

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA**

Luciana Silvana D'Amore Adam

**A ferro e fogo: os efeitos do aquecimento sobre os diferentes modelos de dietas do século 21.**

**Porto Alegre**

**2023**

Luciana Silvana D'Amore Adam

**A ferro e fogo: os efeitos do aquecimento sobre os diferentes modelos de dietas do século 21.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Bioquímica.

Orientador: José Cláudio Fonseca  
Moreira

**Porto Alegre**

**2023**

## CIP - Catalogação na Publicação

D'Amore Adam, Luciana Silvana

A ferro e fogo: os efeitos do aquecimento sobre os diferentes modelos de dietas do século 21. / Luciana Silvana D'Amore Adam. -- 2023.

93 f.

Orientador: José Cláudio Fonseca Moreira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Nutrição. 2. Estresse Oxidativo. 3. AGEs. 4. Produtos de glicação avançada. 5. Dieta ocidental. I. Fonseca Moreira, José Cláudio, orient. II. Título.

*Dedico esta pesquisa a ele que me ensinou sobre a curiosidade.*

*Vô.*

## AGRADECIMENTOS

Ao escrever estes agradecimentos minha memória repentinamente se inunda com lembranças que nem sabia que tinha. Olho para trás e percebo que, durante o período que realizei este estudo, houve também uma das maiores mudanças nas vidas de todos nós, uma pandemia mundial. E foi tanto que tentamos esquecer, foi tanto que deixamos de viver, foram tantos que deixamos ativamente de ver que por muito tempo achei que eram poucas as lembranças que ficaram deste tempo, que foi, por muitos motivos, difícil. Vejo que em minha simplicidade humana (e talvez no espírito de pesquisadora) de tentar colocar em caixas, separar, numerar e nomear aquilo que nos rodeia para tentar entender melhor o que nos sucede, deixei de perceber a beleza escondida em cada ato da vida, até nos mais difíceis. E me arrisco aqui a dizer que, em meio ao caos que vivemos neste período, a beleza esteve presente em cada segundo dele. Ao terminar minha dissertação e revisitar cada momento dela e junto a ela de minha vida até aqui, sou grata aos pequenos momentos, sou grata à beleza dos detalhes. Sou grata a cada um que tomou minha mão e me disse que eu era capaz, sou grata aos abraços, ao apoio, às horas e horas de conversas telefônicas, a cada lágrima rolada, às chamadas via vídeo que em momentos pareciam o ponto mais alto de nossas vidas. Sou grata a todos que me impulsionaram a chegar neste momento. Poderia citar inúmeros nomes, pois fui agraciada com vários ao meu redor, mas prefiro aqui deixar eternizado meu amor e minha gratidão a aqueles que me permitiram hoje estar aqui. Não é com exageros que digo que se meus pés hoje pisam firmes, é porque tiveram ontem onde descansar, e por onde eles andam, esse caminho nunca é trilhado sozinho. Costumo pensar que a vida é melhor quando compartilhada, e hoje compartilho esta conquista com aqueles que a conquistaram comigo, pois é meu este orgulho, mas também é de quem me ajudou a chegar até aqui. Agradeço ao meu orientador, agradeço à banca avaliadora desse trabalho pela disponibilidade e atenção, aos funcionários da secretaria do PPG sempre presentes e a CAPES pela bolsa concedida.

Que a ciência siga vencendo.

Meu muito obrigada.

## SUMÁRIO

<b>PARTE I</b>	<b>7</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Obesidade</b>	<b>11</b>
<b>1.1.1 Obesidade e sua relação com a inflamação e o desenvolvimento de outras doenças</b>	<b>12</b>
<b>1.2 Modelos e dietas causadoras de obesidade</b>	<b>15</b>
<b>1.2.1 Dietas e comportamento</b>	<b>18</b>
<b>1.3 AGEs, formação e estrutura</b>	<b>18</b>
<b>1.3.1 AGEs e Inflamação</b>	<b>23</b>
<b>1.3.2 AGEs e a alimentação</b>	<b>26</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>30</b>
<b>3 HIPÓTESE</b>	<b>32</b>
<b>4 OBJETIVO</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Objetivo geral</b>	<b>33</b>
<b>4.2 Objetivo específico</b>	<b>33</b>
<b>PARTE II</b>	<b>35</b>
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
<b>5.1 Animais</b>	<b>37</b>
<b>5.1.1 Desenho experimental</b>	<b>39</b>
<b>5.1.2 Cálculo do tamanho amostral</b>	<b>40</b>
<b>5.2 Tratamento</b>	<b>41</b>
<b>5.2.1 Dietas</b>	<b>41</b>
<b>5.3 Experimentos</b>	<b>43</b>
<b>5.3.1 Análise comportamental</b>	<b>43</b>
<b>5.3.2 Eutanásia</b>	<b>46</b>
<b>5.3.3 Perfil redox</b>	<b>47</b>

<b>5.3.3.1 Enzimas antioxidantes e de desintoxicação</b>	<b>48</b>
<b>5.3.3.2 Dano a macromoléculas</b>	<b>50</b>
<b>5.3.4 Perfil inflamatório</b>	<b>53</b>
<b>6 RESULTADOS</b>	<b>55</b>
<b>6.1 Perfil Inflamatório</b>	<b>55</b>
<b>6.2 Perfil Redox</b>	<b>63</b>
<b>6.3 Comportamento</b>	<b>66</b>
<b>PARTE III</b>	<b>70</b>
<b>7 DISCUSSÃO</b>	<b>71</b>
<b>8 CONCLUSÃO</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>84</b>

**PARTE I**

## RESUMO

A obesidade é uma condição na qual o indivíduo apresenta excesso de gordura corporal acumulada podendo acarretar prejuízos graves à saúde do mesmo, podendo ter origem individual, socioeconômica ou ambiental. Segundo a organização mundial da saúde (WHO) a obesidade vem aumentando rapidamente em proporções epidêmicas ao redor do mundo, devido principalmente a um aumento no consumo de alimentos altamente calóricos e com pouco valor nutricional em conjunto com um estilo de vida sedentário. A obesidade e a síndrome metabólica associada a ela são, em grande parte, consequências das dietas consumidas atualmente, por exemplo, dietas altamente palatáveis e que contêm grandes proporções de lipídios, proteínas, carboidratos e sal, além de conter baixo conteúdo de fibras. Dentre os diferentes métodos para estudar a síndrome metabólica, os mais utilizados são modelos com animais geneticamente modificados e modelos de síndrome metabólica baseados na dieta ingerida pelos animais, as quais são geralmente baseadas em lipídios e açúcar refinado. Neste tipo de dieta podemos encontrar grande quantidade de produtos finais de glicação avançada (AGEs - *advanced glycation end products*) e os produtos finais de lipoperoxidação avançada (ALEs - *advanced lipid peroxidation end products*), os quais podem ser formados em altas temperaturas durante o aquecimento dos alimentos e por esse motivo estão presentes em altos níveis em alimentos ultraprocessados. AGEs estão implicados em diversas vias de sinalização que levam a estados inflamatórios e doenças relacionadas e são conhecidos por promover um desbalanço redox, bem como um quadro pró-inflamatório. Neste trabalho analisamos em ratos os diferentes efeitos de dietas com variações aquecidas e não aquecidas, assim como os processos bioquímicos e comportamentais decorrentes do consumo das mesmas, verificando se o aquecimento pode gerar um índice maior de malefícios para indivíduos submetidos a elas do que os já causados pelas dietas não aquecidas. As dietas utilizadas foram Dieta controle (CHOW), Dieta controle aquecida (HEATED CHOW), Dieta rica em lipídios (HFD), Dieta rica em lipídios aquecida (HEATED HFD), Dieta de cafeteria padronizada (WD) e Dieta de cafeteria padronizada aquecida (HEATED WD). Foram analisados parâmetros inflamatórios, atividade de enzimas antioxidantes e de desintoxicação, danos a macromoléculas e alterações comportamentais, além de níveis séricos de leptina, adiponectina, glicose e carboximetil-lisina. A WD levou a um aumento nos níveis de insulina e leptina além do conteúdo de carboximetil-lisina, uma quantificação elevada de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico e de de glutathione s-transferase, enquanto sua versão aquecida obteve menor significância em seus resultados. HFD ocasionou modificações, porém as mesmas foram menores do que aquelas inferidas pela WD, fato aqui discutido principalmente devido ao diferente conteúdo de gordura/açúcar entre as dietas. Nossas descobertas sugerem a validação do modelo de dieta WD como indutor de obesidade em animais e das vias bioquímicas resultantes da doença, independentemente da influência térmica na dieta.

## ABSTRACT

Obesity is a condition in which an individual has an excess accumulation of body fat, which can lead to serious health problems. It can have individual, socioeconomic, or environmental origins. According to the World Health Organization (WHO), obesity is rapidly increasing on an epidemic scale worldwide, primarily due to a rise in the consumption of highly calorie-dense foods with low nutritional value, coupled with a sedentary lifestyle. Obesity and the associated metabolic syndrome are largely consequences of current diets, such as highly palatable diets that contain high proportions of fats, proteins, carbohydrates, and salt, while also being low in fiber content. Various methods are used to study metabolic syndrome, including models with genetically modified animals and diet-induced models based on the animals' food intake, which are typically rich in lipids and refined sugars. In this type of diet, there is a high presence of advanced glycation end products (AGEs) and advanced lipid peroxidation end products (ALEs), which are formed at high temperatures during food heating processes and are therefore found in high levels in ultraprocessed foods. AGEs are involved in various signaling pathways that lead to inflammatory states and related diseases. They are known to promote redox imbalance and a pro-inflammatory state. In this study, we analyzed the different effects of diets with heated and non-heated variations in rats, as well as the biochemical and behavioral processes resulting from their consumption. We aimed to determine whether food heating could generate a higher index of harm for individuals subjected to these diets compared to the harm caused by non-heated diets. The diets used were the Control Diet (CHOW), Heated Control Diet (HEATED CHOW), High-Fat Diet (HFD), Heated High-Fat Diet (HEATED HFD), Standard Cafeteria Diet (WD), and Heated Standard Cafeteria Diet (HEATED WD). We analyzed inflammatory parameters, antioxidant and detoxification enzyme activity, damage to macromolecules, behavioral changes, as well as serum levels of leptin, adiponectin, glucose, and carboxymethyl lysine. The WD led to an increase in insulin and leptin levels, as well as carboxymethyl lysine content. It also showed elevated levels of thiobarbituric acid-reactive species and glutathione S-transferase, while its heated version had less significance in its results. The HFD caused modifications, although they were less pronounced than those induced by the WD, which can be attributed to the different fat/sugar content between the diets. Our study leads us to believe in the validity of the WD model for generating obesity in animals and the biochemical cascades resulting from the disease, regardless of the heating of the diet.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 3-DG-AGEs** - AGE derivados de 3-desoxiglucosona
- AGEs** - advanced glycation end products (produtos finais de glicação avançada)
- ALEs** - advanced lipid peroxidation end products (produtos finais de lipoperoxidação avançada)
- CAT** - Catalase
- CDNB** - 1 cloro 2,4 dinitrobenzeno
- CHOW** - Control diet (dieta controle)
- DTNB** - Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico
- Fru-AGEs** - AGE derivado de frutose
- Glicol-AGEs** - AGE derivado de glicolaldeído
- Glu-AGEs** - AGE derivado de glicose
- Glycer-AGEs** - AGE derivado de gliceraldeído
- GO-AGEs** - AGE derivado de glioxal
- GPx** - Glutathione peroxidase
- GST** - Glutathione S-transferase
- HFD** - high fat diet (dieta rica em gorduras)
- IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IL-6** - Interleucina 6
- IMC** - índice de massa corporal
- MGO-AGEs** - AGE derivado de metilglioxal
- NAFLD** - Non-alcoholic fatty liver disease (doença hepática gordurosa não-alcoólica)
- NSCD** - Cafeteria diet (dieta de cafeteria)
- SH** - Sulfidril
- SOD** - Superóxido dismutase
- TBARS** - Espécies reativas de ácido barbitúrico
- TNF- $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral alfa
- WD** - Western diet (dieta ocidental)
- WHO** - World Health Organization (organização mundial da saúde)

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Obesidade

A obesidade é uma condição na qual o indivíduo apresenta excesso de gordura corporal acumulada podendo acarretar prejuízos graves à saúde do mesmo, podendo ter origem individual, socioeconômica ou ambiental (Pinheiro et al. 2004). Segundo a organização mundial da saúde (WHO) a obesidade vem aumentando rapidamente em proporções epidêmicas ao redor do mundo, devido principalmente a um aumento no consumo de alimentos altamente calóricos e com pouco valor nutricional em conjunto com um estilo de vida sedentário (WHO, 2014).

Através de dados obtidos pela Pesquisa Nacional de Saúde (PNS, 2020), sabe-se que hoje no Brasil mais da metade dos adultos apresentam excesso de peso (60,3%), sendo esse valor formado majoritariamente por mulheres (62,6%). Quando trata-se da obesidade, computou-se que a mesma atinge 25,9% da população brasileira, alcançando 41,2 milhões de adultos. Um importante acompanhamento foi realizado também no ano de 2020 na Atenção Primária à Saúde (APS) do SUS, onde foi visualizado que 15,9% das crianças menores de 5 anos e 31,7% das crianças entre 5 e 9 anos possuíam excesso de peso, e dessas, 7,4% e 15,8%, respectivamente, apresentavam obesidade segundo Índice de Massa Corporal (IMC) para idade. Também foram acompanhados adolescentes, onde 31,8% apresentavam excesso de peso e 11,9% apresentavam obesidade. Estima-se que cerca de 6,4 milhões das crianças brasileiras menores de 10 anos tenham excesso de peso e 3,1 milhões tenham obesidade. E considerando todos os adolescentes brasileiros, estima-se que cerca de 11,0 milhões tenham excesso de

peso e 4,1 milhões tenham obesidade. Estes dados podem ser melhor visualizados a partir da Figura 1.

