avaliar memória de curta duração, 2 horas após o treino, e um teste de longa duração, 24 horas após o treino. Nas sessões de Teste, um dos objetos foi substituído por um novo objeto (B ou C), e os animais foram colocados novamente no aparato por 5 minutos. As sessões foram filmadas e foi determinado o tempo de exploração dos objetos; uma porcentagem de tempo maior explorando os objetos novos (B ou C) em relação ao objeto familiar (A) foi usada como indicativo de memória (observação: foi contabilizado como tempo de exploração do objeto toda vez que o rato cheirou, tocou ou aproximou-se a menos de 3cm do objeto).

2.1.2.4.3 Teste claro-escuro

Este teste foi realizado para avaliar o comportamento tipo-ansiedade nos animais. O aparato claro-escuro (81 x 42 x 22 cm) foi dividido em dois compartimentos, sendo um deles iluminado e o outro escuro, ligados através de uma abertura que permitia o livre acesso a ambos. O animal foi colocado no centro do compartimento claro e, durante 5 minutos, se avaliou o tempo de permanência em cada compartimento, o número de transições e o tempo para a primeira transição do compartimento claro para o escuro. Roedores, sendo animais noturnos, preferem lugares menos iluminados, pelo que um aumento no tempo de permanência no compartimento claro pode ser interpretado com uma redução nos níveis de ansiedade [CRAWLEY; GOODWIN, 1980].

2.1.2.4.4 Campo Aberto

O teste do campo aberto consiste de uma arena contendo uma área central, aversiva para os ratos, e representa um modelo amplamente utilizado para a avaliação tanto da atividade motora como de comportamentos relacionados à ansiedade [PRUT; BELZUNG, 2003]. O aparato consiste de uma arena de madeira com assoalho preto (50 x 50 cm, altura 50 cm). Com o auxílio do programa de avaliação de imagens ANY-MAZE[®], foram analisados, dentro dos cinco primeiros minutos dos animais no campo aberto, no primeiro dia da habituação no aparato, o tempo de permanência, velocidade média, distância percorrida e entradas no centro do aparato, assim como na periferia do aparato. Também foram medidos a velocidade média total, a distância total percorrida e os cruzamentos no aparato. A intensidade luminosa no centro do campo aberto foi de 40 lux.

2.1.2.5 Análises bioquímicas

Para as análises bioquímicas, foram coletados o hipocampo dorsal e o hipocampo ventral dos animais submetidos aos tratamentos descritos acima.

2.1.2.5.1 Estresse oxidativo

Ensaio para determinação da atividade de enzimas antioxidantes: para os ensaios de atividade enzimática, as amostras foram pesadas e homogeneizadas em tampão Fosfato de Potássio 50mM + EDTA 1mM pH 7,4, na proporção 1:10 (W:V), e centrifugadas a 4 °C, 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi usado para os ensaios, conforme descrito abaixo.

2.1.2.5.2 Catalase

A atividade da catalase foi determinada com base na taxa de degradação do peróxido de hidrogênio, que foi monitorada por análise espectrofotométrica a 240 nm, à temperatura ambiente. As amostras (10 µL) foram pipetadas em uma placa de 96 poços, às quais foi adicionado 225 µL de tampão com ou sem peróxido de hidrogênio; imediatamente após, a

placa foi incubada a 25 °C, por 3 minutos. Foi realizada leitura a 240 nm, por 8 ciclos com intervalo de 26 segundos. A atividade da catalase foi calculada em termos de μmol de peróxido de hidrogênio consumido por minuto por mg de proteína total, usando o coeficiente de extinção molar $43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [AEBI, 1984].

2.1.2.5.3 Glutathione Peroxidase

A atividade da Glutathione Peroxidase foi determinada usando o kit comercial RANSEL (#RS504, Randox Laboratories Ltd., Reino Unido), de acordo com as instruções do fabricante. A Glutathione Peroxidase catalisa a oxidação da glutathione, que é posteriormente reduzida na presença da Glutathione Redutase, usando NADPH como dador de elétrons. A diminuição na concentração conhecida de NADPH foi monitorada por espectrofotometria a 340 nm, 25 °C, subtraindo-se a contribuição da oxidação espontânea de NADPH. A atividade da Glutathione Peroxidase foi expressa em nmol de NADPH oxidado por minuto por mg de proteína na amostra [PAGLIA; VALENTINE, 1967].

2.1.2.5.4 Superóxido Dismutase

Para este ensaio, as amostras, previamente extraídas conforme descrito acima, foram diluídas 50 vezes. A determinação da atividade da Superóxido Dismutase foi efetuada usando o kit comercial RANSOD (#SD125, Randox Laboratories Ltd., UK), de acordo com as instruções do fabricante. Xantina e Xantina Oxidase foram adicionadas às amostras, de forma a gerar radicais superóxido, que, ao reagir com INT, formaram um reagente de cor vermelha. A presença de Superóxido Dismutase na amostra inibiu a produção do cromogênio, que foi determinada por espectrofotometria a 492 nm, 37 °C. A atividade da Superóxido Dismutase, inversamente proporcional à concentração do cromogênio, foi expressa em miliunidades (mU) por mg de proteína na amostra, sendo 1 unidade equivalente a 50% de inibição da taxa de redução do INT, nas condições do ensaio. [DELMAS-BEAUVIEUX et al., 1995]

2.1.2.5.5 Ensaio para determinação do conteúdo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

- a) Espécies reativas de oxigênio: o conteúdo de espécies reativas de oxigênio foi determinado pelo método da 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato [LEBEL; ISCHIROPOULOS; BONDY, 1992]. As amostras (20 μ L, mesmas amostras usadas para os ensaios enzimáticos descritos acima) foram pipetadas em uma placa de 96 poços; após, foi adicionado 80 μ L de tampão de homogeneização e 100 μ L de DCFH₂-DA (reduzido; Sigma-Aldrich, Alemanha), no escuro. Este composto é hidrolisado por enzimas celulares e o DCFH₂ produzido é oxidado por espécies reativas presentes na amostra, produzindo DCF, que é fluorescente. Foi feita uma curva padrão de DCF (oxidado; Sigma-Aldrich, Alemanha). A placa foi incubada a 37°C, por 30 minutos, protegida da luz, e a fluorescência do DCF foi medida por excitação a 488 nm e leitura a 525 nm. A concentração da forma oxidada deste reagente nas amostras foi proporcional ao seu conteúdo de espécies reativas.
- b) Espécies reativas de nitrogênio: o conteúdo de espécies reativas de nitrogênio (óxido nítrico) foi determinado pelo método da 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato, em células vivas, através da citometria de fluxo [KOJIMA et al., 2001]. O tecido foi dissociado em 500 μ L de solução salina tamponada por fosfato (PBS) contendo colagenase IV (Sigma-Aldrich, Alemanha) e DNase (Sigma-Aldrich, Alemanha). As amostras foram filtradas através de um filtro de nylon 40 μ m (BD Biosciences, USA). Em tubos de citometria, as células em suspensão (50 μ L) foram incubadas com 1 μ M DAF-FM Diacetate (#D-23844, Molecular Probes, ThermoFisher Scientific, EUA), a 37 °C, durante 60 minutos, no escuro. A citometria de fluxo foi realizada no citômetro FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences, EUA); foram coletados 50.000 eventos por amostra. Os resultados foram expressos como mediana da intensidade de fluorescência (MFI), proporcional à concentração de óxido nítrico em cada amostra.

2.1.2.5.6 Ensaio para determinação do conteúdo total de grupos tióis

O método para determinação do conteúdo total de grupos tiol se baseia na redução de

ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) pelos grupos tiol, gerando um composto de coloração amarela (TNB), cuja concentração foi determinada por espectrofotometria a 412 nm [AKSENOV; MARKESBERY, 2001]. Os resultados foram expressos em nmol SH por mg de proteína.

2.1.2.5.7 Determinação do conteúdo total de proteínas nas amostras

O conteúdo total de proteínas nas amostras foi determinado pelo método de Lowry [LOWRY, 1951], usando albumina sérica bovina para a curva padrão.

2.1.3 Análise estatística

Os resultados foram analisados através do programa SPSS Statistics 16.0 e representados em gráficos pelo Excel 2010. Os dados paramétricos com distribuição normal foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, usando como fatores sexo e tratamento, seguida de teste post-hoc Tukey, quando adequado. Os valores foram representados através de média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05.

2.2 Resultados

2.2.1 Medidas de consumo

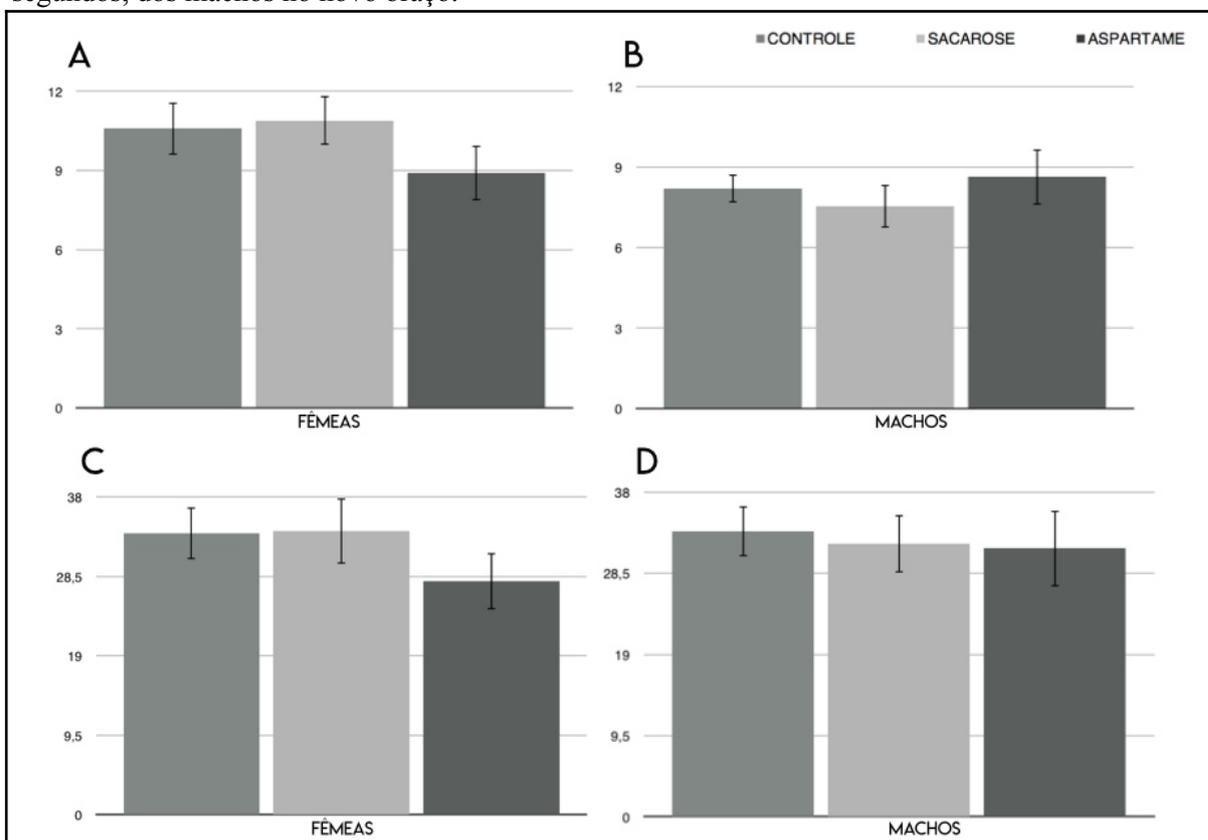
As soluções foram medidas diariamente e a ração de dois em dois dias. Os animais tratados com sacarose tendem a comer menos ração, em relação ao grupo controle e aspartame, pela compensação calórica da bebida adoçada (dados não mostrados). O grupo também consome uma quantidade maior de solução se comparado aos animais que tomam apenas água e aos animais que tomam água adoçada com aspartame ($F(2,12)=33,834$, $p<0,001$). As fêmeas do grupo sacarose (média=36,6 dias de idade) apresentam uma tendência a atingir antes a puberdade pela média do dia da abertura vaginal inferior em relação aos grupos aspartame (média=37,6 dias de idade) e controle (média=38,3 dias de idade).

2.2.2 Questionário

A maioria dos cães cujos donos participaram do questionário tem entre dois e oito anos (50,1%) e são fêmeas (57,1%). Em relação ao fornecimento de alimentos adoçados, 21,1% comem iogurtes; 14,8% comem gelatina, picolé ou sorvete; 30,5% comem bolachas doces; 75,9% comem petiscos destinados a espécie e 14,2% já receberam algum tipo de suplemento, por um período médio de um mês. Em referência a hábitos relacionados a comportamento do tipo ansioso, 55,3% dos cães manifestam alterações de comportamento como ofegação, isolamento ou até tentar impedir a saída do dono quando o proprietário pretende sair de casa. Quando sozinhos, 23,1% dos cães apresentam comportamento destrutivo, 13,4% latem em excesso e 30,2% urinam em lugares indevidos.

2.2.3 Labirinto em Y

FIGURA 4- Gráficos do teste da tarefa do labirinto em Y. Gráfico A: número de entradas das fêmeas no novo braço; gráfico B: número de entradas dos machos no novo braço; gráfico C: tempo de permanência, em segundos, das fêmeas no novo braço; gráfico D: tempo de permanência, em segundos, dos machos no novo braço.



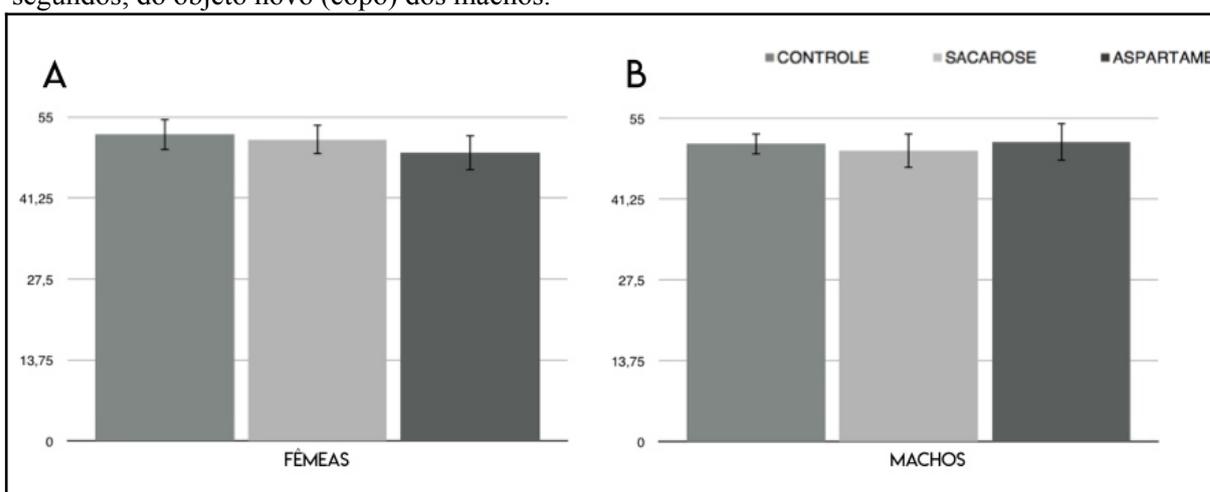
Fonte: Própria autora, 2018.

Os gráficos A e B (figura 4) representam, respectivamente, o número de entradas das fêmeas e machos no terceiro braço do aparato em Y na fase de teste do experimento, realizada uma hora após o treino. Apesar de não haver diferença significativa nas médias, ($F(2,56)=1,564$; $p=0,218$) observa-se uma tendência a um menor número de entradas em fêmeas do grupo aspartame em relação aos grupos controle e sacarose. Em contrapartida, o grupo aspartame dos machos teve um maior número médio de entradas em relação aos outros grupos. Houve um efeito significativo do sexo aonde as fêmeas, independentemente do grupo, evidenciaram um maior número de entradas no braço novo, durante o teste ($10,1\pm 0,5$ vs. $8,1\pm 0,5$; $F(1,56)=7,432$, $p=,009$).

Os gráficos C e D apresentam, em segundos, o tempo total que os animais permaneceram no braço novo no período do teste da tarefa (Figura 4). As fêmeas tratadas com aspartame apresentaram uma tendência a um menor tempo de permanência no braço novo comparado aos machos com o mesmo tratamento e aos grupos controle e sacarose que mostraram resultados similares ($F(2,56)=0,302$, $p=0,741$). Em relação aos machos, os três grupos apresentaram resultados similares.

2.2.4 Reconhecimento de Objetos

FIGURA 5- Gráficos do teste da tarefa do reconhecimento de objetos. Gráfico A: tempo de exploração, em segundos, do objeto novo (copo) das fêmeas; gráfico B: tempo de exploração, em segundos, do objeto novo (copo) dos machos.



Fonte: Própria autora, 2018.

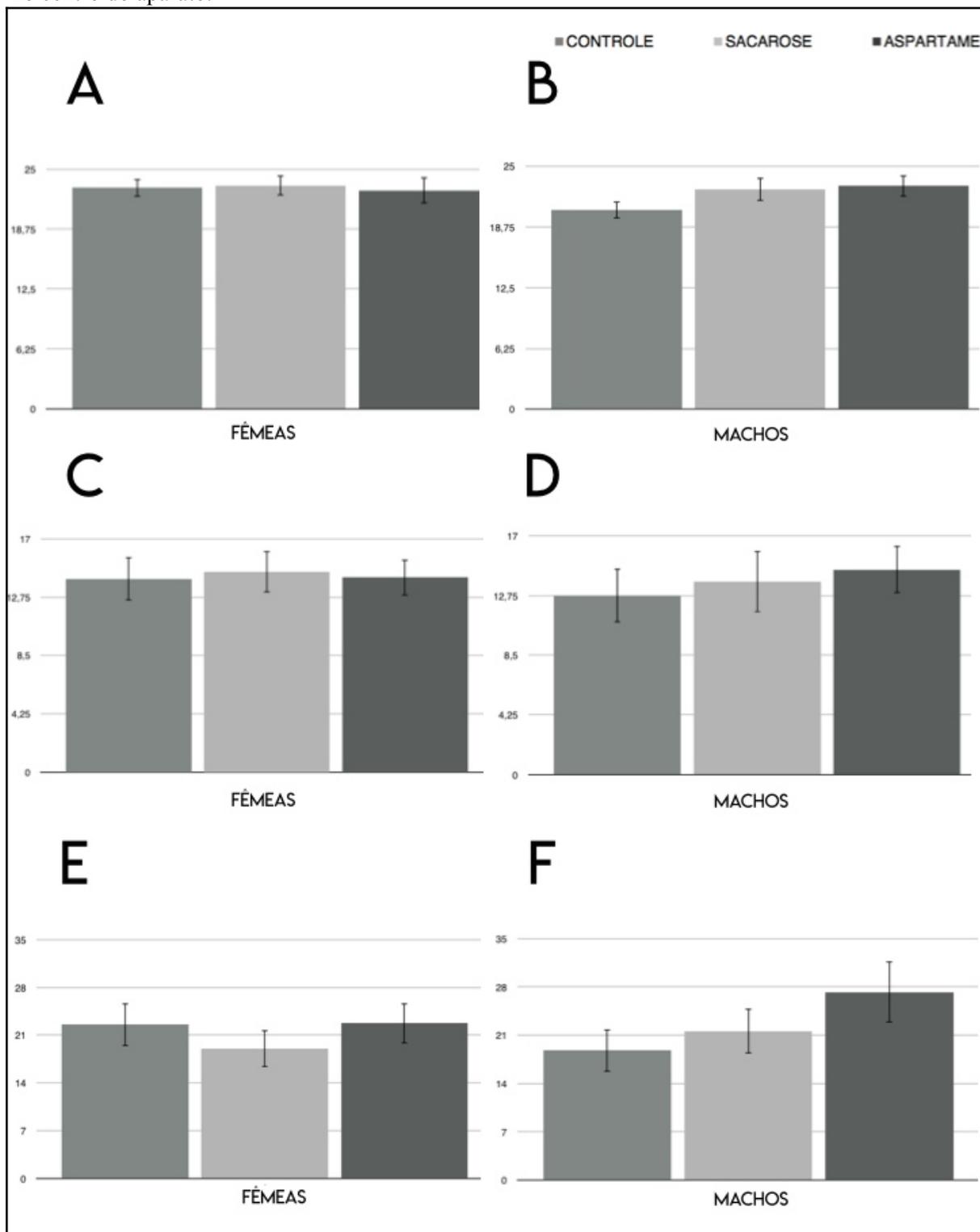
Na tarefa comportamental de reconhecimento de objetos foram analisados o tempo de exploração nos objetos no treino (dois cubos) e o tempo de exploração do objeto novo (copo)

no teste, realizado 24 horas após o treino. Como esperado, o tempo de exploração dos dois cubos no treino foi similar entre os grupos ($F(2,53)=0,952$, $p=0,392$). Observa-se um tempo de exploração similar em ambos os grupo e sexos, no teste ($F(2,53)=0,293$, $p=0,748$). Nota-se que os animais exploraram igualmente ambos os objetos (figura 5).