Tabela 8168 - Pessoas de 18 anos ou mais de idade com excesso de peso ou obesidade, por sexo e grupo de idade			
Variável - Pessoas de 18 anos ou mais de idade com excesso de peso (Mil pessoas)			
Brasil			
Ano - 2019			
Grupo de idade	Sexo		
	Total	Homens	Mulheres
Total	95.901,361	42.898,945	53.002,416
18 a 24 anos	7.434,345	2.849,654	4.584,691
25 a 39 anos	26.817,386	13.087,492	13.729,894
40 a 59 anos	39.497,081	17.533,007	21.964,074
60 anos ou mais	22.152,549	9.428,791	12.723,758

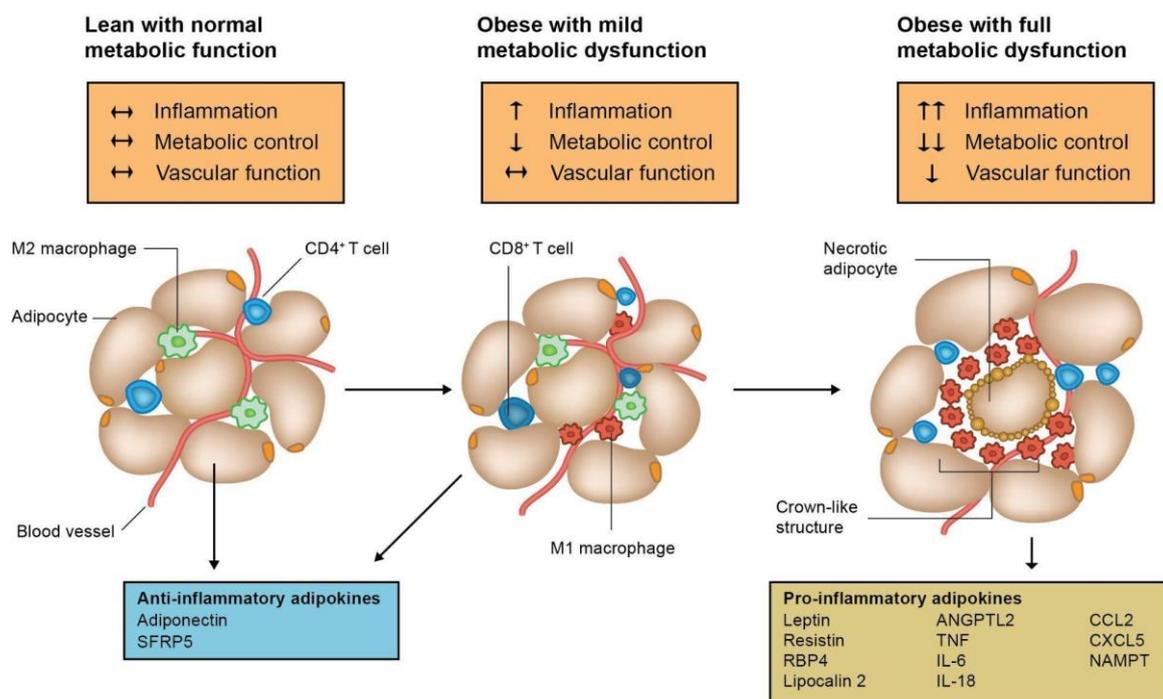
Fonte: IBGE - Pesquisa Nacional de Saúde

**Figura 1:** Tabela demonstrativa do número de pessoas acima de 18 anos (divididas entre homens, mulheres e valores totais) acima de 18 anos que possuem excesso de peso no Brasil. Fonte: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/8168#resultado> acesso: 31/05/2022.

### 1.1.1 Obesidade e sua relação com a inflamação e o desenvolvimento de outras doenças

Indivíduos obesos apresentam alterações na homeostase corporal, ocorrendo disparidade no balanço redox, representada, por exemplo, pelo excesso de peroxidação lipídica na membrana celular acarretando a formação de radicais livres dentro da célula (França et al., 2013). Sabe-se também que o acúmulo exacerbado do tecido adiposo pode ser uma fonte geradora de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6, e leptina, associando a obesidade a um quadro pró-

inflamatório crônico que pode acarretar disfunções metabólicas (Lee et al., 2013). A ativação de macrófagos, principalmente quando exacerbada, é responsável pela liberação destas citocinas, entre outras moléculas (Prado, W. L. D. et al, 2009). Em indivíduos obesos e/ou em disfunção metabólica, é observado um aumento dessa sinalização pró-inflamatória devido a uma contínua ativação de macrófagos em tecidos como o tecido adiposo, por exemplo, como é demonstrado na Figura 2.



**Figura 2:** Demonstrativo da modulação fenotípica do tecido adiposo em situação não obesa com função metabólica normal, obesa com disfunção metabólica mediana e obesa com alta disfunção metabólica, respectivamente. Imagem adaptada de: Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews immunology*, 11(2).

A síndrome metabólica relacionada à obesidade inicia-se com a hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo. Este se dá devido ao acúmulo em excesso de nutrientes e ao crescente estoque de lipídios, gerando um estresse celular. Assim, o tecido vem a perder a capacidade de manter a homeostase e começa a apresentar características pró-inflamatórias, vistas na figura acima. São elas, a infiltração de macrófagos M1 e a secreção de IL-6 e TNF- $\alpha$ . Essas citocinas estarão presentes na corrente sanguínea e alcançando diversos tecidos, como por exemplo o sistema nervoso central, vindo a gerar diversos malefícios (Ouchi, N. et al., 2011).

O aumento da produção de radicais livres quando associado à uma reduzida atividade das defesas antioxidantes endógenas devido ao desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, assim como o quadro inflamatório crônico (Bondia-Pons et al., 2012), auxiliará no desbalanço redox característico do estresse oxidativo (Barbosa et al., 2010).

Sabe-se que uma resposta inflamatória será desencadeada no quadro de obesidade crônica, o que desviará o sistema imunológico à um fenótipo pró-inflamatório, dando início a uma influência recíproca entre a obesidade e a inflamação (Mazon et al., 2017). A inflamação crônica e o estresse oxidativo são importantes para o desenvolvimento de síndrome metabólica e outras doenças degenerativas, como por exemplo, artrite, aterosclerose, câncer, diabetes do tipo II, demência, doenças vasculares e osteoporose (Bondia-Pons et al. 2012; Chung et al., 2009). A síndrome metabólica pode ser considerada um passo intermediário entre o estado pró-inflamatório crônico da obesidade e o aparecimento de doenças degenerativas, uma vez que após o estabelecimento da síndrome há um aumento no risco de doenças como, diabetes tipo II, acidentes vasculares cerebrais, doenças cardiovasculares, determinados cânceres, doença hepática gordurosa

não-alcoólica e doenças alérgicas (Bugianesi et al., 2005; Jin and Flavell, 2013; Rêgo et al., 2009).

Dentre os tantos diferentes possíveis desdobramentos e doenças associadas à obesidade, a doença hepática gordurosa não-alcoólica (NAFLD – non-alcoholic fatty liver disease) é reconhecida como a desordem no fígado mais comum no mundo, podendo ter incidência de 70 a 90% em indivíduos obesos. A doença hepática não-alcoólica se caracteriza por um acúmulo de triacilgliceróis dentro das células do fígado (Dhibi et al., 2011). Diversos estudos apontam que a NAFLD possui um importante papel no desenvolvimento de resistência à insulina, assim como no aparecimento de disfunções e danos cerebrais. Além disso, diversos autores também afirmam que a resistência à insulina pode ser relacionada à doença de Alzheimer (Ghareeb et al., 2011; Martins, I. J. et al 2014).

Porém, a obesidade encontra-se também relacionada a outras doenças, visto que a mesma é associada ao aumento nos níveis cérebro/cortical de espécies reativas de oxigênio e prejuízo das funções cerebrais, o que sugere que a obesidade possa aumentar o risco de condições neurodegenerativas como, por exemplo, a doença de Alzheimer (Feeman et al., 2013; Lee et al., 2013; Luchsinger and Mayeux, 2007; Naderali et al., 2009). Estudos demonstram que a obesidade está relacionada a modulações estruturais e funcionais no cérebro, onde quanto maior for o índice de massa corporal (IMC), menor é o volume cerebral, com indivíduos obesos de meia-idade apresentando atrofia cerebral e um risco aumentado de demência no futuro do que indivíduos não obesos (Ward et al., 2005).

## **1.2 Modelos e dietas causadoras de obesidade**

A obesidade e a síndrome metabólica associada a ela são, em grande parte, conseqüências das dietas consumidas atualmente, por exemplo, dietas altamente palatáveis e que contêm grandes proporções de lipídios, proteínas, carboidratos e sal, além de conter baixo conteúdo de fibras (Alemany, 2013; Cordain et al., 2005). Demonstra-se em diferentes estudos que os carboidratos, por exemplo, conseguem alterar os níveis de glicose circulante e intracelular, impactando as vias metabólicas da glicose nos tecidos e assim podendo afetar de forma forte e negativa a saúde humana (Takeuchi, M. et al., 2021)

Atualmente, dentre os diferentes métodos para estudar a síndrome metabólica, os mais utilizados são modelos com animais geneticamente modificados e modelos de síndrome metabólica baseados na dieta ingerida pelos animais. Este último, geralmente é baseado em dietas ricas em lipídios e açúcar refinado (Kennedy et al., 2010; Panchal and Brown, 2011).

Há várias dietas para induzir doenças (ou desordens) específicas como aterosclerose (dieta rica em colesterol), pressão alta (dieta rica em sal), diabetes (dieta rica em açúcares). Para desenvolvimento de obesidade e síndrome metabólica são usadas principalmente dois tipos de dietas:

- Dieta rica em gordura (conhecidas em inglês como *High fat diet* - *HFD*).
- Dieta rica em lipídios e carboidratos, a qual é conhecida como dieta de cafeteria (conhecida em inglês como *Cafeteria diet* - *NSCD*) (Gajda et al., 2007; Panchal and Brown, 2011).

	Componentes (g/Kg de ração)	HFD	NSCD
<b>Proteína</b>	Proteína de soja	200	-
	<b>TOTAL</b>	200	~200
<b>Lipídios</b>	Banha de porco*	335	-
	Óleo de soja	20	-
	<b>TOTAL</b>	<b>335</b>	<b>~220</b>
<b>Carboidratos</b>	Amido de milho	235	-
	Açúcar	100	-
	<b>TOTAL</b>	<b>335</b>	<b>~470</b>
<b>Outros componentes</b>	Sal (sódio)	5 (1,9)	~ 20 (7,86)
	Fibras	50	~30
	Vitaminas	10	-
	Minerais	35	-
	Colina bitartarato	2,5	-
	Metionina	3	-
	Lisina	3	-
	<b>TOTAL EM GRAMAS</b>	<b>1001</b>	<b>1001</b>

**Tabela 1:** Diferença em composição entre HFD e NSCD, onde destaca-se a presença de maior quantia de lipídios e fibras na primeira enquanto vemos maior quantidade de carboidratos e sal na segunda.

Porém, NSCD, mesmo sendo vastamente utilizada, apresenta algumas falhas de reprodutibilidade (Gajda, 2009) uma vez que os alimentos industrializados são diferentes em cada região do mundo, e grande heterogeneidade patológica dos animais devido às diferenças nas escolhas dos alimentos e além disso devemos considerar o largo uso de conservantes e aditivos nestes alimentos. Foi visto que essas falhas poderiam ser controladas utilizando-se uma dieta padronizada, por isso,

para este trabalho, se utilizará uma dieta padrão já descrita em trabalhos anteriores pelo nosso grupo de pesquisa (Bortolin, R. C. *et al.*, 2018).

### **1.2.1 Dietas e comportamento**

Existe também uma conexão entre dietas hipercalóricas e comportamento, onde estudos recentes mostram que experimentos com esse tipo de dieta induzem efeitos ansiogênicos em camundongos (Del Rio *et al.*, 2016).

Encontram-se também, além da relação entre a obesidade e fisiopatologias as relações entre obesidade e psicopatologias (Stunkard *et al.*, 2003), uma delas é o fato de que a obesidade é um estado inflamatório e a inflamação por sua vez, foi associada a transtornos de humor como por exemplo a depressão (Luppino *et al.*, 2010). Segundo Foltz, as avaliações da relação entre obesidade e alterações no sistema nervoso central, bem como as consequências sobre o comportamento de animais obesos fazem-se necessárias (Foltz *et al.*, 2007).