2.2.5 Campo Aberto

As análises de velocidade média total, a distância total percorrida (fig 6- A e B) ($F(2,50)=0,799$, $p=0,455$) e os cruzamentos pelo aparato, em conjunto com o tempo de permanência (fig 6- E e F) ($F(2,50)=0,832$, $p=0,441$), velocidade média, distância percorrida e entradas no centro do aparato (fig 1: Ce D) ($F(2,50)=0,149$, $p=0,862$), assim como na periferia do aparato, mostraram-se similares em relação aos diferentes grupos e sexos. Em ambos os sexos, o grupo sacarose permaneceu por um menor período no centro do aparato em relação ao grupo aspartame, porém, esses dados não são estatisticamente significativos (figura 6- E e F).

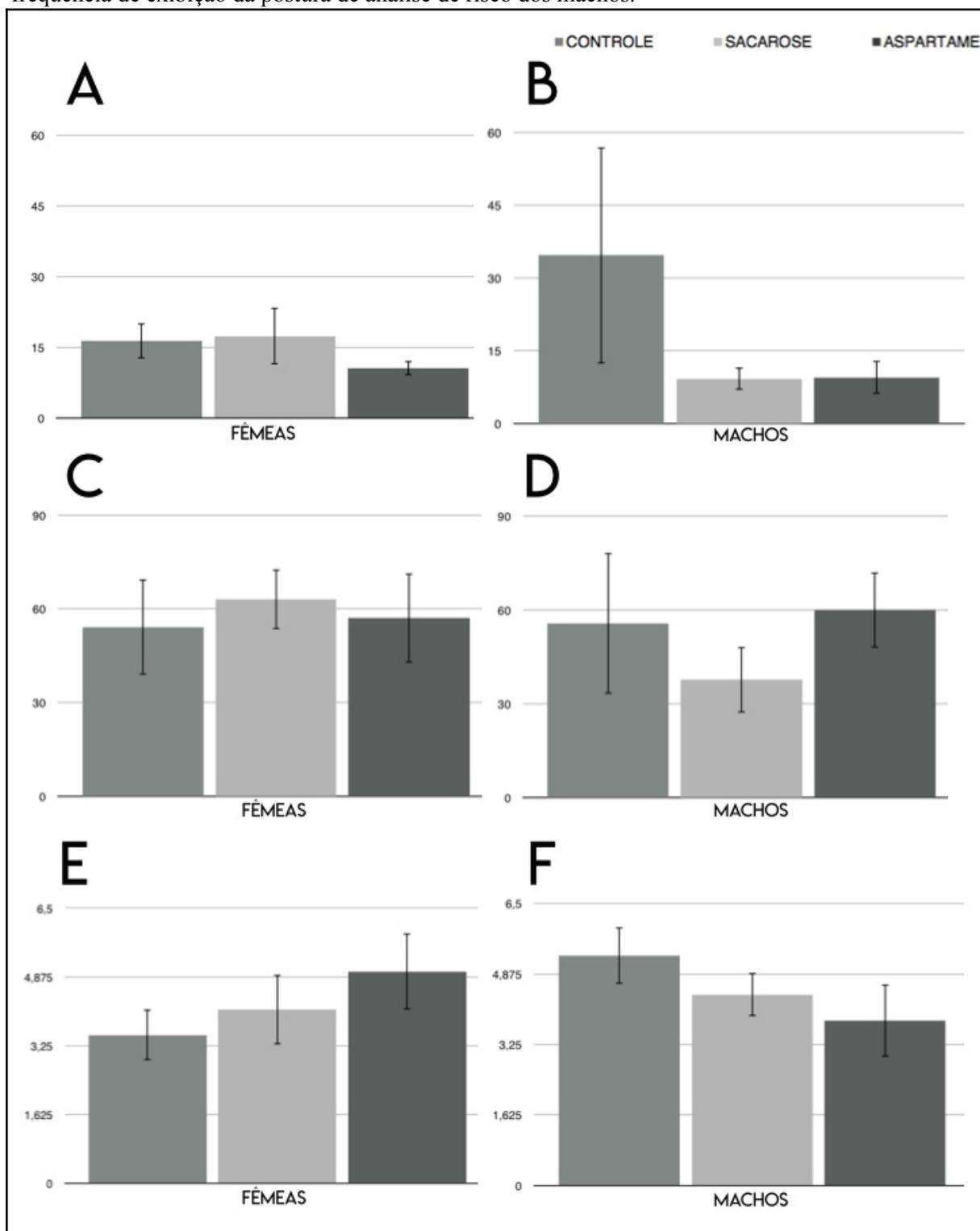
FIGURA 6- Gráficos da tarefa do campo aberto. Gráfico A: distância total percorrida, em metros, pelas fêmeas durante cinco minutos; gráfico B: distância total percorrida, em metros, pelos machos durante cinco minutos; gráfico C: número de entradas das fêmeas no centro do aparato; gráfico D: número de entradas dos machos no centro do aparato; gráfico E: tempo, em segundos, da permanência das fêmeas no centro do aparato; F: tempo, em segundos, da permanência dos machos no centro do aparato.



Fonte: Própria autora, 2018.

2.2.6 Claro-Escuro

FIGURA 7- Gráficos da tarefa do claro-escuro. Gráfico A: latência, em segundos, para fêmeas entrarem no compartimento escuro do aparato; gráfico B: latência, em segundos, para machos entrarem no compartimento escuro do aparato; gráfico C: tempo de permanência das fêmeas no compartimento claro do aparato; gráfico D: tempo de permanência dos machos no compartimento claro do aparato; gráfico E: frequência de exibição da postura de análise de risco das fêmeas; E: frequência de exibição da postura de análise de risco dos machos.



Fonte: Própria autora, 2018.

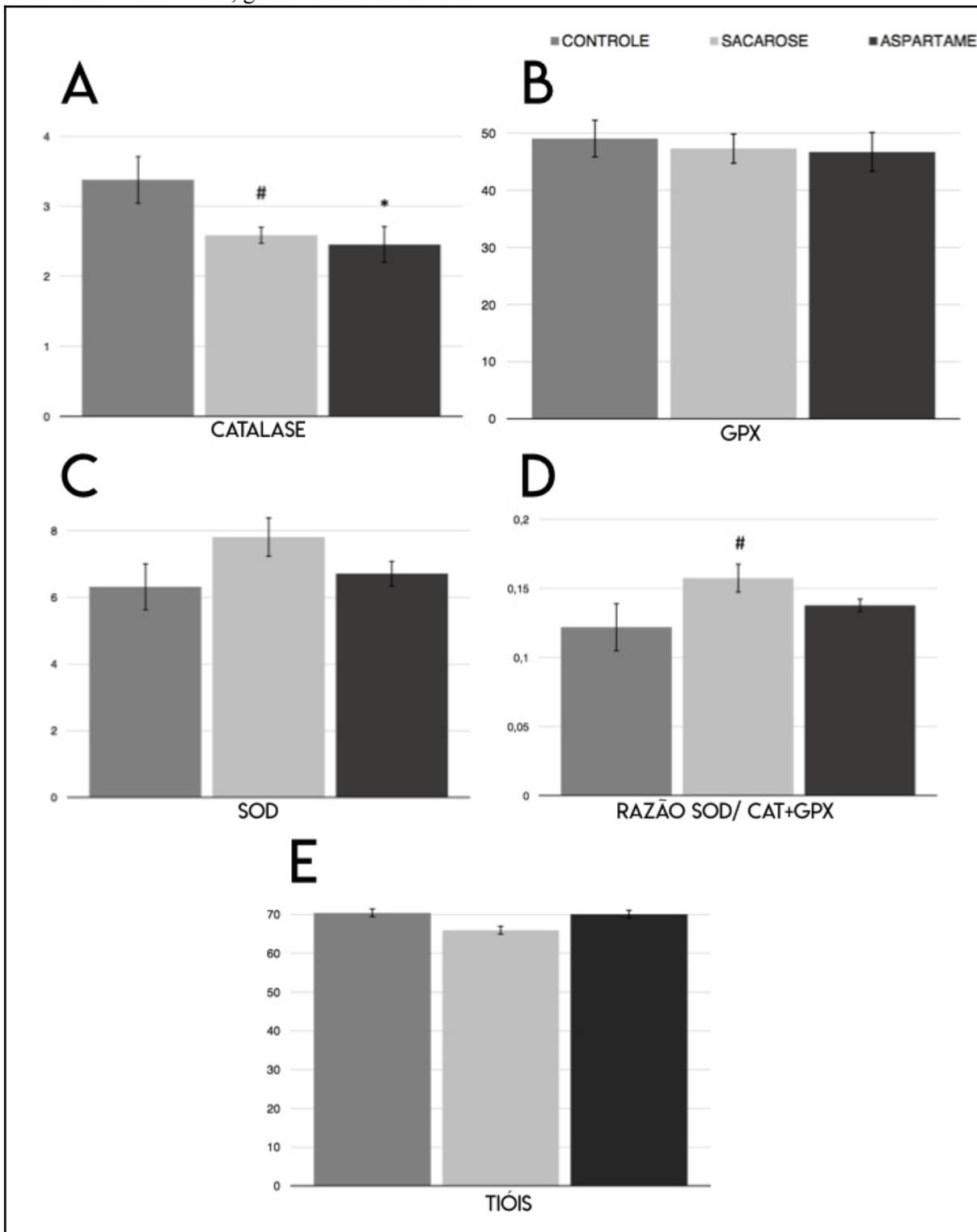
Observa-se, embora estatisticamente insignificante ($F(2,52)=0,901$, $p=0,412$), uma maior latência para entrada no compartimento escuro pelos machos do grupo controle, em relação aos grupos sacarose e aspartame, que foram semelhantes. (Figura 7- B). Em relação ao tempo que os animais permanecem no claro também não foram observadas diferenças significativas, ($F(2,52)=0,969$, $p=0,386$) apesar de um menor tempo do grupo sacarose nos machos em relação aos outros (figura x C e D). Observa-se um efeito oposto em relação aos sexos e os grupos controle e aspartame no número de 'SAP', porém, esses dados não são significativos do ponto de vista estatístico ($F(2,52)=1,990$, $p=0,147$) (figura 7- E e F).

Outras variáveis analisadas na tarefa comportamental claro-escuro também não apresentaram diferenças significativas e foram elas: a latência para explorar o compartimento claro, o número de entradas no compartimento claro, número de rearings no compartimento claro.

2.2.7 Estresse Oxidativo

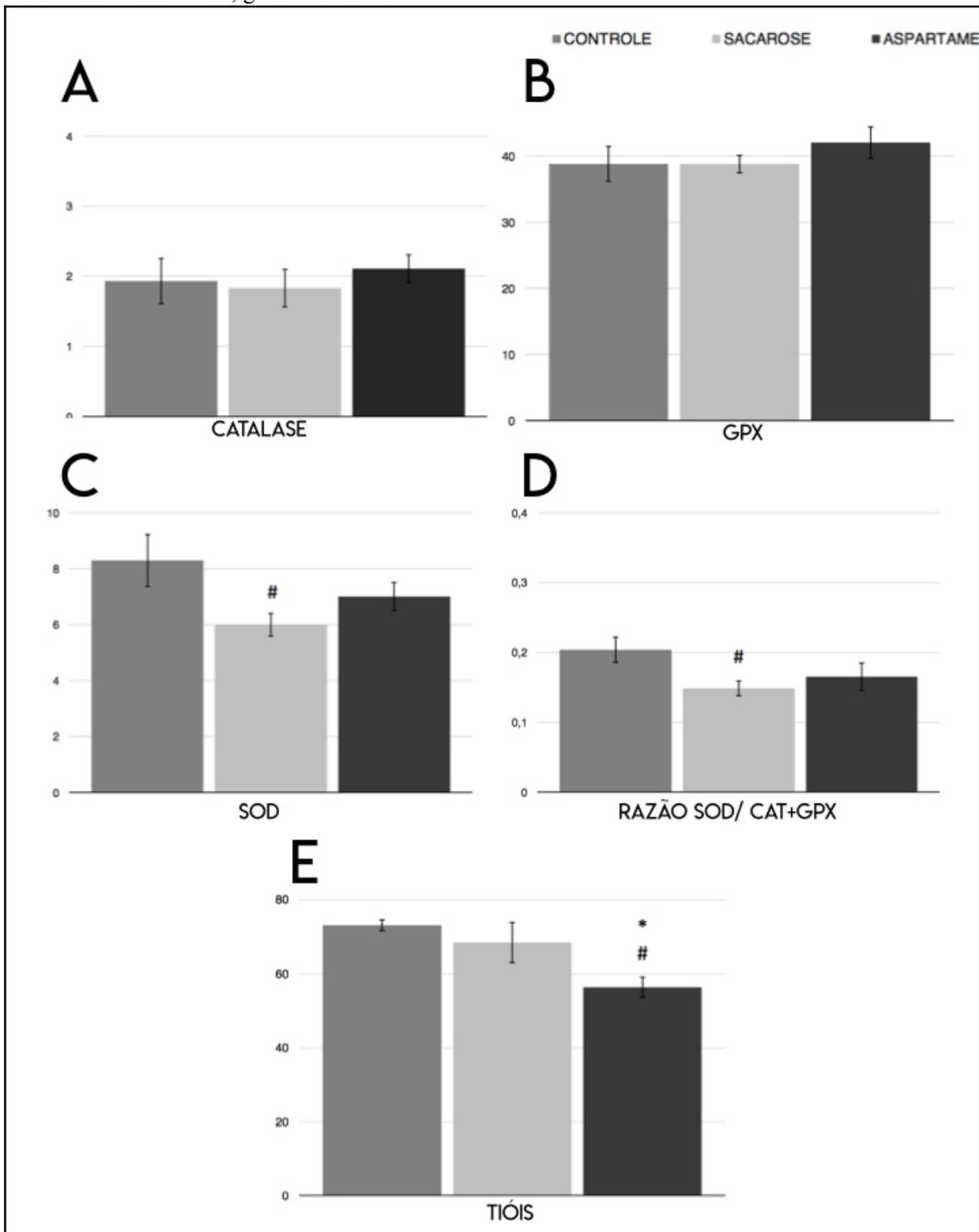
A figura 8 representa os gráficos da análise do estado redox no hipocampo dorsal das fêmeas. No gráfico A, que representa a atividade da catalase, observa-se uma diminuição significativa da atividade da enzima no grupo aspartame em relação ao grupo controle ($p=0,042$) e uma tendência a diminuição da enzima no grupo sacarose em relação ao grupo controle ($p=0,098$). A razão SOD/ CAT+GPx está representada pelo gráfico D e exibiu uma tendência a um aumento da razão no grupo sacarose em relação ao grupo controle ($p=0,085$).

Figura 8- Gráficos de parâmetros do estresse oxidativo do hipocampo dorsal das fêmeas. Gráfico A: atividade da catalase; gráfico B: atividade da GPx; gráfico C: atividade da SOD; gráfico D: razão entre SOD/ CAT+ GPx; gráfico E: níveis de tióis.



Fonte: Própria autora, 2018.

Figura 9- Gráficos de parâmetros do estresse oxidativo do hipocampo ventral das fêmeas. Gráfico A: atividade da catalase; gráfico B: atividade da GPx; gráfico C: atividade da SOD; gráfico D: razão entre SOD/ CAT+ GPx; gráfico E: níveis de tióis.



Fonte: Própria autora, 2018.

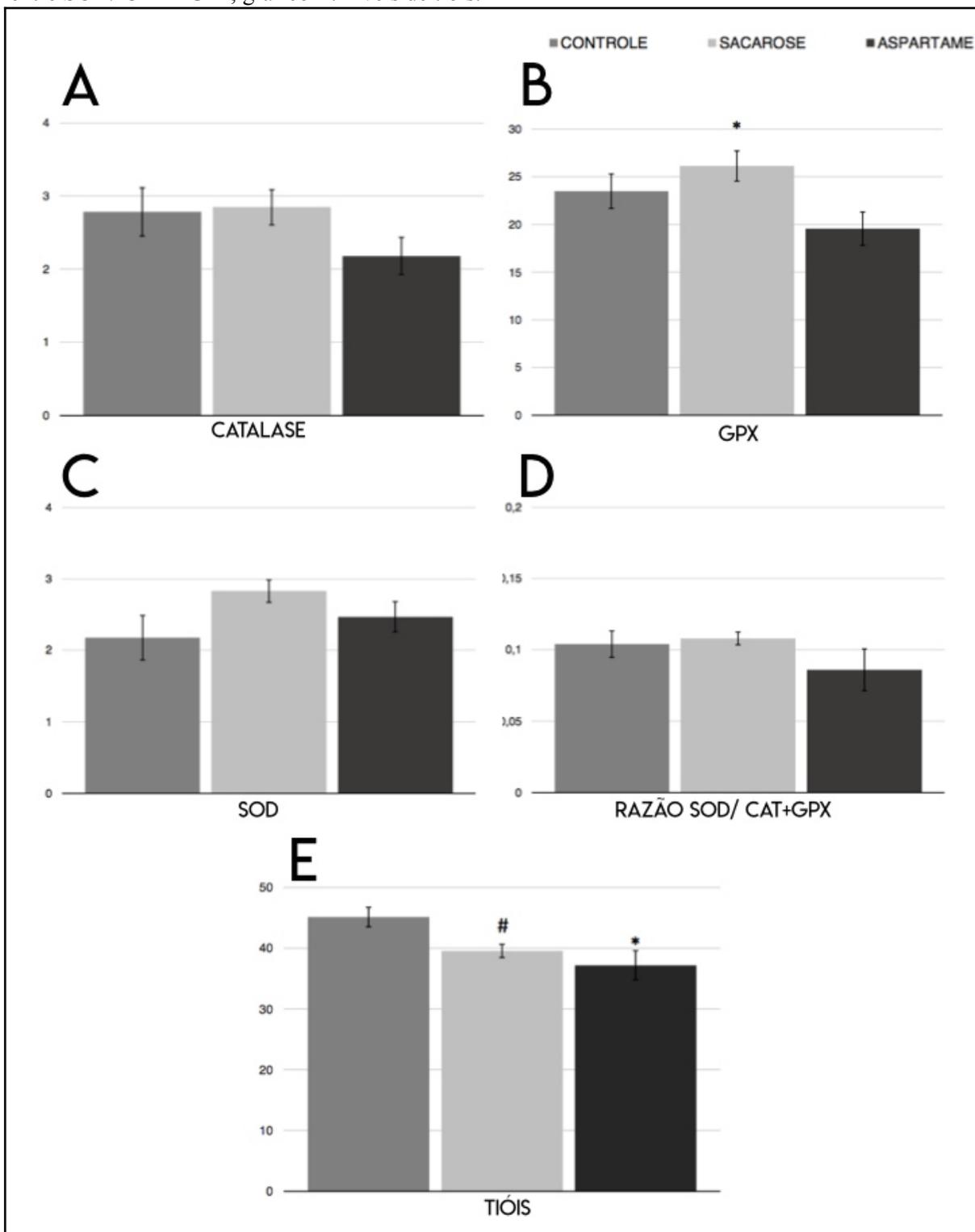
A figura 9 representa os gráficos da análise do estresse oxidativo no hipocampo ventral das fêmeas. Observa-se, no gráfico C, uma forte tendência a diminuição na atividade

da SOD no grupo sacarose em relação ao grupo controle ($p=0,056$). Também há uma tendência a diminuição da razão SOD/ CAT+GPx, observada no gráfico D, do grupo sacarose em relação ao grupo controle ($p=0,088$). O gráfico E representa os níveis de tióis, que estão diminuídos no grupo aspartame em relação ao grupo controle ($F(2,19)=6,218$, $p=0,008$) e uma forte tendência a diminuição dos níveis de tióis do grupo aspartame em relação ao grupo sacarose ($p=0,061$).

A figura 10 representa os gráficos da análise do estresse oxidativo no hipocampo dorsal dos machos. Houve um aumento significativo, representado no gráfico B, da atividade enzimática da GPx no grupo sacarose, relação ao grupo controle ($p=0,042$). Observam-se, também, alterações nos nível de tióis, ilustradas no gráfico E. Seus níveis diminuíram significativamente no grupo aspartame em relação ao grupo controle ($p=0,042$) e percebe-se uma tendência a diminuição dos níveis no grupo sacarose em relação ao grupo controle ($p=0,07$).