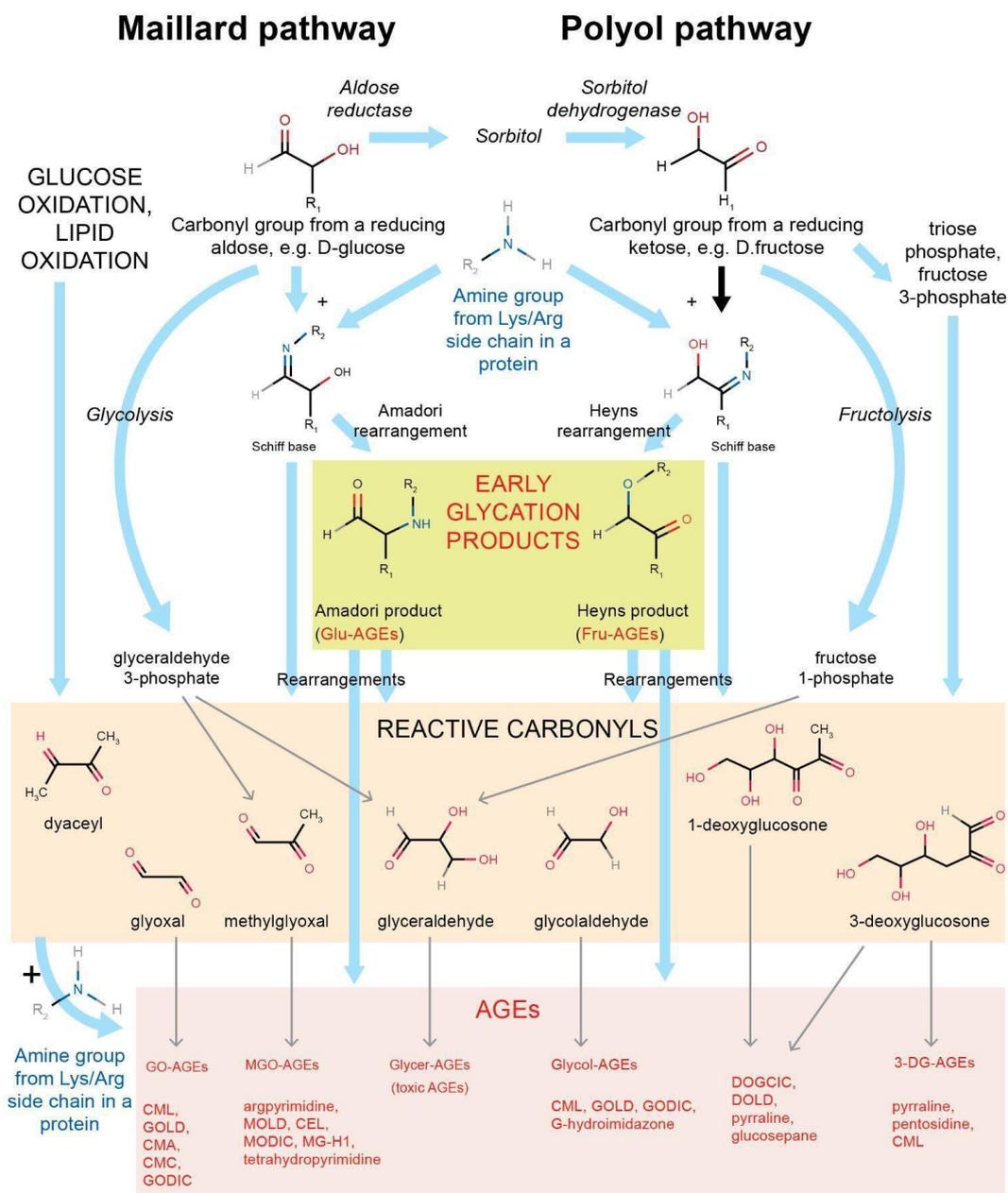
Quando observados em conjunto, os diversos desdobramentos acarretados pela obesidade como disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e elevada sinalização inflamatória, vemos que todos contribuem para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Sendo assim, a alta adiposidade pode ser considerada um fator de risco para doenças metabólicas e neurodegenerativas (Mazon *et al.*, 2017).

### **1.3 AGEs, formação e estrutura**

Bem menos comentado em pesquisas com dietas animais, mas não menos importante, são os produtos finais de glicação avançada (conhecidos em inglês

como AGEs - *advanced glycation end products*) e os produtos finais de lipoperoxidação avançada (conhecidos em inglês como ALEs - *advanced lipid peroxidation end products*), os quais podem ser formados em altas temperaturas durante o aquecimento dos alimentos e por esse motivo estão presentes em altos níveis em alimentos ultraprocessados (Poulsen et al., 2013). O estudo sobre os AGEs e seus efeitos na saúde é uma área muito promissora na pesquisa da nutrição atual. A pesquisa inicial sobre os processos químicos e a formação de AGEs é reconhecida desde 1900, porém apenas nos últimos 20 anos tem sido vista a realização de trabalhos mais confiáveis sobre o assunto. Os processos químicos e caminhos que levam à formação de AGEs ainda não se encontram totalmente elucidados (John, W. G. et al., 1993).

Os AGEs pertencem a um grupo heterogêneo e complexo de compostos, podendo ser formados exogenamente ou endogenamente por meio de diferentes mecanismos e a partir de diversos precursores. Em geral, os AGEs vem a ser criados a partir de uma condensação não enzimática, ou seja, sem catalisador biológico envolvido entre grupos carbonila de açúcares redutores e grupos amina livres de ácidos nucleicos, proteínas ou lipídios, seguido por rearranjos adicionais, o que produz produtos finais estáveis e irreversíveis (Twarda-Clapa, A. et al., 2022).



**Figura 3:** Esquema que demonstra a formação de AGEs a partir da via de Maillard e Polyol.

Abreviaturas: derivado de glicose (Glu-AGEs), derivado de frutose (Fru-AGEs), derivado de glicoxal (GO-AGEs), derivado de metilglicoxal (MGO-AGEs), derivado de gliceraldeído (Glycer-AGEs), derivado de glicoxalaldeído (Glicol-AGEs) e derivados de

3-desoxiglucosona (3-DG-AGEs).

Imagem adaptada de: Twarda-Clapa, A., Olczak, A., Białkowska, A. M., & Koziółkiewicz, M. (2022). Advanced Glycation End-Products (AGEs): Formation, Chemistry, Classification, Receptors, and Diseases Related to AGEs. *Cells*, 11(8), 1312.

A primeira etapa da via de Maillard irá consistir, por exemplo, na condensação de um grupo carbonila, de um açúcar redutor e de um grupo amina derivado das cadeias laterais de lisina ou arginina (Maillard, L. C., 1912; Vistoli, G. et al., 2013). Este esquema mostrado na figura 3 representa a geração de AGEs a partir de uma aldose redutora ou uma cetose também redutora. É importante ressaltar que a redução de cetoses pode ser produzida in vivo por meio da via do poliol, onde D-glicose é reduzida a sorbitol pela aldose redutase e posteriormente transformada pela sorbitol desidrogenase em D-frutose. No caso da condensação do grupo carbonila e do grupo amina, temos uma reação reversível que irá produzir a chamada base de Schiff (aldimina). Este, na via de Maillard, irá sofrer um rearranjo de Amadori, resultando em um produto de amadori estável. O análogo desta, na via de poliol, é o produto de Heyns, que será gerado pelo rearranjo de Heyns (Heyns, K., e Beilfuss, W., 1970). Considera-se que esses compostos são produtos de glicação precoce e, por exemplo, incluem AGE derivado de frutose (Fru-AGE) e AGE derivado de glicose (Glu-AGE; Figura 3) (Tavares Ribeiro, R. et al., 2016). No caso da HbA1c e a albumina sérica humana glicada (às vezes abreviada como gHSA ou GHSA) (Anguizola, J. et al., 2013), são pertencentes à última classe (Glu-AGE) e são importantes marcadores a longo prazo de estados hiperglicêmicos, resistência à insulina e diabetes; sendo globalmente usados na medicina e na clínica para tal (Heidari, F. et al. ., 2020; Nowotny, K. et al., 2015).

Os compostos finais criados pelas vias de Maillard e poliol juntamente com seus intermediários (por exemplo, as bases de Schiff) para se tornarem AGEs, precisam sofrer ainda rearranjos adicionais, para assim produzir os AGEs finais e uma classe heterogênea de carbonilas reativas. Alguns dos exemplos mais conhecidos incluem glioxal, metilglioxal, gliceraldeído, diacetil, 1-desoxiglicose e 3-desoxiglicose (figura 3). Chama-se de via de Hodge a geração de AGEs que se dá pela oxidação de produtos de Amadori (Ott, C. et al., 2014).

Vemos também um fator adicional com impacto significativo sobre a formação de produtos de glicação precoce, que é a temperatura. Quando processam-se alimentos em altas temperaturas (a partir de cerca de 120-180 °C), dá-se a reação de Maillard de forma muito rápida, em contraste, a formação *in vivo* a temperaturas mais baixas de produtos de Amadori e Heyns requer muito mais tempo para acontecer (Ott, C. et al., 2014).

Existem outras vias *in vivo* pelas quais podem ser originadas outras carbonilas reativas, como por exemplo metilglioxal e gliceraldeído, que podem ser gerados no curso da glicólise (a partir de gliceraldeído 3-fosfato) ou frutólise (a partir de frutose 1-fosfato). Outras possibilidades que irão levar à formação desta classe de compostos são a oxidação da glicose e o metabolismo da D-frutose, que produzirá triose fosfato e frutose 3-fosfato. Neste momento nota-se também que outro grupo importante de compostos originam-se, os produtos finais de lipoxidação (ALEs). Estes são advindos das carbonilas reativas formadas como resultado da peroxidação lipídica (Vistoli, G. et al., 2013). Entretanto, mesmo que AGEs e ALEs possam compartilhar estruturas iguais devido à formação pelos mesmos precursores, é importante ressaltar que são dois grupos separados.

Existe, dentre os AGEs, um subconjunto classificado como AGEs tóxicos (TAGEs). Estes, por sua vez, são conhecidos por desencadear a sinalização após a ligação ao receptor para AGEs (RAGE) e induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo fortemente citotóxicos (Takeuchi, M., 2020).

O RAGE, por sua vez, também desempenha um importante papel, uma vez que, hoje, ele também é considerado um receptor multi-ligante para diversos padrões de dano molecular (DAMPs) e capaz de estimular sua própria transcrição e transporte para membrana através de um eixo de feedback positivo. A primeira purificação de RAGE por Neeper et al. foi feita a partir de células endoteliais de pulmão bovino (Neeper, M. et al., 1992), e hoje esta proteína transmembrana do tipo I de passagem única é considerada como um receptor AGE representativo no endotélio e também responsável pela ativação intracelular de diversos sinais pró-inflamatórios culminando no aumento da transcrição do fator-nuclear-kappa-beta (NfκB) que por sua vez incrementa a formação de RAGE.

### **1.3.1 AGEs e Inflamação**

AGEs têm sido implicados em diversas vias de sinalização que levam a estados inflamatórios e doenças relacionadas por várias décadas. Está crescendo rapidamente o número de publicações que relatam dados experimentais sobre AGEs endógenos e exógenos, o que indica um crescimento nas evidências do envolvimento de AGEs em muitos processos fisiológicos e patológicos (Shen, C. Y., et al., 2020; Chaudhuri, J. et al., 2018; Dariya, B., & Nagaraju, G. P., 2020).

Estes compostos são conhecidos por promover um desbalanço redox, bem como um quadro pró-inflamatório e por isso também são bastante associados com doenças degenerativas, tais como diabetes, aterosclerose, e doença de Alzheimer

(Goldberg et al., 2004; Henle, 2007). A presença de AGEs está estreitamente relacionada à hiperglicemia e a sua patobioquímica pode explicar muitas das mudanças observadas nas complicações relacionadas à diabetes (Singh, R. B. A. M. et al., 2001). Estudos histopatológicos mostram a acumulação de AGEs em tecidos de tipos variados, como ateroma coronário, córtex renal, membrana basal glomerular (Bierhaus, A. et al., 1998), assim como camadas dérmicas (Masaki, H. et al., 1999), placas amiloides quando em situação de doença de Alzheimer (Munch, G. et al., 1997), cartilagens quando em situação de artrite reumatoide (Takahashi, M. et al., 1994), músculos cardíacos, pulmões e fígado (Sell, DR. et al., 1990).

Relaciona-se também o potencial pró-inflamatório dos AGEs com o envelhecimento. Sabe-se que alterações bioquímicas de células e tecidos associadas com o envelhecimento são, frequentemente, fatores pró-inflamatórios. A partir dessa conexão, muitos biomarcadores de envelhecimento vem sendo usados em diferentes estudos sob estados inflamatórios, onde níveis de proteína C reativa (PCR), interleucina-6, ferritina e linfopenia foram mencionados (Clarke, R. et al., 2016; Chen, Y. et al., 2021).

Ao consumir de forma prolongada AGEs, destaca-se como resultado a produção de uma molécula efetora pró-inflamatória, molécula complemento 5a (C5a), o aumento de outros marcadores inflamatórios, como por exemplo IL6, IL-1a, ICAM e TIMP-1, e a ativação imune (Snelson, M. et al., 2021).