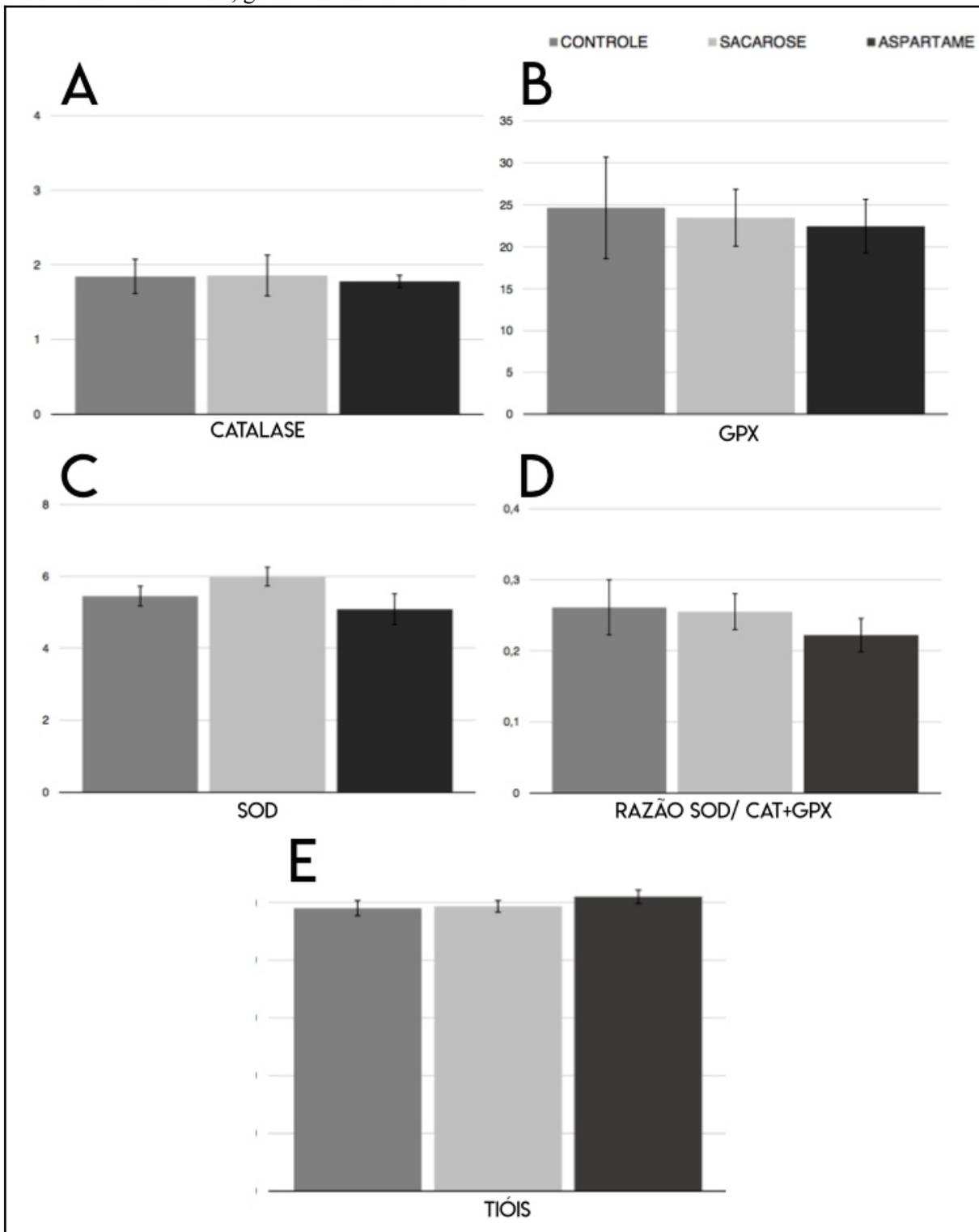
A figura 11 representa os gráficos da análise do estresse oxidativo no hipocampo ventral dos machos. Não houve alterações estatisticamente significativas.

Figura 10- Gráficos de parâmetros do estresse oxidativo do hipocampo dorsal dos machos. Gráfico A: atividade da catalase; gráfico B: atividade da GPx; gráfico C: atividade da SOD; gráfico D: razão entre SOD/ CAT+ GPx; gráfico E: níveis de tióis.



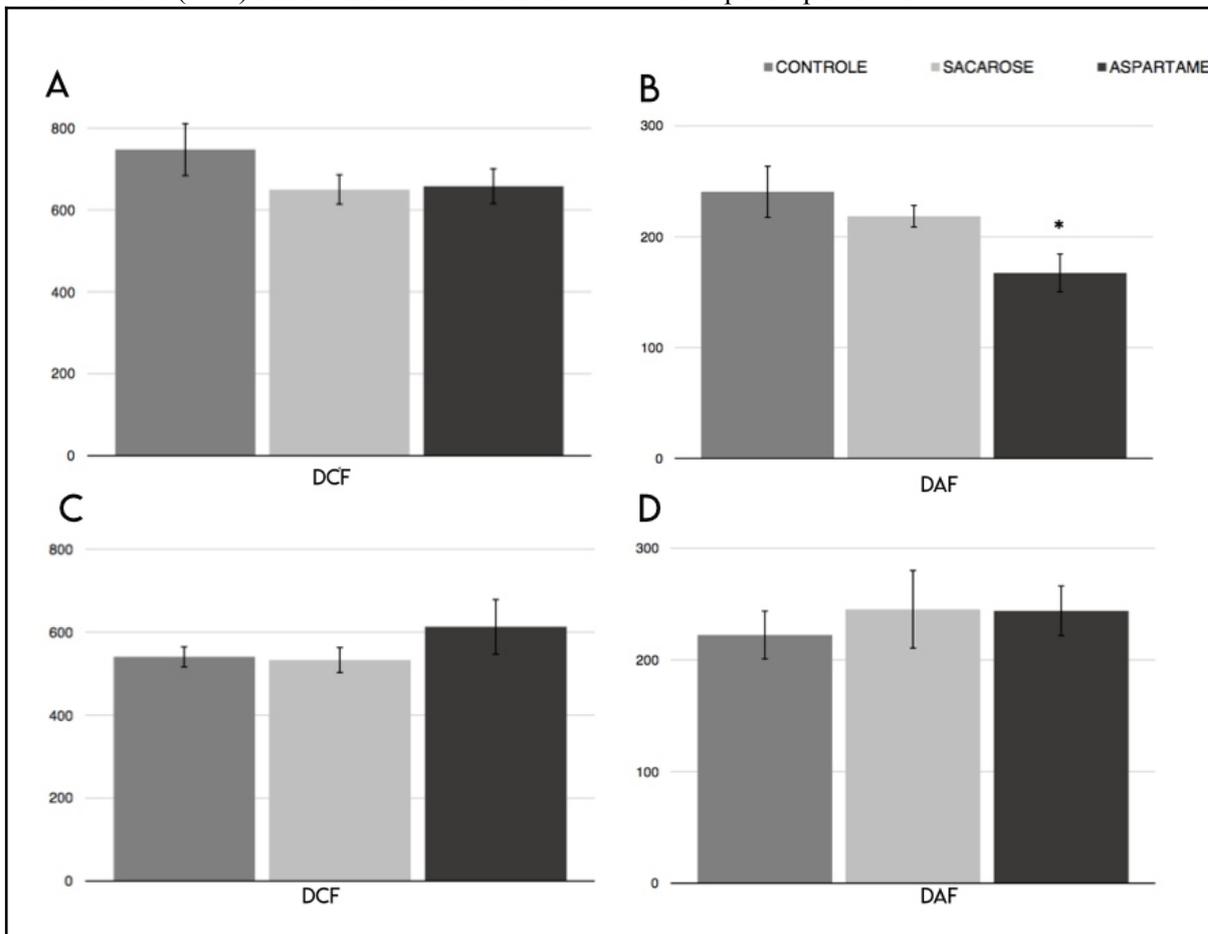
Fonte: Própria autora, 2018.

Figura 11- Gráficos de parâmetros do estresse oxidativo do hipocampo ventral dos machos. Gráfico A: atividade da catalase; gráfico B: atividade da GPx; gráfico C: atividade da SOD; gráfico D: razão entre SOD/ CAT+ GPx; gráfico E: níveis de tióis.



Fonte: Própria autora, 2018.

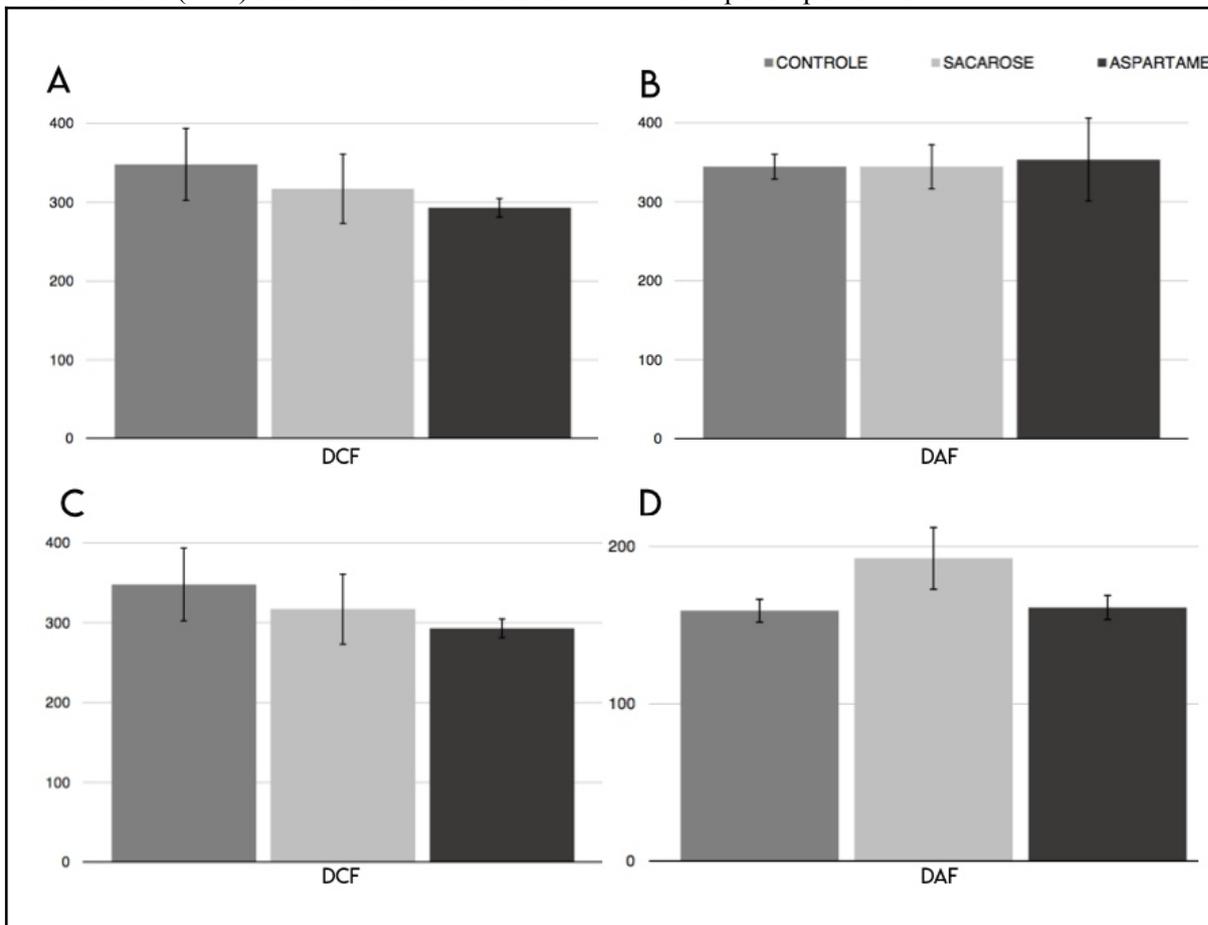
Figura 12- Gráficos da técnica de citometria de fluxo no hipocampo dorsal e ventral das fêmeas. Gráfico A: Mediana da intensidade de fluorescência (MFI) das amostras incubadas com DCF no hipocampo dorsal; gráfico B: Mediana da intensidade de fluorescência (MFI) das amostras incubadas com DAF no hipocampo dorsal; Gráfico C: Mediana da intensidade de fluorescência (MFI) das amostras incubadas com DCF no hipocampo ventral; gráfico D: Mediana da intensidade de fluorescência (MFI) das amostras incubadas com DAF no hipocampo ventral.



Fonte: Própria autora, 2018.

Observa-se uma diferença significativa do grupo aspartame em relação aos níveis de óxido nítrico ($F(2,19)=4,762$, $p=0,021$), se comparados com o grupo controle ($p=0,02$). Não foram encontradas outras diferenças significativas nas fêmeas (figura 12).

Figura 13- Gráficos da técnica de citometria de fluxo no hipocampo dorsal e ventral dos machos. Gráfico A: Mediana da intensidade de fluorescência (MFI) das amostras incubadas com DCF no hipocampo dorsal; gráfico B: Mediana da intensidade de fluorescência (MFI) das amostras incubadas com DAF no hipocampo dorsal; Gráfico C: Mediana da intensidade de fluorescência (MFI) das amostras incubadas com DCF no hipocampo ventral; gráfico D: Mediana da intensidade de fluorescência (MFI) das amostras incubadas com DAF no hipocampo ventral.



Fonte: Própria autora, 2018.

Não foram encontradas diferenças significativas com a técnica de citometria de fluxo no hipocampo dos machos (figura 13).

2.3 Discussão

O aspartame é um adoçante artificial amplamente usado em bebidas e alimentos para humanos e alguns petiscos para caninos. Sua absorção no intestino é seguida por sua metabolização em fenilalanina, ácido aspártico e metanol [RYCERZ; JAWORSKA-ADAMU, 2013]. O presente estudo teve como objetivo usar um modelo animal (ratos) para relacionar a ingestão crônica de aspartame (que também é fornecido a cães de estimação através da

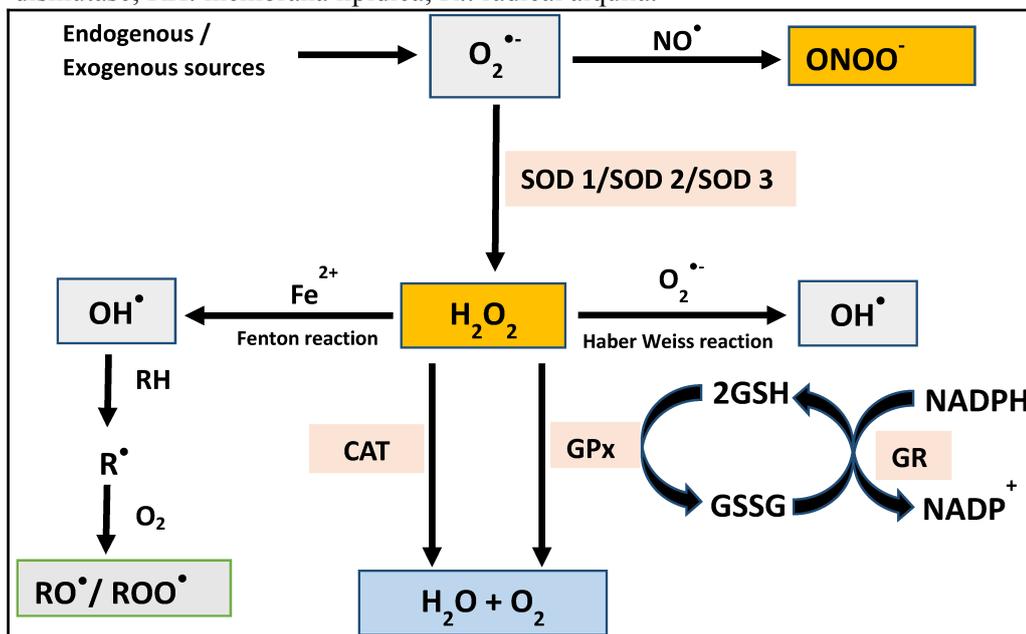
ingestão de alimentos destinados a humanos e também próprios para espécie que contém o adoçante) com o surgimento de alterações cognitivas e comportamento do tipo ansioso. Neste modelo foram realizados testes após a ingestão crônica diária de aspartame, para avaliar memória de curta e longa duração, locomoção e ansiedade, além da análise de espécies reativas de oxigênio e possível estresse oxidativo no hipocampo dorsal e ventral. O hipocampo é uma estrutura cerebral reconhecida por atuar na aprendizagem e memória espacial, além de estar relacionado com comportamento e emoções. Contudo, experimentos realizados concluíram que essas funções do hipocampo estão desigualmente distribuídas entre eixo ventral e dorsal, sendo o primeiro relacionado com comportamentos relacionados à ansiedade, enquanto o hipocampo dorsal apresenta papel preferencial na aprendizagem espacial e na memória (MOSER; MOSER; ANDERSEN, 1993; FANSELOW; DONG, 2010; JUNG; WIENER; MCNAUGHTON, 1994; GAGE; THOMPSON, 1980; ONAOLAPO; ONAOLAPO; NWOHA, 2017).

Dentre os resultados, os mais significativos foram observados na avaliação do estresse oxidativo em que o uso de aspartame induziu diminuição na atividade da glutathione peroxidase, uma enzima anti oxidante e no conteúdo de tióis totais sugerindo maior vulnerabilidade a agressões por agentes oxidantes. Também foram observados efeitos sexo- e estrutura-específicos. Abaixo serão discutidos os resultados.

2.3.1 Estresse Oxidativo

No hipocampo dorsal, observamos efeitos sexo-específicos da administração de bebidas adoçadas, pois tanto o aspartame quanto a sacarose apresentaram efeitos diminuindo a atividade de certas enzimas antioxidantes. Nas fêmeas, houve diminuição da catalase com aumento da razão SOD/cat+gpx. Esse aumento pode sugerir um desequilíbrio com maior produção de peróxidos (pela atividade da SOD) (FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011; ASHOK et al., 2015), que deveriam ser destoxificados pelas atividades da CAT e da GPx, cujo conjunto está diminuído. Assim, é possível que peróxidos se acumulem e, pela reação de Fenton e de Harber-Weis, tenhamos aumento da produção de radical hidroxila, como mostrado na figura 14.

Figura 14- Fontes e geração de diferentes espécies reativas de oxigênio. CAT: catalase; GPx: glutathiona peroxidase; GR: glutathiona redutase; SOD: superóxido dismutase; RH: membrana lipídica; R.: radical alquila.



Fonte:OLAWALE, 2015.

Por outro lado, no hipocampo dorsal de machos, também observamos efeitos que podem aumentar vulnerabilidade a eventos oxidativos, com redução da atividade da GPx (BLUM; FRIDOVICH, 1985) no grupo aspartame em relação ao grupo que recebeu sacarose. Interessante é que os tióis totais nesses grupos (aspartame e sacarose) estão diminuídos em relação ao controle. Os tióis (-SH) diminuem quando são oxidados produzindo grupos dissulfeto (-S-S-). Isso pode modificar estruturalmente proteínas, levando a alteração em sua atividade, e também pode diminuir a atividade antioxidante da glutathiona, um tripeptídeo que contém um resíduo de cisterna que é utilizado pela glutathiona peroxidase para redução de peróxidos. Assim, a diminuição dos tióis totais pode ser interpretada como um aumento do status oxidativo da célula (GROITL; JAKOB, 2014).

A diminuição nos níveis de óxido nítrico visualizado no hipocampo ventral das fêmeas sugere uma maior vulnerabilidade da estrutura, uma vez que o óxido nítrico está relacionado a regulação de vários processos comportamentais, cognitivos e emocionais, de transmissão e plasticidade sináptica, por modular os níveis de diversos neurotransmissores no sistema nervoso central, como serotonina e dopamina (PALUMBO et al., 2007; WEGENER, 2003; DIAS, 2006).

Assim, embora via mecanismos bioquímicos distintos, tanto machos quanto fêmeas apresentaram possível maior susceptibilidade a danos oxidativos no hipocampo dorsal após tratamento com aspartame.

No hipocampo ventral, por sua vez, apenas encontramos efeitos nas fêmeas. Houve redução da atividade da SOD e da razão SOD/cat no grupo tratado com sacarose. Por sua vez, no grupo aspartame, houve redução dos tióis totais. Esses dados sugerem uma maior susceptibilidade a danos oxidativos no hipocampo ventral de fêmeas que recebem essas bebidas adoçadas, quando comparadas aos machos.

O hipocampo não é uma estrutura homogênea em sua formação (GAGE; THOMPSON, 1980). Nadel et al. (1968), descreveu que lesões em diferentes regiões do hipocampo podem produzir efeitos comportamentais discrepantes. Estudos mostram que o hipocampo dorsal parece estar mais relacionado com funções cognitivas, como memória e aprendizagem espacial (BANNERMAN, 2004; FANSELOW, 2010). Moser et al. (1993) constataram que lesões no hipocampo dorsal promoveram um prejuízo no aprendizado na tarefa do labirinto aquático de Morris e lesões da mesma gravidade no hipocampo central não levaram a prejuízos na tarefa. Uma explicação pode ser pela expressão gênica no hipocampo dorsal se correlacionar com as regiões corticais envolvidas no processamento da informação, enquanto os genes expressos no hipocampo ventral se correlacionam com as regiões envolvidas na emoção e no estresse (amígdala e hipotálamo) (FANSELOW, 2010). O hipocampo ventral parece estar relacionado a comportamentos do tipo ansioso, emoções, medo e estresse (BANNERMAN, 2004; FANSELOW, 2010). Sua projeção para o córtex pré-frontal pode estar relacionado a influências no sistema dopaminérgico (BANNERMAN, 2004). Além disso, Gage et al. (1980) sugeriram, após um experimento, que um maior número de terminais nervosos que acumulam noradrenalina e serotonina está presente no hipocampo ventral.

Os diferentes resultados nas estruturas dorsal e ventral sugerem que os possíveis prejuízos causados pelos tratamentos utilizados, com aumento do status oxidativo da estrutura e sua vulnerabilidade podem ser heterogêneos em relação a sua localização.