Como citado de forma breve anteriormente, AGEs têm a capacidade de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Takeuchi, M., 2020). Devido a isso, esse será um parâmetro analisado neste trabalho. Vemos que o estresse oxidativo está relacionado com desbalanço redox em um organismo, e

vemos três tipos principais de EROs: radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $HO\cdot$ ). Também existem oxidantes contendo nitrogênio, onde o mais comum em estudos tratando de AGEs em organismos humanos é o óxido nítrico ( $NO\cdot$ ). Chama-se o grupo de oxidantes de nitrogênio de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e seu acúmulo pode causar diversos agravantes, como sinalização redox e comprometimento do controle ou dano molecular. O estresse oxidativo causado pelos oxidantes tem capacidade de induzir reações de peroxidação lipídica e glicoxidação por meio do ataque a grupos amino livres em proteínas, o que resulta na formação, respectivamente, de ALEs e AGEs (Moldagazieva, N. T. et al., 2019).

O aumento dos estados inflamatórios e do estresse oxidativo dado pelos AGEs possuem três vias principais que são consistentes com os mecanismos de ação citados anteriormente, são eles:

(I) AGEs ligam-se à superfície celular ou reticulam-se com proteínas extracelulares e intracelulares;

(II) AGEs catalisam a formação e acúmulo de EROs;

(III) AGEs se ligam a receptores (RAGEs) que irão induzir as cascatas de mediadores patogênicos (Serin, Y. et al., 2021).

Demonstrou-se, em células de camundongo, que o eixo entre AGE-RAGE ativa NADPH oxidase, aumentando o estresse oxidativo e inibindo a atividade do fator de transcrição (Wautier, M. P. et al., 2001).

Outros mecanismos de importante destaque quando falamos sobre AGEs e inflamação são os mecanismos pelos quais os mesmos desempenham um papel em doenças e distúrbios. São eles:

(I) A reticulação covalente de proteínas, lipídios e DNA do soro e da matriz extracelular (MEC), o que resulta em comprometimento bioquímico e ruptura celular.

(II) Interação dos AGEs com seus receptores (onde destaca-se o eixo AGE-RAGE), desencadeando uma série de reações em cascata e vias de sinalização, proliferação, autofagia e apoptose (Zeng, C. et al., 2019).

Além destes dois mecanismos, existem também outros quatro mecanismos descritos por Chen e Guo, são eles:

(I) geração de EROs;

(II) comprometimento da função mitocondrial;

(III) AGEs como antígenos que irão induzir respostas imunes;

(IV) alergias causadas por AGEs (Chen, Y., e Guo, T. L., 2021).

O cruzamento de dados entre a quantidade de AGEs em doenças degenerativas (onde destaca-se seu aumento) sugere que os primeiros podem ser utilizados como biomarcadores de tais doenças, porém ainda existe uma necessidade latente de melhorar os métodos de medição. Adicionalmente, a forma solúvel de RAGE (sRAGE) foi também estudada como um potencial biomarcador, visto que sua quantidade aumentada no organismo permite a detecção de doenças degenerativas em seu estágio de risco inicial (Xu, X. Y. et al., 2017).

### **1.3.2 AGEs e a alimentação**

É importante ressaltar que a formação de AGEs faz parte do metabolismo normal, mas se níveis excessivamente altos de AGEs são atingidos nos tecidos e na circulação, eles podem se tornar perigosos à saúde (Uribarri, J. et al., 2010). Esse excesso pode se dar, justamente, através do consumo de certos alimentos, primordialmente os aquecidos (Singh, R. B. A. M. et al., 2001). Os AGEs estão naturalmente presentes em alimentos de origem animal não cozidos, e o cozimento resulta na formação de novos AGEs dentro desses alimentos. Em particular, grelhar, assar, selar e fritar propagam e aceleram a formação de novos AGEs. Se considera bem documentado o fato de a dieta moderna ser uma grande fonte de AGEs (Goldberg, T. et al., 2004).

Previamente, foi suposto que os AGEs provenientes da dieta (dAGEs) eram pouco absorvidos e devido a isso seu papel potencial na saúde e nas doenças humanas foi amplamente ignorado. No entanto, estudos recentes com a administração oral de uma única refeição rica em AGEs para seres humanos, bem como AGEs de proteína única rotulada ou dietas enriquecidas com AGEs específicos, mostram claramente que os dAGEs são absorvidos e contribuem significativamente para o pool de AGEs do corpo (Koschinsky, T. et al., 1997 e Cai, W. et al., 2008).

A dieta ocidental que vem se desenvolvendo dentre a população tem um grande aumento de consumo de alimentos processados. Nestes alimentos, compostos químicos são adicionados com frequência para enriquecer o sabor, textura ou a segurança dos alimentos, porém os mesmos podem sofrer reações que levam à formação de AGEs durante seu processamento térmico (Zinöcker, M. K., & Lindseth, I. A., 2018). Diversos alimentos e bebidas presentes neste tipo de dieta estão repletos de açúcares e gordura. Estes fatores em paralelo à diminuição da

atividade física, o que também vem a fazer parte do estilo de vida de uma grande parcela da população ocidental, leva a doenças nessa civilização (Adlercreutz, H., 1990) e chamou a atenção para pesquisas sobre a etiologia de diferentes estados patológicos, como por exemplo a resistência à insulina (Esmailzadeh, A., et al., 2007), diabetes (van Dam, R. M., et al., 2002), doenças cardiovasculares (DCV) (Fung, T. T., Rimm, et al., 2001), câncer (Hintze, K. J., Benninghoff, A. D. & Ward, R. E., 2012) e envelhecimento.

Devida a composição dessa dieta, deve ser direcionada uma atenção à glicação in vivo de proteínas. No corpo humano, a formação de AGEs é um processo prolongado. O primeiro produto endógeno de glicação precoce observado, hemoglobina glicada (HbA1c), foi detectado em 1968 em um corpo humano em estado de diabetes (Rahbar, S. et al., 1969).

AGEs por muitas vezes também são denominados como glicotoxinas e sua presença é resultante de uma grande quantidade de compostos de açúcar e suas interações com aminoácidos, peptídeos e proteínas humanas. Sua presença representa uma das teorias que vem a explicar as causas de danos celulares e diversos distúrbios teciduais, enrijecimento da matriz extracelular devido à glicação do colágeno ou aglomeração de  $\beta$ -amilóide glicado levando à DA (Gill, V. et al., 2019).

Takeuchi et al. estabeleceu um novo conceito de formação de AGEs tóxicos (TAGE) onde há uma forte conexão entre a quantidade de Glycer-AGEs nas células e os hábitos de nutrição humana (Takeuchi, M., 2020). Em seu trabalho, Takeuchi ressalta que a ingestão de AGEs provenientes da dieta (dAGEs) depende principalmente do tipo de alimento e de seu processamento, onde gorduras sólidas,

carnes gordurosas, laticínios integrais e alimentos altamente processados (principalmente fritos, fritos, assados e grelhados) são particularmente fontes ricas em AGEs, reforçando a conexão entre a dieta ocidental e a formação de AGEs. Ainda dentro de seu estudo Takeuchi e colaboradores também observaram que, em ratos cuja a dieta continha bebidas ricas em AGEs, observava-se um aumento da expressão de RAGE, do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no fígado e um acúmulo anormal de TAGEs nos hepatócitos (Takeuchi, M., 2020). Devido aos dados encontrados, os autores concluíram que as interações entre TAGEs extracelulares e RAGE que podem modular a sinalização intracelular, modular a expressão de genes escolhidos, induzir a produção de EROs em vários tipos celulares e levar à liberação de moléculas pró-inflamatórias podem causar as alterações patológicas observadas em doenças relacionadas ao estilo de vida.

## 2 JUSTIFICATIVA

A *National Health and Nutrition Examination Survey* demonstrou que de 1999-2000, nos EUA, 64,5% dos adultos estão com sobrepeso ou são obesos (Höper et al., 2014; Smyth and Heron, 2006). No Brasil, pelos dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) vemos que o número de pessoas com sobrepeso ou obesas vem aumentando na população. Pesquisas mostram que entre o ano de 2002 e 2003 aproximadamente 40% da população estava com excesso de peso. Já no período entre 2008 e 2009 aproximadamente 49 % da população era composta por pessoas com excesso de peso (IBGE, 2004; IBGE, 2010).

Em dados mais recentes, de acordo com o ministério da saúde, do ano de 2006 a 2018, o índice de pessoas obesas no Brasil teve um aumento de 67,8%, o que nos mostra um aumento exponencial nas estatísticas. Em contrapartida, vemos que o consumo de frutas e verduras aumentou em 15,5% nos últimos 10 anos, o que demonstra um interesse da população em ter hábitos mais saudáveis (MS, 2019).

Na pesquisa científica o uso de modelos animais tem como objetivo reproduzir de forma experimental e controlada uma série de doenças ou fatores que acometem os seres humanos. Com o uso do modelo animal de obesidade pretendemos elucidar os mecanismos fisiopatológicos para assim entender os mecanismos fisiológicos entre outros acarretamentos relacionados aos diferentes tipos de dietas que levam os seres humanos a obesidade e buscar possíveis tratamentos e formas de prevenção para a obesidade.

Visto que, em sua grande maioria, todas as dietas utilizadas neste estudo quando analisadas na vida real dos seres humanos possuem altos níveis de alimentos industrializados, os quais possuem processamentos à grandes temperaturas, se torna necessário trazer para o estudo os efeitos que esse aquecimento pode acarretar

nas consequências já observadas no consumo destas dietas. Isso por que, sabemos que o processamento desses alimentos a altas temperaturas acarretam na formação de AGEs - *advanced glycation end products*) e também em produtos finais de lipoperoxidação avançada (conhecidos em inglês como ALEs - *advanced lipid peroxidation end products*) (Poulsen et al., 2013).

Devido a gama de fatores já estudados relacionando AGEs a diferentes patologias assim como a grande lacuna que ainda permanece aberta sobre assunto e sua extensa conexão com dietas vastamente difundidas pela população mundial, faz-se necessária uma maior atenção sobre a bioquímica e a nutrição destes compostos para assim elucidar os mecanismos associados a absorção e seus efeitos sobre a saúde dos humanos e animais de estimação.

Sendo assim, ao reunirmos todos os fatores aqui estudados, teremos uma visualização e dados ainda mais completos e aproximados à realidade humana sobre os diferentes estilos alimentares que podem levar à obesidade e suas consequências.

### **3 HIPÓTESE**

Seria o aquecimento de dietas obesogênicas um fator de agravamento ou alteração no estresse oxidativo induzido pela dieta, no status inflamatório, nos níveis de ansiedade e na inflamação de animais que consumissem estas dietas aquecidas?

## **4 OBJETIVO**

### **4.1 Objetivo geral**

- Analisar os diferentes efeitos das dietas com ou sem variações de aquecimento, sobre processos bioquímicos e comportamentais decorrentes do consumo das mesmas, verificando se o aquecimento pode gerar um índice maior de malefícios para indivíduos submetidos a elas do que os já causados pelas dietas não aquecidas.

### **4.2 Objetivo específico**

- Investigar parâmetros de estresse oxidativo em diferentes regiões do fígado e sangue dentre os diferentes grupos.
- Investigar parâmetros de inflamação e degeneração.
- Acompanhar mensalmente a evolução do quadro inflamatório, do perfil lipídico e da resistência à insulina nos animais das diferentes dietas.
- Quantificar os níveis de carboximetil-lisina em soro dos animais e também nas amostras das diferentes dietas para avaliar o conteúdo de AGEs.
- Verificar os efeitos diferenciais no equilíbrio redox (caso existam) decorrentes do aquecimento e não aquecimento das diferentes dietas em diferentes órgãos.
- Observar se existem mudanças comportamentais decorrentes dos tratamentos, tanto entre os diferentes tipos de dietas quanto entre aquelas aquecidas e não aquecidas.

- Avaliar se existe perda na capacidade cognitiva através de testes comportamentais (teste de reconhecimento de objetos; Campo aberto; Y-Maze).
- Avaliar o papel do aquecimento da dieta no desencadeamento da síndrome metabólica ligada à obesidade.
- Comparar se as dietas levam aos mesmos sintomas de uma dieta hipercalórica ou se as diferentes dietas geram diferentes efeitos devido aos seus diferentes conteúdos.

**PARTE II**



## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Animais

Neste trabalho foram utilizados ratos Wistar machos de 60 dias que foram fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL-UFRGS) e mantidos no biotério do departamento de Bioquímica da UFRGS, Campus saúde, sob condições padrão especificadas pelo *Guide for Care and Use of Laboratory Animals*, pelas diretrizes de bem-estar em animais de laboratório e de biossegurança em experimentação animal pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e de acordo com a Lei Federal n. 11794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o uso de animais em pesquisa. Os animais foram tratados com respeito e de forma humanitária pelos executores, sempre respeitando a resolução nº 879, de 15 de fevereiro de 2008, seguindo os três “R’s” (Replacement, Reduction e Refinement) da experimentação animal. Todos os profissionais envolvidos no projeto possuem experiência no manejo de animais de experimentação e possuem capacidade comprovada para exercer tal função.

O biotério onde os animais ficaram alojados dispõe de um veterinário, e possui condições de manter os animais de acordo com a espécie, garantindo que o espaço físico e as condições de higiene e saúde sejam respeitadas. A proteção contra predadores, vetores, vermes e outras pragas é garantida através de barreiras sanitárias apropriadas para cada tipo de alojamento e de modelo animal. As necessidades ambientais, como temperatura, iluminação, ventilação, interação social, higiene e controle de ruído e odor foram atendidas de acordo com a espécie. Os animais receberam nutrição adequada, não contaminada e de procedência

controlada, diariamente em quantidade e qualidade apropriadas para garantir sua saúde e bem-estar.