2.3.2 Labirinto em Y

A tarefa do labirinto em Y é amplamente usada em testes de memória espacial curta pelo rápido acesso a memória do rato. Essa vantagem pode ser importante em casos de lesões não permanentes ao hipocampo, como casos de estresse crônico. Outro fator positivo da tarefa é o fato de que o aparato permite que o rato explore novos ‘ambientes’. Portanto, um rato que não recebe recompensa ou estímulos aversivos, tem uma grande tendência, devido ao seu instinto, a explorar novas áreas. Não foram observadas mudanças significativas em relação a exploração do novo braço no teste, sugerindo que o consumo crônico de sacarose ou aspartame não causaram prejuízos na memória espacial de curta duração. Entretanto, houve um efeito sexo-específico, evidenciando um maior número de entradas das fêmeas no braço novo, o que sugere uma maior atividade exploratória em relação aos machos. Além disso, foi observada uma tendência a um menor índice das fêmeas do grupo aspartame, em relação ao tempo total que os animais permaneceram no braço novo no período do teste, se comparado aos machos e ao grupo controle e sacarose das fêmeas, o que sugeriria prejuízo na memória desses animais.

Contudo, o tempo de exploração do novo braço nos grupos controle foi similar ao tempo de exploração dos outros braços no teste, o que leva a um questionamento sobre a aplicação da tarefa no período da adolescência, pois, nesse grupo, que não recebe nenhum estímulo estressor para perda de memória, os índices de exploração deviam ser maiores, pela natureza instintiva do rato de explorar ambientes desconhecidos (CRAWLEY; GOODWINN, 1980).

Um estudo realizado com ratos adultos constatou uma piora da memória espacial de curta duração nos grupos tratados cronicamente com aspartame através do teste de Morris Water-maze (ABDEL-SALAM et al., 2012). Por outro lado, Tilson et al. (1991) realizaram a mesma tarefa e afirmam que ratos tratados cronicamente com aspartame não tiveram prejuízo na memória se comparados ao grupo controle. Esta divergência pode ser devido ao fato de que na primeira pesquisa foram utilizados camundongos e a dose era 5 vezes maior do que na pesquisa de Tilson, feita com ratos.

2.3.3 Reconhecimento de Objetos

A tarefa de reconhecimento de objetos é amplamente usada em testes de memória de curto e longo prazo, apresentando mais de um formato, os quais relacionam-se a distintas estruturas encefálicas envolvidas nos processos de memória (ANTUNES; BIALA, 2012; BROADBENT, 2010).

Não houve diferença significativa entre os grupos na exploração do objeto novo no teste, o que sugere que os animais tratados cronicamente com aspartame ou sacarose não apresentaram prejuízos na memória de reconhecimento a longo prazo. Entretanto, em ambos os grupos, incluindo o controle, o tempo de exploração do objeto novo é similar ao objeto familiar, indicando que os animais não aprenderam adequadamente a tarefa. Esse indício leva à hipótese de que os animais nessa idade, assim como no labirinto em Y, não estão aptos a realização dessa tarefa. Ambas as tarefas foram padronizadas, como relatado na literatura, para animais adultos (CONRAD et al., 1996; ANTUNES; BIALA, 2012) e os animais mais jovens podem apresentar comportamento mais ativo, o que poderia prejudicar seu desempenho em tarefas que envolvem grande nível de atenção.

2.3.4 Exposição ao Campo Aberto

O campo aberto é um modelo popular para a visualização do comportamento do tipo ansioso em roedores (PRUT; BELZUNG, 2003). O grupo aspartame (machos e fêmeas) teve uma tendência a permanecer mais tempo no centro do aparato, em relação ao grupo sacarose nas fêmeas e em relação ao grupo sacarose e ao grupo controle nos machos, sugerindo um efeito ansiolítico, visto que ratos tendem a caminhar perto das paredes, evitando o centro do ambiente (KULESSKAYA; VOIKAR, 2004). Contudo, para comprovar essa tendência, seria necessário aumentar o n de animais.

2.3.5. Transições Claro-Escuro

A tarefa do claro-escuro é baseada no modelo de aversão dos ratos a ambientes claros, por serem animais com hábito de exploração noturna (CRAWLEY; GOODWIN, 1980).

Animais com alto nível de ansiedade tendem a evitar o compartimento claro e passar maior tempo no compartimento escuro do aparato (HEREDIA et al., 2014). Contudo, os resultados da atual pesquisa não apresentaram significância na investigação do comportamento do tipo ansioso através da tarefa.

3. CONCLUSÃO

Através do questionário aplicado foi possível observar um frequente fornecimento de alimentos contendo açúcar e aspartame para cães e que comportamentos do tipo ansioso são comuns entre os animais. Os resultados da pesquisa experimental indicam um possível desequilíbrio do status oxidativo do hipocampo consequente da ingestão crônica de aspartame na fase da infância e adolescência de ratos. As alterações vistas no estresse oxidativo foram sexo-específicas, sugerindo uma maior vulnerabilidade a eventos oxidativos em fêmeas. Além disso, houve um efeito estrutura-específico, onde o hipocampo dorsal pareceu mais atingido, o que indica prejuízos na aprendizagem espacial, de tarefas cognitivas e memória. Tarefas comportamentais para avaliação cognitiva devem ser padronizadas para a aplicação na adolescência, pelo mau desempenho do grupo controle nos testes do labirinto em Y e reconhecimento de objetos. O aspartame não pareceu gerar efeitos significativos em relação a ansiedade, porém pode-se observar uma tendência a um efeito ansiolítico no grupo. Para comprovar a tendência, seria necessário o aumento do n.

REFÊRENCIAS

- ABDEL-SALAM, O. M. et al. Studies on the effects of aspartame on memory and oxidative stress in brain of mice. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 16, n. 15, p. 2092–2101, 2012.
- AEBI, H. Catalase in vitro. In: **Oxygen Radicals in Biological Systems**. Methods in Enzymology[s.l.] : Academic Press, 1984. v. 105p. 121–126.
- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, n. 2–3, p. 141–145, 2001.
- ANTON, S. D. et al. Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. **Appetite**, v. 55, n. 1, p. 37–43, 2010.
- ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive Processing**, v. 13, n. 2, p. 93–110, 2012.
- APTEKMANN, K. P. et al. Manejo nutricional de cães e gatos domiciliados no estado do Espírito Santo - Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 455–459, 2013.
- ASHOK, I. et al. Neurobehavioral changes and activation of neurodegenerative apoptosis on long-term consumption of aspartame in the rat brain. **Journal of Nutrition and Intermediary Metabolism**, v. 2, n. 3–4, p. 76–85, 2015.
- ASHOK, I.; SHEELADEVI, R.; WANKHAR, D. Effect of long-term aspartame (artificial sweetener) on anxiety, locomotor activity and emotionality behavior in Wistar Albino rats. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 4, n. 1, p. 39–43, 2014.
- BANNERMAN, D. M. et al. Regional dissociations within the hippocampus - Memory and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 273–283, 2004.
- BERSCHNEIDER, H. M. Alternative diets. **Clinical techniques in small animal practice**, v. 17, n. 1, p. 1–5, 2002.
- BLUM, J.; FRIDOVICH, I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 240, n. 2, p. 500–508, 1985.
- BRAY, G. A.; NIELSEN, S. J.; POPKIN, B. M. Role in the Epidemic of Obesity 1 , 2. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79:537–43, 2004.
- BROADBENT, N. J. et al. Object recognition memory and the rodent hippocampus. **Learning & Memory**, v. 17, n. 1, p. 5–11, 2010.
- BURGERT, S. L. et al. Metabolism of aspartame and its l-phenylalanine methyl ester decomposition product by the porcine gut. **Metabolism**, v. 40, n. 6, p. 612–618, 1991.
- CABALLERO, B.; FINER, N.; WURTMAN, R. J. Plasma Amino Acids and Insulin Levels in Obesity: Response to Carbohydrate Intake and Tryptophan Supplements. **Metabolism**, v. 37, n. 7, p. 672–676, 1988.

CONNOLLY, K. M.; HEINZE, C. R.; FREEMAN, L. M. Feeding practices of dog breeders in the United States and Canada. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 245, n. 6, p. 669–676, 2014.

CONRAD, C. D. et al. Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y Maze , and this effect is blocked by Tianeptine pretreatment. **American Psychological Association**, v. 110, n. 6, p. 1321–1334, 1996.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. Preliminary Report of a Simple Animal Behavior Model for the Anxiolytic Effects of Benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 13, p. 167–170, 1980.

DE FORNEL-THIBAUD, P. et al. Unusual Case of Osteopenia Associated With Nutritional Calcium and Vitamin D Deficiency in an Adult Dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 43, n. 1, p. 52–60, 2007.

DE KONING, L. et al. Sugar-sweetened and artificially sweetened beverage consumption and risk of type 2 diabetes in men. **Am J Clin Nutr**, v. 93, n. 3, p. 1321–1327, 2011.

DELMAS-BEAUVIEUX, M. C. et al. Relationship between red blood cell antioxidant enzymatic system status and lipoperoxidation during the acute phase of malaria. **Clinical Biochemistry**, v. 28, n. 2, p. 163–169, 1995.

DEUTSCH, R. Conditioned hypoglycemia: a mechanism for saccharin induced sensitivity to insulin in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 86, n. 2, p. 350–358, 1974.

DIAS, A. C. R.; DA SILVA, L. G.; COLOMBARI, E. O óxido nítrico (NO) no controle neural da pressão arterial: Modulação da transmissão glutamatérgica no NTS. **Medicina**, v. 39, n. 1, p. 51–64, 2006.

EKONG, M. Aspartame : Sweet Or Bitter. **The Internet Journal of Health**, v. 9, n. 1, p. 5, 2008.

ENNACEUR, A. Physiology & Behavior Tests of unconditioned anxiety — Pitfalls and disappointments. **Physiology & Behavior**, v. 135, p. 55–71, 2014.

FAGHERAZZI, G. et al. Consumption of artificially and sugar-sweetened beverages and incident type 2 diabetes in the Etude Epiémiologique auprès des femmes de la Mutuelle Générale de l'Education Nationale-European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort 1 – 4. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 97, n. 1, p. 517–523, 2013.

FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7–19, 2010.

FOWLER, S. P. et al. Fueling the obesity epidemic? Artificially sweetened beverage use and long-term weight gain. **Obesity**, v. 16, n. 8, p. 1894–1900, 2008.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 6, p. 1583–1606, 2011.

- FUNG, T. T. et al. Sweetened beverage consumption and risk of coronary heart disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, p. 1037–1042, 2009.
- GAGE, F. H.; THOMPSON, R. G. Differential distribution of norepinephrine and serotonin along the dorsal-ventral axis of the hippocampal formation. **Brain Research Bulletin**, v. 5, n. 6, p. 771–773, 1980.
- GIEDD, J. N.; KESHAVAN, M.; PAUS, T. Why do many Psychiatric disorders emerge during adolescence? **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 12, p. 947–957, 2008.
- GRANDJEAN, D.; BUTTERWICK, R. **Livro de bolso do WALTHAM® sobre nutrição e cuidados de filhotes de cães**. [s.l: s.n.], 2012.
- GROITL, B.; JAKOB, U. Thiol-based redox switches. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 8, p. 1335–1343, 2014.
- HAMILTON, N. B.; ATTWELL, D. Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 4, p. 227–238, 2010.
- HEREDIA, L. et al. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods Assessing anxiety in C57BL / 6J mice : A pharmacological characterization of the open- field and light / dark tests. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 69, n. 2, p. 108–114, 2014.
- HODAN FARAH WELLS, J. C. B. Dietary Assessment of Major Trends in U.S. Food Consumption, 1970-2005. n. **Economic Information Bulletin No. (EIB-33)**, p. 27 pp, 2008.
- HUMPHRIES, P.; PRETORIUS, E.; NAUDÉ, H. Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 4, p. 451–462, 2008.
- JOHNSON, R. K. et al. Dietary sugars intake and cardiovascular health a scientific statement from the american heart association. **Circulation**, v. 120, n. 11, p. 1011–1020, 2009.
- JUNG, M. W.; WIENER, S. I.; MCNAUGHTON, B. L. Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. **The Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 12, p. 7347–7356, 1994.
- KENEDY, E. Análise de corpus, a intuição do lingüista e metodologia experimental na pesquisa sobre as orações relativas do PB e do PE. **Revista Linguística**, v. 5, n. 1, 2009.
- KOJIMA, H. et al. Visualization of oxygen-concentration-dependent production of nitric oxide in rat hippocampal slices during aglycemia. **Journal of Neurochemistry**, v. 76, n. 5, p. 1404–1410, 2001.
- KULESSKAYA, N.; VOIKAR, V. Physiology & Behavior Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light – dark box and open- field arena : Role of equipment and procedure. **Physiology & Behavior**, v. 133, p. 30–38, 2014.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. **Chemical Research in Toxicology**, v. 5, n. 2, p. 227–231, 1992.

LOWRY, O. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MENNELLA, J. A.; CASTOR, S. M. Sensitive period in flavor learning: Effects of duration of exposure to formula flavors on food likes during infancy. **Clinical Nutrition**, v. 31, n. 6, p. 1022–1025, 2012.

MOSER, E. I.; MOSER, M. B.; ANDERSEN, P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. **The Journal of neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 3916–3925, 1993.

MOSER, E. I.; MOSER, M. B.; ANDERSEN, P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. **The Journal of neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 3916–3925, 1993.

NADEL, L. Dorsal and Ventral Hippocampal Lesions and Behavior'. **Physiology and Behavior**, v. 3, p. 891–900, 1968.

O'KEEFE, J.; NADEL, L. The Hippocampus as a Cognitive Map. **Oxford: Clarendon Press**, 1978.

ONAO LAPO, A. Y.; ONAO LAPO, O. J.; NWOHA, P. U. Aspartame and the hippocampus: Revealing a bi-directional, dose/time-dependent behavioural and morphological shift in mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 139, p. 76–88, 2017.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70, n. 1, p. 158–169, 2018.

PALUMBO, M. L. et al. Loss of hippocampal neuronal nitric oxide synthase contributes to the stress-related deficit in learning and memory. **Journal of Neurochemistry**, v. 102, n. 1, p. 261–274, 2007.

PANIZ et al. Neuroprotective effects of guanosine administration on behavioral , brain activity , neurochemical and redox parameters in a rat model of chronic hepatic encephalopathy. **Metabolic Brain Disorders**, p. 645–654, 2014.

PEPINO, M. Y. Metabolic effects of non-nutritive sweeteners. **Physiology and Behavior**, v. 152, p. 450–455, 2015.

PFEFFER, M.; ZIESENITZ, S. C.; SIEBERT, G. Acesulfame K, cyclamate and saccharin inhibit the anaerobic fermentation of glucose by intestinal bacteria. **Zeitschrift für Ernährungswissenschaft**, v. 24, n. 4, p. 231–235, 1985.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 2003.

- RAFATI, A. et al. Vitamin E can improve behavioral tests impairment, cell loss, and dendrite changes in rats' medial prefrontal cortex induced by acceptable daily dose of aspartame. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 1, p. 46–55, 2018.
- RICE, D.; BARONE, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. SUPPL. 3, p. 511–533, 2000.
- ROMANO, M. et al. Plasma and brain kinetics of large neutral amino acids and of striatum monoamines in rats given aspartame. **Food and Chemical Toxicology**, v. 28, n. 5, p. 317–321, 1990.
- RYCERZ, K.; JAWORSKA-ADAMU, J. E. Effects of aspartame metabolites on astrocytes and neurons. **Folia Neuropathologica**, v. 1, n. 1, p. 10–17, 2013.
- SARAVIS, S. et al. Aspartame : Mood Effects on Learning , and. **Pediatrics**, v. 86, n. 1, p. 75–83, 1990.
- SHANKAR, P.; AHUJA, S.; SRIRAM, K. Non-nutritive sweeteners: Review and update. **Nutrition**, v. 29, n. 11–12, p. 1293–1299, 2013.
- SOARES, G. M.; PEREIRA, J. T.; PAIXÃO, R. L. Estudo exploratório da síndrome de ansiedade de separação em cães de apartamento. **Ciência Rural**, 2010.
- STEGINK, L. D. et al. Effect of repeated ingestion of aspartame-sweetened beverage on plasma amino acid, blood methanol, and blood formate concentrations in normal adults. **Metabolism**, v. 38, n. 4, p. 357–363, 1989.
- STREIFF, E. L. et al. A comparison of the nutritional adequacy of home-prepared and commercial diets for dogs. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 6, p. 1698S–1700S, 2002.
- SUEZ, J. et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. **Nature**, v. 514, n. 7521, p. 181–186, 2014.
- SWITHERS, S. E. Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 24, n. 9, p. 431–441, 2013.
- SWITHERS, S. E.; MARTIN, A. A.; DAVIDSON, T. L. High-intensity sweeteners and energy balance. **Physiology and Behavior**, v. 100, n. 1, p. 55–62, 2010.
- SWITHERS, S. E.; SAMPLE, C. H.; DAVIDSON, T. L. Adverse effects of high-intensity sweeteners on energy intake and weight control in male and obesity-prone female rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 127, n. 2, p. 262–274, 2013.
- SWITHERS, S. E.; DAVIDSON, T. L. A Role for Sweet Taste: Calorie Predictive Relations in Energy Regulation by Rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 122, n. 1, p. 161–173, 2008.
- SYLVETSKY, A. C. et al. Low-calorie sweetener consumption is increasing in the United States. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 96, n. 3, p. 640–646, 2012.
- TAKEUCHI, Y. et al. Differences in background and outcome of three behavior problems of dogs. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 70, n. 4, p. 297–308, 2001.

TILSON, H. A.; HONG, J. S.; SOBOTKA, T. J. High doses of aspartame have no effects on sensorimotor function or learning and memory in rats. **Neurotoxicol Teratol**, v. 13, n. 1, p. 27–35, 1991.

VAN BAAK, M. A.; ASTRUP, A. Consumption of sugars and body weight. **Obesity Reviews**, v. 10, n. SUPPL. 1, p. 9–23, 2009.

VILLAREAL, L. M. A. et al. Neurotropic effects of aspartame, stevia and sucralose on memory retention and on the histology of the hippocampus of the ICR mice (*Mus musculus*). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 2, p. 114–118, 2016.

WEGENER, G. et al. Local, but not systemic, administration of serotonergic antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity. **Brain Research**, v. 959, n. 1, p. 128–134, 2003.

APÊNDICE A- Questionário online sobre hábitos dos cães e seus proprietários no Brasil

Hábitos de cães e seus proprietários no Brasil

•Obrigatório

Qual a idade do seu cão? *

- entre 0-2 semanas
- entre 2-3 semanas
- entre 3-12 semanas
- entre 3 meses-1 ano
- entre 1-1,5 anos
- entre 1,5-2 anos
- entre 2-8 anos
- maior que 8 anos

Qual o porte do seu cão?

- Pequeno
- Médio
- Grande
- Gigante

Qual o sexo do seu cão? *

- Macho
- Fêmea

Você costuma dar banana para o seu cão? *

- Frequentemente
- Raramente
- Nunca

Você costuma dar iogurte para o seu cão? *

- Frequentemente
- Raramente
- Nunca

Seu cão destrói móveis/ objetos na sua ausência? *

- Sim
- Não

Você costuma dar frango para o seu cão? *

- Frequentemente
- Raramente
- Nunca

Você costuma dar gelatina, sorvete ou picolé para o seu cão? *

- Frequentemente
- Raramente
- Nunca

Se sim, qual dos alimentos?

Sua resposta _____

Seu cão está com as vacinas atualizadas? *

- Sim
- Não

Seu cão se alimenta todos os dias? *

- Sim
- Não

Seu cão tem contato com outros cães? *

- Sim
- Não

Seu cão tem costume de andar em círculos? *

- Sim
- Não

Você costuma dar arroz para o seu cão? *

- Frequentemente
- Raramente
- Nunca

Seu cão late excessivamente na sua ausência? *

- Sim
- Não

Você costuma dar biscoitos doces para o seu cão? (ex. bolacha Maria) *

- Frequentemente
- Raramente
- Nunca

Você costuma dar biscoitos salgados para o seu cão? (ex. Club Social®) *

- Frequentemente
- Raramente
- Nunca

Você mantém controle anti-pulgas na sua residência? *

- Sim
- Não

Você costuma dar rações na apresentação pastosa/ latas/ sachês para o seu cão? *

- Frequentemente
- Raramente
- Não

Você costuma dar petiscos próprios para a espécie para o seu cão? (ex. bifeinho Keldog®/ DentaStix Pedigree®) *

- Frequentemente
- Raramente
- Não

Seu cão reage a brincadeiras? *

- Sim
- Não

Seu cão já dormiu dentro de uma geladeira? *

- Sim
- Não

Seu cão altera o comportamento quando você se prepara para sair de casa? (ex. impede sua saída/ se isola/ fica ofegante) *

- Sim
- Não

Seu cão já fez uso de algum suplemento vitamínico/ probiótico? (ex. Glicopan®) *

- Sim
- Não

Se a resposta para a última pergunta foi 'sim', qual o nome comercial do suplemento e por quanto tempo foi utilizado?

Sua resposta _____

Seu cão urina em lugares inapropriados quando está sozinho ou preso? *

- Sim
- Não

Você costuma dar ossos bovinos para o seu cão? *

- Frequentemente
- Raramente
- Não