O trabalho foi realizado levando em consideração as normas estabelecidas pelo comitê de ética para pesquisa em modelos animais (CONCEA, 2016), levando em consideração a utilização do menor número de animais por grupo para manejo da dor e sofrimento durante os procedimentos do estudo e eutanásia. Todos os animais foram mantidos em caixas com ciclo claro-escuro (12h), com acesso a alimento e água *ad libitum*. Foram mantidos até quatro animais por caixa sendo essas caixas de propileno com as dimensões de comprimento x largura x altura = 41x34x17,8cm distribuídos em quatro animais por caixa e as mesmas foram limpas e trocadas três vezes por semana.

Espécie		Peso (g)	Área/Animal (cm <sup>2</sup> )	Altura (cm) <sup>A</sup>	Observações
<b>Camundongos</b>	<b>Em grupos<sup>B</sup></b>	<10	38,7	12,7	Animais maiores podem necessitar de maior espaço para adequado desenvolvimento.
		10 a 15	51,6	12,7	
		15 a 25	77,4	12,7	
		<25	>96,7	12,7	
	Fêmea com filhotes		300 (espaço para o grupo)	12,7	
<b>Ratos</b>	<b>Em grupos<sup>B</sup></b>	<100	109,6	17,8	Animais maiores podem necessitar de maior espaço para adequado desenvolvimento.
		100 a 200	148,35	17,8	
		200 a 300	187,05	17,8	
		300 a 400	258,0	17,8	
		400 a 500	387,0	17,8	
	>500	≥451,5	17,8		
Fêmea com filhotes		800 (espaço para o grupo)	17,8	Avaliar o modo de reprodução, pois pode haver variações no número de adultos e filhotes, tamanho e idade dos animais. <sup>C</sup>	
<b>Hamster<sup>C</sup></b>		<60	64,5	15,2	Animais maiores podem necessitar de maior espaço para adequado desenvolvimento.
		60 a 80	83,8	15,2	
		80 a 100	103,2	15,2	
		>100	≥122,5	15,2	
<b>Cobaio<sup>C</sup></b>		<350	387,0	17,2	Animais maiores podem necessitar de maior espaço para adequado desenvolvimento.
		350	≥651,5	17,8	

**(A)** Distância do assoalho ao topo da gaiola.

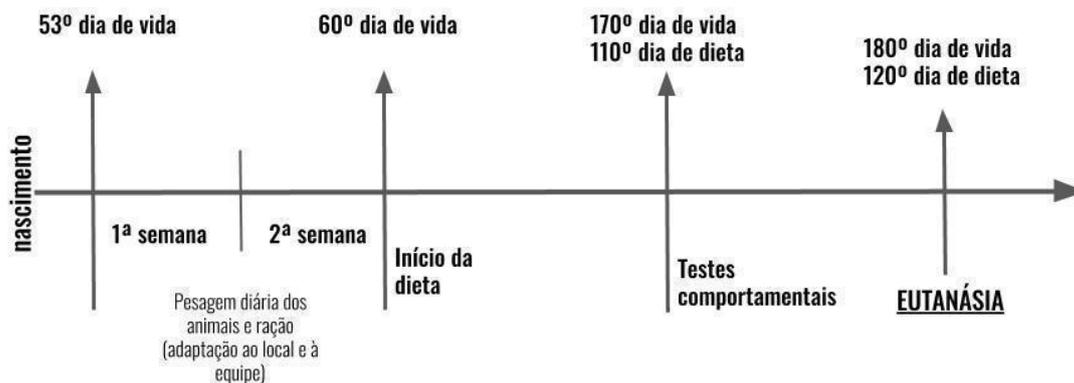
**(B)** Deve-se considerar as características de crescimento, tamanho do grupo e sexo dos animais; prever se haverá ganho de peso rápido sendo preferível proporcionar um espaço maior na expectativa futura de tamanho do animal, bem como considerar que roedores jovens são muito ativos e mostram aumento da brincadeira.

**(C)** Considerar possíveis eliminações seletivas de filhotes ou separação de ninhadas do grupo para permitir melhoramento, bem como segurança e bem-estar ao grupo. O espaço deve ser suficiente para que as mães e suas respectivas ninhadas consigam se desenvolver até o desmame, sem qualquer efeito prejudicial para ambos.

**Figura 4:** Recomendação de espaço mínimo para roedores alojados em grupos.

Fonte: E-BOOK Normativas do CONCEA (2016 – 3ª edição), disponível em: [E-book Normativas do CONCEA - 2016 -3a Edicao-1](#) .

### 5.1.1 Desenho experimental



**Figura 5:** Desenho experimental.

Após 53 dias de vida os ratos foram manipulados diariamente para se adaptarem à equipe (durante a manipulação os animais são pesados, bem como a ração que consomem), e ao completarem 60 dias se iniciou-se o tratamento. Após 110 dias de tratamento foram realizados testes comportamentais, e após 120 dias de tratamento os animais foram eutanasiados com então 180 dias de vida.

### 5.1.2 Cálculo do tamanho amostral

Foram necessários dez animais para cada grupo considerando o teste comportamental Water Maze (desvio padrão = 60; diferença mínima = 40; poder 80%) (Jeon et al., 2012). Podemos observar na literatura diversos estudos que avaliam o efeito de diferentes dietas, os quais apresentam um número amostral semelhante (Borges et al., 2013; de Assis et al., 2009; Higa et al., 2014; Jeon et al., 2012; Sampey et al., 2011; Woods et al., 2003; Yang et al., 2013). A escolha do n amostral foi também baseada na necessidade de fazer múltiplas análises em tecidos de baixo

rendimento, como por exemplo as estruturas do sistema nervoso central. Para estes tecidos (hipotálamos e hipocampo) foram separados 6 amostras das 10 coletadas para análises de estado redox e dano oxidativo e 4 para marcadores de neurodegeneração e inflamação. Visto que para este trabalho utilizaremos 06 grupos, foram necessários 60 animais.

## **5.2 Tratamento**

### **5.2.1 Dietas**

Animais com 60 dias de vida foram separados randomicamente em 07 grupos de 10 animais cada, os quais receberam diferentes dietas durante 16 semanas. A tabela 1 apresenta a descrição dos componentes de cada dieta.

1. Dieta controle (CHOW)
2. Dieta controle aquecida (HEATED CHOW)
3. Dieta rica em lipídios (HIGH FAT DIET)
4. Dieta rica em lipídios aquecida (HEATED HIGH FAT DIET)
5. Dieta de cafeteria padronizada (WESTERN DIET)
6. Dieta de cafeteria padronizada aquecida (HEATED WESTERN DIET)

	Componentes (g/Kg de ração)	CHOW	HFD	WD
<b>Proteína</b>	Proteína de soja	200	200	200
	<b>TOTAL</b>	<b>200</b>	200	<b>200</b>
<b>Lipídios</b>	Banha de porco*	0	335	200
	Óleo de soja	40	0	20
	<b>TOTAL</b>	<b>40</b>	<b>335</b>	<b>220</b>
<b>Carboidratos</b>	Amido de milho	550	235	170
	Açúcar	100	100	300
	<b>TOTAL</b>	<b>650</b>	<b>335</b>	<b>470</b>
<b>Outros componentes</b>	Sal (sódio)	5 (1,9)	5 (1,9)	20 (7,86)
	Fibras	50	50	30**
	Vitaminas	10	10	10
	Minerais****	35	35	35
	Colina bitartarato***	2,5	2,5	2,5
	Metionina	3	3	3
	Lisina	3	3	3
	<b>TOTAL EM GRAMAS</b>	<b>1001</b>	<b>1001</b>	<b>1001</b>

**Tabela 2:** Tabela nutricional.

\*100g de banha fornece 94 mg de colesterol.

\*\* Cordain (2005) e colaboradores atestam que o conteúdo ingerido de fibras nos EUA é metade do recomendado. Para animais o recomendado é cerca de 5% da dieta (AIN-93M).

\*\*\* Bitartarato de colina está presente no mix vitamínico.

\*\*\*\* O mix de minerais contém 5g de NaCl.

	CHOW	HFD	WD
Kcal/peso de ração	21%	15%	17%
	10%	60%	42,50%
	69%	25%	40,50%
<b>Total de Kcal/kg de ração</b>	<b>3760</b>	<b>5335</b>	<b>4660</b>

**Tabela 3:** Fontes das Kcal para cada dieta.

As dietas eram preparadas manualmente e trocadas três vezes por semana para evitar o desenvolvimento de mofo e/ou cheiros que pudessem ser desagradáveis aos animais. A formulação das dietas e a fonte de calorias estão descritas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. A dieta de cafeteria padronizada (WD) é composta de uma mistura que se assemelhe com a dieta de cafeteria não padronizada: 20% de proteína, 22% de gordura, 47% de carboidratos, 2% sal, 4% fibras e 5% de minerais, vitaminas e nutrientes essenciais, como previsto por Bortolin, R. C. *et al.*, 2018.

Para as dietas aquecidas, após a realização da mesma, o aquecimento foi realizado a 180°C por 35 min. Para verificar a formação de AGEs na dieta foram quantificados carboximetil-lisina através de técnica de ELISA.

## 5.3 Experimentos

### 5.3.1 Análise comportamental

Após 110 dias de administração da dieta, os animais foram submetidos a testes de aprendizado/memória conhecidos como teste de reconhecimento de objetos e Water Maze.

#### A) Teste de reconhecimento de objeto

O teste de reconhecimento de objeto foi, de forma resumida, realizado em uma arena de 40cm x 50cm cercada por paredes de 50cm de altura. O piso dessa arena foi dividido em 12 retângulos idênticos. Todos os animais foram submetidos previamente a uma sessão de habituação na arena onde eles ficaram livres para explorar a mesma livremente por 5 min. Nenhum objeto foi colocado na arena durante essa habituação. Foram utilizados como padrão de avaliação das atividades locomotoras e exploratórias o número de cruzamentos entre quadrantes e a frequência dos comportamentos do tipo *rearing*, respectivamente. Em diferentes tempos após a habituação de 5 min o treinamento foi conduzido, onde se posicionou o animal por 5 min no aparato com dois objetos idênticos posicionados em quinas adjacentes, os quais estavam a 10 cm de distância das paredes. Em um reconhecimento a curto prazo o teste de memória foi realizado 1,5 h após o treinamento e os animais foram posicionados na arena para explorá-la na presença de um objeto familiar e um desconhecido. Todos os objetos possuíam textura, cor e tamanhos similares, distinguindo-se apenas pela forma. Já em um reconhecimento a longo prazo o teste de memória foi realizado 24h após o treinamento. A exploração dos objetos foi considerada como farejar ou tocar o objeto com as narinas e/ou patas (Hammond et al., 2004).

**Modelo com grau abaixo do limiar inferior, segundo o guia de severidade dos procedimentos científicos da CEUA-UFRGS (2009).**

#### B) Teste de campo aberto

O teste comportamental conhecido como campo aberto é uma medida muito utilizada para analisar o comportamento exploratório e a atividade geral de ratos e

camundongos. Neste, tanto a qualidade quanto a quantidade da atividade realizada pelo animal podem ser medidas. Em resumo, o campo aberto é um recinto, geralmente quadrado, retangular ou circular com paredes que o circundam e impedem a fuga do animal nele contido. O resultado mais comumente observado é o de “movement”, entretanto, isso pode ser influenciado por motor output, exploratory drive, freezing (todos parâmetros a serem analisados) ou outros comportamentos relacionados ao medo, doenças, tempo relativo no ciclo circadiano, entre outras variáveis. A distância percorrida, o tempo corrido em movimento e a mudança na atividade ao longo do tempo estão também entre os parâmetros a serem tabulados e observados. Alguns resultados, particularmente a defecação, o tempo no centro e atividade nos primeiros 5 minutos avaliam alguns aspectos da emotividade, incluindo ansiedade. O teste campo aberto também é comumente usado como mecanismo de avaliação de efeitos sedativos, tóxicos ou estimulantes de diferentes compostos. Sendo assim, este teste mede uma série de facetas diferentes do comportamento, além da simples locomoção do animal. O mesmo possui vários usos e está incluído em quase todas as análises completas feitas sobre o comportamento de roedores (Gould, T. D., Dao, D. T., & Kovacsics, C. E., 2009).

**Modelo com grau abaixo do limiar inferior, segundo o guia de severidade dos procedimentos científicos da CEUA-UFRGS (2009).**

C) Teste Y-Maze

Embora o design deste experimento seja suficientemente básico, o Y-Maze (labirinto em Y) pode ser utilizado para avaliar a memória de curto prazo em camundongos. Neste teste, a alternância espontânea, que irá medir a memória de

trabalho espacial, pode ser avaliada ao permitir que os animais explorem livremente os três braços do labirinto, sendo este comportamento impulsionado pela curiosidade inata dos roedores em explorar áreas nunca visitadas. Um rato ou camundongo com boa memória de trabalho é considerado como aquele que lembrará os braços do labirinto que já visitou e mostrará uma tendência a entrar em um braço visitado de forma menos recente. Para que isto ocorra, é requerida a interação em diferentes regiões do cérebro, como o hipocampo e o córtex pré frontal, dependendo de seu funcionamento correto. O teste é realizado usando um labirinto em forma da letra Y com três braços opacos de cor clara orientados em ângulos de 120° um do outro. O animal é introduzido em uma determinada posição no labirinto e pode explorar os braços livremente por um curto período de tempo. Uma entrada é considerada quando os quatro membros do rato ou camundongo estão posicionados dentro de um dos braços do labirinto. Uma "alternância" é considerada quando ocorrem entradas consecutivas em todos os três braços. Sendo assim o número de entradas e de alternâncias dos braços são registrados para calcular a porcentagem do comportamento de alternância. Considera-se que uma alta porcentagem significa uma boa memória de trabalho, indicando que o animal lembra quais braços já visitou (Kraeuter, A. K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z., 2019).

**Modelo com grau abaixo do limiar inferior, segundo o guia de severidade dos procedimentos científicos da CEUA-UFRGS (2009).**

### **5.3.2 Eutanásia**

Ao término dos quatro meses (120 dias) de tratamentos os animais foram eutanasiados por decapitação com guilhotina e suas estruturas (cérebro, tecido adiposo, coração e fígado) foram isoladas, assim como o sangue que foi coletado

para as análises. Antes de ser estocado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , o sangue foi separado em soro e eritrócito. No encéfalo foram isoladas as seguintes estruturas: córtex, cerebelo, hipocampo e estriado.

Os animais foram eutanasiados em uma sala específica, um animal por vez, para assim minimizar o estresse dos mesmos devido ao odor e som dos outros animais. Eles foram sacrificados por decapitação com guilhotina para evitar qualquer tipo de interferência nos parâmetros bioquímicos de diferentes estruturas pela presença de anestésicos, visto que o uso de anestésicos pode afetar nas análises do SNC (Ward et al., 2012). Este é considerado um método sem recuperação, prevenindo sofrimento posterior ao animal. As carcaças dos animais foram devidamente encaminhadas dentro de sacos plásticos ao biotério do Departamento de Bioquímica, onde foram mantidos à  $-20^{\circ}\text{C}$  até a coleta pela empresa contratada responsável pelo descarte apropriado.

**Modelo sem recuperação, segundo guia dos procedimentos científicos da CEUA-UFRGS (2009).**

### **5.3.3 Perfil redox**

Foram utilizados para a realização destas análises os seguintes órgãos: fígado, córtex, hipocampo e hipotálamo, além do plasma e soro sanguíneo. Os órgãos foram separadamente homogeneizados em tampão fosfato (PBS 50mM) e sobre tais estruturas foram realizados os seguintes testes de estresse oxidativo: Grupamentos -SH total, carbonil e TBARs (Espécies reativas de ácido barbitúrico), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPx) e Superóxido dismutase (SOD). Estas técnicas foram utilizadas para avaliar o dano oxidativo a biomoléculas a partir da quantificação de marcadores de dano oxidativo a lipídios e proteínas.

### 5.3.3.1 Enzimas antioxidantes e de desintoxicação

#### A) Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi computada medindo a razão da diminuição da absorbância do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), utilizando um espectrofotômetro a 240nm (Aebi, 1984). Para realizar esta técnica as amostras foram homogeneizadas em PBS geral e mantidas à temperatura ambiente. Em uma placa de 96 poços foram então pipetados em torno de 10 uL de amostra, completando o volume para 195 uL com tampão CAT. O branco foi então lido a 240nm em espectrofotômetro e após foram pipetados 5 uL de peróxido de hidrogênio 1M em todos os pontos, os quais foram lidos em cinética com intervalos de leitura de 15s, totalizando 5 minutos. Após a leitura da absorbância foi usada a seguinte fórmula para estimar o valor final de unidades de CAT por mg de proteína:

$$\text{Unid CAT/mg prot} = \frac{(2,361 * \Delta \text{Abs})}{(\text{Abs}_{\text{inicial}} * \text{mg prot} * 0,67)}$$

#### B) Glutathione peroxidase (GPX)

Para determinar a atividade da GPx foi computada a taxa de oxidação de NADPH usando um espectrofotômetro a 340 nm na presença de glutathione reduzida, hidroperóxido de terc-butil e glutathione reductase, como descrito por Wendel, 1981. Para que isso ocorra o tecido foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 50mM e, conseqüentemente, as diluições do tecido foram padronizadas em tampão incubação. Em uma placa de 96 poços foram pipetados 20uL de amostra, 20uL de NADPH e os mesmos tiveram seu volume completado para 160 µL com tampão fosfato de potássio 20mM. A placa foi então pré-incubada a 37°C por 5 à 10 minutos. Posteriormente à incubação foram adicionados 10 µL de glutathione e 10 µL de

glutathione reductase e a placa foi lida em espectrofotômetro a 340 nm por 3 min (20 em 20 segundos) a 37 °C. Após esta leitura foram adicionados 20 µL de Tert-Butil Hidroperóxido e a placa foi novamente lida em 340 nm por 6 min (15 em 15 segundos).

Para a realização do branco foi feito o mesmo protocolo da amostra, porém o volume de amostra foi substituído por tampão fosfato de potássio. A taxa de decaimento da absorção do NADPH pela reação acoplada da GPx com a glutathione reductase indicando a atividade da GPx no tecido a partir da leitura das placas foi medida pela seguinte fórmula:

$$\text{umol NADPH/min/mg proteína} = \frac{(\Delta\text{Abs}_{1\text{min}}) \times 0,2 \times 1000}{6,22 \times 0,67 \times \text{prot (mg)}}$$

#### C) Superóxido dismutase (SOD)

A SOD foi computada a partir da inibição da auto-oxidação da adrenalina dependente de ânion superóxido, usando um espectrofotômetro a 480 nm, como descrito anteriormente por Misra & Fridovich, 1972. Para a realização da análise o tecido foi homogeneizado em PBS e centrifugado a 3.000g por 10 min. Em cada poço foram pipetados 5µL de catalase (CAT), realizando quadruplicatas de cada amostra com 5, 10, 15 e 20µL de amostra complementados, respectivamente, com 185, 180, 175 e 170 µL de tampão glicina, mantendo volume final do poço em 195 µL. Após este processo foram preparados poços para a auto oxidação da adrenalina, com 190 µL de tampão e 5 µL de CAT, e então a leitura dos brancos (sem adrenalina) foi realizada a 480nm por espectrofotometria. Consequentemente foram adicionados 5µL de adrenalina em todos os poços e a placa foi monitorada em leitor de placa durante 10 minutos de 10 em 10 segundos a 480nm a 32°C.

#### D) Glutathione s-transferase (GST)

Conhecidas como o principal grupo de proteínas solúveis no fígado, a Glutathione S-Transferase é o principal grupo de proteínas solúveis encontradas no fígado e possuem como principal função realizar a detoxificação de compostos eletrofílicos e podem ser encontradas na forma de xenobióticos ou geradas intracelularmente (Hayes & Pulford, 1995). Entre as importantes consequências de sua ação detoxificante se encontra a proteção contra estresse oxidativo, câncer e doenças degenerativas ligadas ao envelhecimento (Babbitt, 2000). A medida da atividade da GST foi feita conforme metodologia descrita por Habig et al. (1974) onde a atividade da enzima GST foi medida usando como substrato 1 cloro 2,4 dinitrobenzeno (CDNB) (SIGMA), preparado em etanol 80%. O experimento foi realizado com tampão fosfato de potássio 0,1 M e pH 6,5, na presença de 1mM de glutathione reduzida, 1mM de CDNB e 100 µL do extrato de fígado. A amostra utilizada para verificar a taxa de reações não enzimáticas foi parte da mistura porém sem adição da fração citosólica (controle). Para realizar correções nas medidas de absorbância da reação foi feita a subtração da absorbância na ausência da enzima (controle) e a variação da absorbância do substratos quando conjugado a glutathione foi monitorada usando um espectrofotômetro modelo GBC-UV 918.

Visto que, uma unidade de GST é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 umol do conjugado GSH/CDNB por minuto, a fórmula utilizada para estimar o valor final de GST foi:

$$U \text{ GST/mL: } \frac{\Delta 1 \text{ min} * V_{\text{poço}} * [ ] \text{ prot}}{5,3 * V_{\text{amostra}}}$$

### 5.3.3.2 Dano a macromoléculas

### E) TBARS (Espécies reativas de ácido barbitúrico)

Esta técnica foi utilizada como parâmetro de lipoperoxidação. As espécies reativas são quantificadas por uma reação ácida de aquecimento com ácido tiobarbitúrico, de acordo com Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. – *Methods in Enzymology* (1990). De maneira resumida, as amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato e centrifugadas a 3.000g por 10 min. Ao sobrenadante (100 uL) foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 15% (200 uL) e essa combinação foi então centrifugada a 10.000g por 10 min. O sobrenadante resultante foi então pipetado em uma placa de 96 poços e misturado a 100µL de solução ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%. Após ser pipetada também a curva que consiste em 1,1,3,3, tetrametoxipropano (TMP), água miliQ e TBA a placa foi coberta com tampa de silicone e incubada em banho seco (dry block) durante 20 min a 100°C. Após o resfriamento da placa, o conteúdo de TBARS foi determinado por sua absorvância em um espectrofotômetro a 532nm. Os cálculos utilizados para determinar o valor total de TBARS por mg de proteína foram:

$$\text{FCP} = \frac{\text{nmol TMP}}{\text{curva}} \quad \text{nmol no poço} = \frac{\text{ABS}}{\text{FCM}} \quad \text{nmol TBARS/mg prot} = \text{nmol no poço} * 3$$

Onde FCM é a medida da média de FCP, mg prot é referente à quantidade de proteína utilizada na técnica e o fator 3 considera a retirada de 1/3 de mostra (100 uL provenientes da reação 100 uL amostra + 200 TCA).

### F) Carbonil (Determinação de grupamentos carbonilados)

Carbonilação é um tipo de oxidação proteica que forma cetonas ou aldeídos reativos que podem reagir com 2,4 - dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar hidrazonas, como descrito por Levine RL em *Methods Enzymology* (1990). A

quantidade formada de hidrozonas das proteínas é quantificada espectrofotometricamente. Sendo assim, a quantificação de grupamentos carbonil foi então baseada em uma reação com DNPH, na qual, de maneira resumida, as proteínas são precipitadas pela adição de ácido tricloroacético 20%, centrifugadas a 4000 xg por 5 minutos e descartado o sobrenadante, de acordo com Levine RL, *et al.* (1990). O restante de amostra deve ser ressuspensionado em 100µL de NaOH 0,2 e depois adicionados 100µL de DNPH 10mM. Após incubação e adição de 100µL de TCA 20% e centrifugação a 16.000xg por 5 minutos devem ser realizadas 3 lavagens com etanol/acetato de etila (1:1). O material deverá então ser ressuspensionado com 1mL de uréia (8M pH 2,3) e centrifugado a 16.000xg por 4 minutos, para então poder ser transferido para uma placa de 96 poços. Desta forma, o conteúdo de grupamentos carbonil foi determinado por sua absorvância em um espectrofotômetro a 370nm. Após a leitura da absorvância foi usada a seguinte fórmula para estimar o valor final de carbonilas por mg de proteína:

$$\text{nmol de carbonil/mg proteína} = \frac{(\text{ABS}) * 67,84}{\text{mg proteína}}$$

#### G) Sulfidril (Grupamentos SH total [tiol reduzido])

Esta técnica foi utilizada para dosar grupamentos SH proteicos e não proteicos utilizando a reação entre os mesmos e Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) , de acordo com Ellman, G. L. (1959). Para a realização dos experimentos foi homogeneizada a amostra em PBS e posteriormente centrifugada a 3.000g por 10 min e coletado o sobrenadante. Deste sobrenadante foram utilizados de 30 uL a 80 uL os quais tiveram seu volume completado para 170 uL com PSB, 30 uL de tampão forte e 10 uL DTNB 10mM .a qual deve ser combinada com 30 µL de tampão forte, 10µL de DTNB 10mM. Nesta técnica foram utilizados dois brancos para controle, um

deles sendo formado de 170 uL de PBS, 35 uL de tampão forte e 10 uL PBS enquanto o outro era formado de 170 uL de PBS, 35 uL de tampão forte e 10 uL de DTNB 10mM. Essa placa foi então incubada por uma hora a temperatura ambiente e então lida em espectrofotômetro a 412 nm.

Após a leitura da absorbância foi usada o seguinte cálculo matemático para obter o valor final de SH:

$$\text{mol SH} = \frac{(\text{ABS amostra} - \text{Branco DTNB}) \times 0,00021}{9,434}$$

Onde, para expressar mol SH/mg proteína, o valor resultante foi dividido pela quantidade de proteína que foi utilizada no experimento.

Os resultados das absorbâncias computadas pelo espectrofotômetro após cada leitura foram então utilizados para a realização de diferentes cálculos e análises de acordo com o protocolo de cada técnica.

#### **5.3.4 Perfil inflamatório**

##### **A) E.L.I.S.A. KIT**

TNF- $\alpha$ , IL 6, leptina, resistina, adiponectina foram quantificadas a partir do soro dos animais através de kit comercial de ELISA de acordo com as recomendações do fabricante. Também por kit de ELISA foi analisado o perfil inflamatório do fígado, onde as amostras foram previamente homogeneizadas e diluídas para que obtivessem concentração final entre 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ .

##### **B) E.L.I.S.A. indireto**

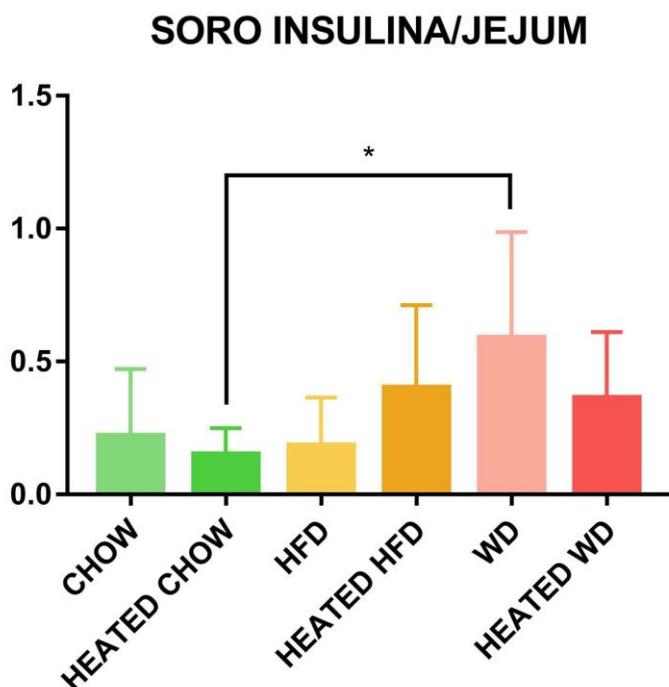
O conteúdo de carboximetil-lisina foi avaliado nas amostras de soro dos animais através da técnica de ELISA indireto. Esta técnica utiliza dois anticorpos, primário e secundário. Em resumo, a amostra foi primeiramente homogeneizada e diluída em tampão fosfato (PBS geral pH~7,4) para que tenha uma concentração final de proteína de 5 a 10 µg/mL. Esta diluição foi então pipetada (50 uL) em poços de uma placa específica para a técnica e o antígeno é adsorvido no poço. Logo foi feita a primeira lavagem e a amostra é então preparada com o anticorpo primário não marcado (este possui especificidade com o antígeno a ser detectado) e a mesma incubou por 2h à temperatura ambiente.

Caso o antígeno específico esteja presente na amostra, o anticorpo se ligará ao mesmo. Em seguida deve ser realizada uma lavagem com tampão de lavagem para retirar os anticorpos que não ligam ao antígeno de teste. Logo foi inserido o anticorpo secundário (este possui especificidade apenas para os anticorpos primários). Outra incubação se fez necessária. Se o anticorpo primário obteve sucesso ao se ligar ao antígeno, haverá uma ligação entre o anticorpo primário e secundário, o que irá então permitir a detecção do mesmo. Após serem adicionados 100 µL de *substrate solution* em cada poço, aguardados de 5 a 30 min para o desenvolvimento suficiente da cor e adicionados 100 uL de *stop solution* (2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a placa foi então lida a 450nm.

## 6 RESULTADOS

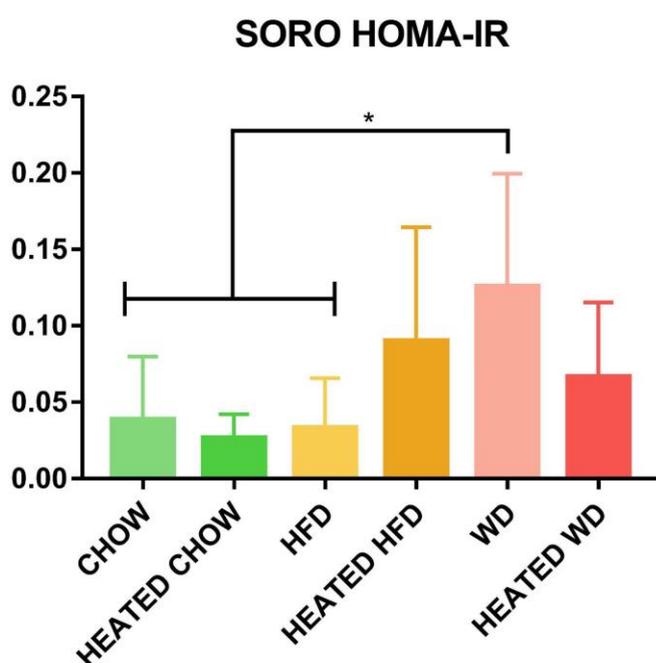
### 6.1 Perfil Inflamatório

Além da inflamação e diferentes hormônios secretados pelo tecido adiposo que podem estar elevados em um quadro de obesidade, diferentes estudos demonstram que, a partir de certo limiar, o indivíduo pode vir a desenvolver resistência à insulina (Sandu, O. et al, 2005). Devido a esses dados, foi realizada uma análise sérica dos animais em jejum. A análise de glicemia em jejum demonstrou resultados significativos entre o controle aquecido (HEATED CHOW) e a dieta WD, como podemos ver na Figura 6.



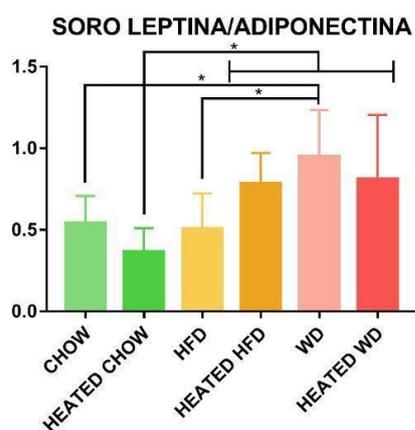
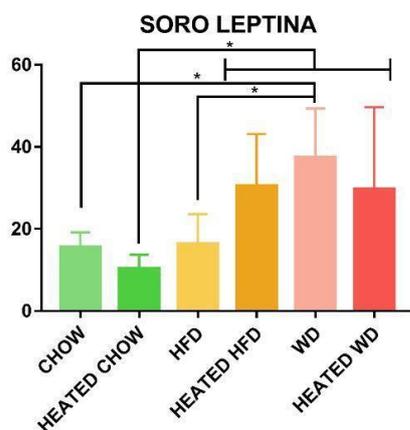
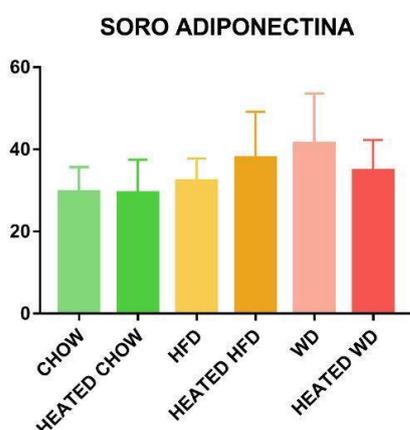
**Figura 6:** O gráfico representa a insulina sérica em jejum expressa em  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM (Standard error of the mean)  $n=8$ . Diferenças significativas são expressadas por \* (1-way ANOVA de múltiplas comparações).

Para observar de forma mais completa a possível resistência à insulina, realizamos também o teste de HOMA-IR, vastamente conhecido e utilizado com este propósito em seres humanos, auxiliando em possíveis diagnósticos de diabetes. A análise sérica realizada a partir da técnica HOMA-IR demonstrou resultados significativos entre as dietas controle (CHOW), controle aquecido (HEATED CHOW) e HFD para com a dieta WD, como indicado na figura 7.



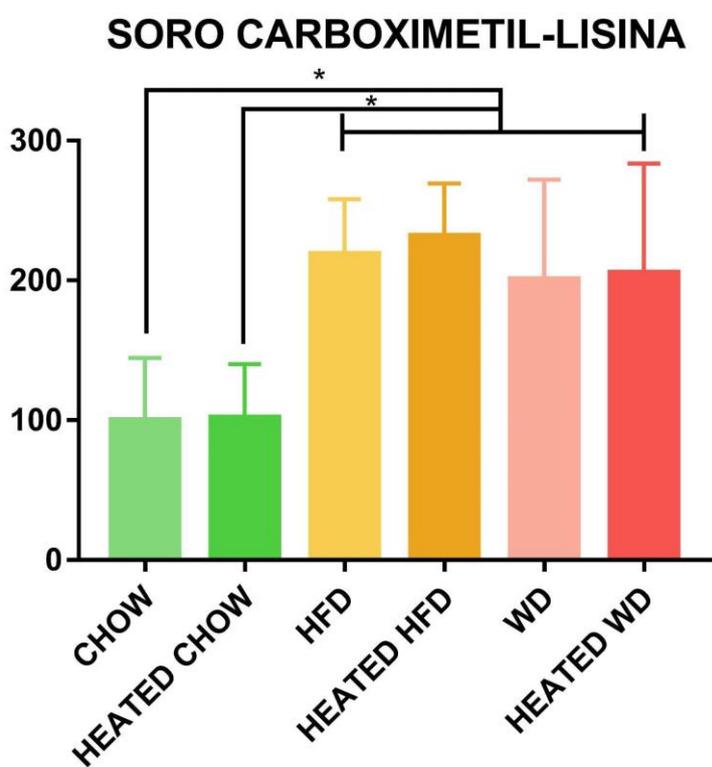
**Figura 7:** O gráfico representa a resistência à insulina medida pelo índice de avaliação do modelo homeostático de resistência à insulina (HOMA-IR). Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM (Standard error of the mean)  $n=8$ . Diferenças significativas são expressadas por \*, as quais são observáveis entre a dieta ocidental (WD) quando comparada com o controle (CHOW), quando comparada com o controle aquecido (HEATED CHOW) e quando comparada com a dieta rica em gordura (HFD) (1-way ANOVA de múltiplas comparações).

Foram realizadas análises de leptina e adiponectina, assim como o balanço das mesmas, com a finalidade de concebermos um melhor entendimento das substâncias secretadas pelo tecido adiposo desses animais e quais as diferenças entre cada tratamento diferente. A análise sérica de adiponectina não apresentou resultados significativos. Entretanto, a análise de leptina, assim como a razão leptina/adiponectina apresentaram resultados significativos entre a dieta controle (CHOW) e a dieta WD; entre a dieta controle aquecida (heated chow) e a dieta heated HFD, assim como as dietas WD e heated WD; e entre a dieta HFD e WD. Este resultado é apresentado na figura 8.

**A****B****C**

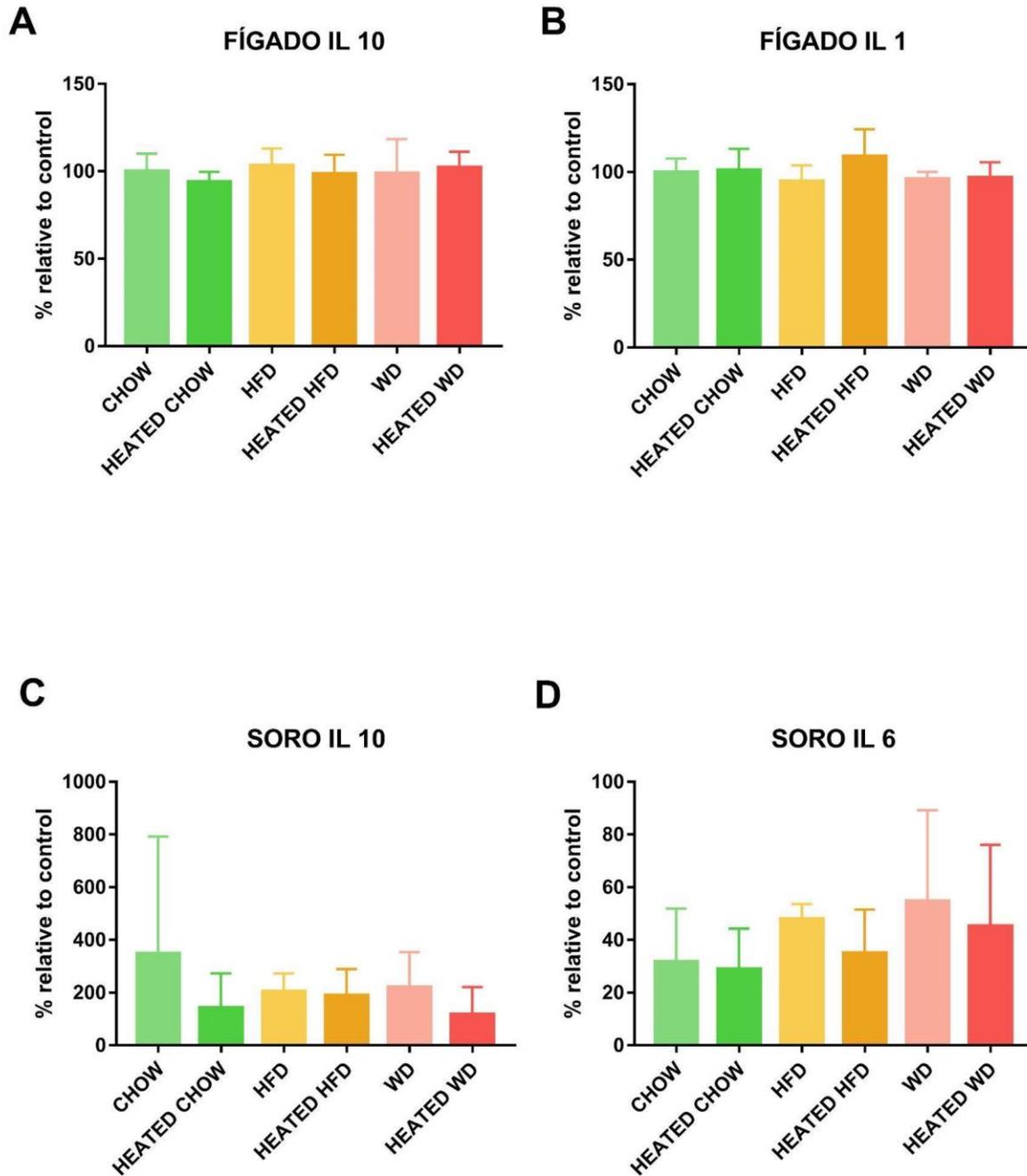
**Figura 8:** (A) O gráfico representa o equilíbrio entre as adipocinas de efeitos opostos, medido através da relação leptina/adiponectina. (B) O gráfico representa a leptina sérica em jejum expressa em  $\text{ng ml}^{-1}$ . (C) O gráfico representa a adiponectina sérica em jejum expressa em  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM (Standard error of the mean)  $n=9$ . Diferenças significativas são expressadas por \* (1-way ANOVA de múltiplas comparações).

Para lograr homogeneidad entre os ensaios e parâmetros analisados neste trabalho o último complemento do perfil inflamatório e um estudo que vem a conectar o mesmo com o perfil redox foi a realização de uma análise sérica de carboximetil-lisina, visto que a mesma, quando encontrada em valores altos, indica dano oxidativo a proteínas. Esta análise demonstrou resultados significativos entre a dieta controle (CHOW) e as dietas HFD, heated HFD, WD e heated WD; assim como o controle aquecido (HEATED CHOW), o qual demonstrou significância para com os mesmos grupos (HFD, HEATED HFD, WD e HEATED WD). O resultado pode ser visualizado na figura 9.



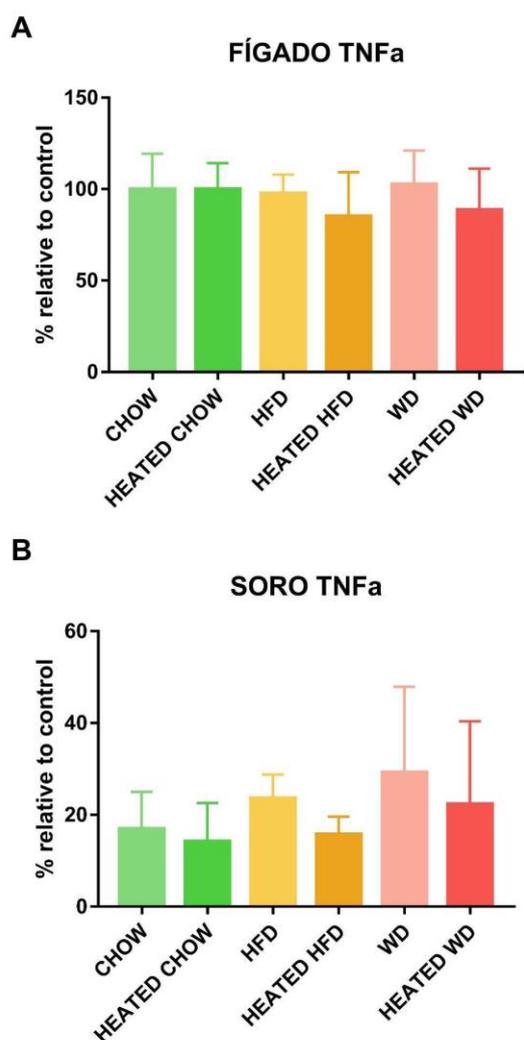
**Figura 9:** Avaliação dos produtos finais séricos de glicação avançada avaliados pelos níveis de Nε-carboximetil-lisina (% do controle). Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM (Standard error of the mean)  $n=8$ . Diferenças significativas são expressadas por \* (1-way ANOVA e múltiplas comparações).

Baseado em resultados expostos na literatura (Lee et al., 2013), previamente citados no item **1.1.1 Obesidade e sua relação com a inflamação e o desenvolvimento de outras doenças**, foram realizadas diferentes análises de marcadores pró e anti inflamatórios a fim de verificar possíveis respostas inflamatórias aos diferentes tratamentos. A partir de amostras séricas e hepáticas foram analisadas três diferentes interleucinas já bem descritas na literatura e usualmente aumentadas em quadros de obesidade. Dito isso, as análises hepáticas das interleucinas 10 e 1 assim como as análises a partir de soro das interleucinas 10 e 6 não apresentaram resultados significativos, como demonstrado na figura 10.



**Figura 10:** (A) e (C) Os gráficos representam as IL-10 do fígado e séricas (respectivamente) expressas em % relativa ao controle. (B) O gráfico representa as IL-1 séricas expressas em % relativa ao controle. (D) O gráfico representa as IL-6 séricas expressas em % relativa ao controle. Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM (Standard error of the mean)  $n=8$ . Diferenças significativas são expressadas por \* (1-way ANOVA e múltiplas comparações).

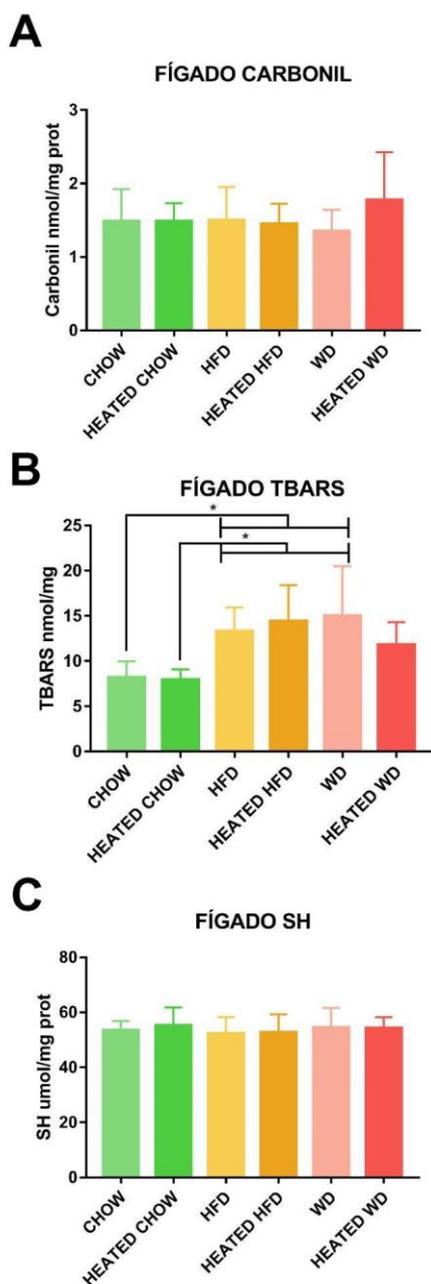
Para podermos observar o quadro inflamatório dos animais de forma mais completa foi também realizada uma análise hepática e sérica do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), considerada como uma citocina que possui propriedades pró inflamatórias e tende a estar presente no tecido adiposo de indivíduos obesos (Teixeira, C. S. L. , 2015). Diferentemente de outros resultados apresentados em diferentes estudos, neste trabalho as análises de TNF- $\alpha$  realizadas a partir do fígado e do soro dos animais não obtiveram resultados significativos (P valor fígado: 0.3590, soro: 0.2072), como podemos visualizar na figura 11.



**Figura 11:** (A) O gráfico representa TNF- $\alpha$  do fígado expresso em pg ml<sup>-1</sup>. (B) O gráfico representa TNF- $\alpha$  sérico expresso em pg ml<sup>-1</sup>. Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM (Standard error of the mean) n=8. (1-way ANOVA e múltiplas comparações)

## 6.2 Perfil Redox

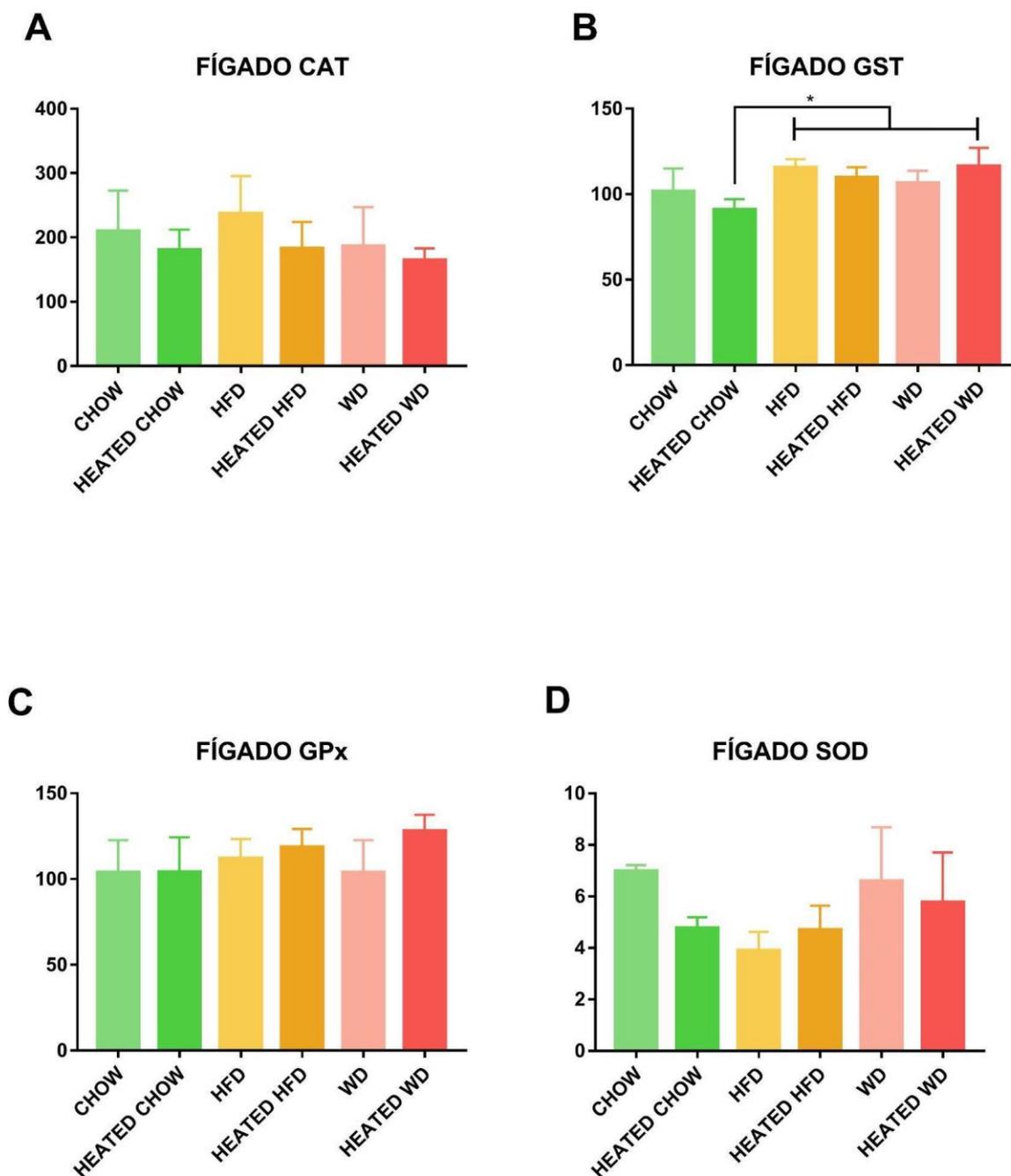
Foram realizadas 7 análises redox, para avaliar o estresse oxidativo e as atividades enzimáticas que poderiam ou não ter sido causadas pelos tratamentos. Ao analisarmos amostras do fígado dos animais submetidos às diferentes dietas, podemos verificar que as análises de carbonil e sulfidril, as quais, caso significativas, indicariam dano; não apresentaram resultados significativos. Em contrapartida, a análise de TBARS, que assim como as anteriores é representativa para estresse oxidativo na amostra (conforme explicação na seção 5.3.3 E), apresentou resultados significativos entre a dieta controle e HFD ( $p=0,0330$ ), heated HFD ( $p=0,0052$ ) e WD ( $p=0,0017$ ) assim como a dieta controle aquecida, a qual apresentou resultados significativos em relação aos mesmos grupos ( $p= 0,216$ ,  $p=0,0032$  e  $P=0,0010$ , respectivamente), como pode ser visto na figura 12.



**Figura 12:** (A) O gráfico representa a quantificação de grupamentos carbonila. (B) O gráfico representa a quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico. (C) O gráfico representa a quantificação de grupamentos SH total (tiol reduzido). Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM (Standard error of the mean)  $n=8$ . Diferenças significativas são expressadas por \* (1-way ANOVA e múltiplas comparações).

A fim de investigar não apenas os danos causados pelas diferentes dietas mas também a resposta fisiológica de defesa à elas, foram realizados quatro diferentes ensaios para verificar a resposta enzimática aos tratamentos. Para isso foi utilizado o fígado dos animais, a partir dos quais verificamos que as análises de CAT, GPx e SOD não apresentaram resultados significativos. Em contrapartida, a análise

de GST apresentou resultados significativos entre a dieta controle aquecida (Heated Chow) e HFD ( $p=0,0003$ ), heated HFD ( $p=0,0083$ ), WD ( $p=0,0399$ ) e heated WD ( $p=0,0002$ ), como pode ser visualizado na figura 13.

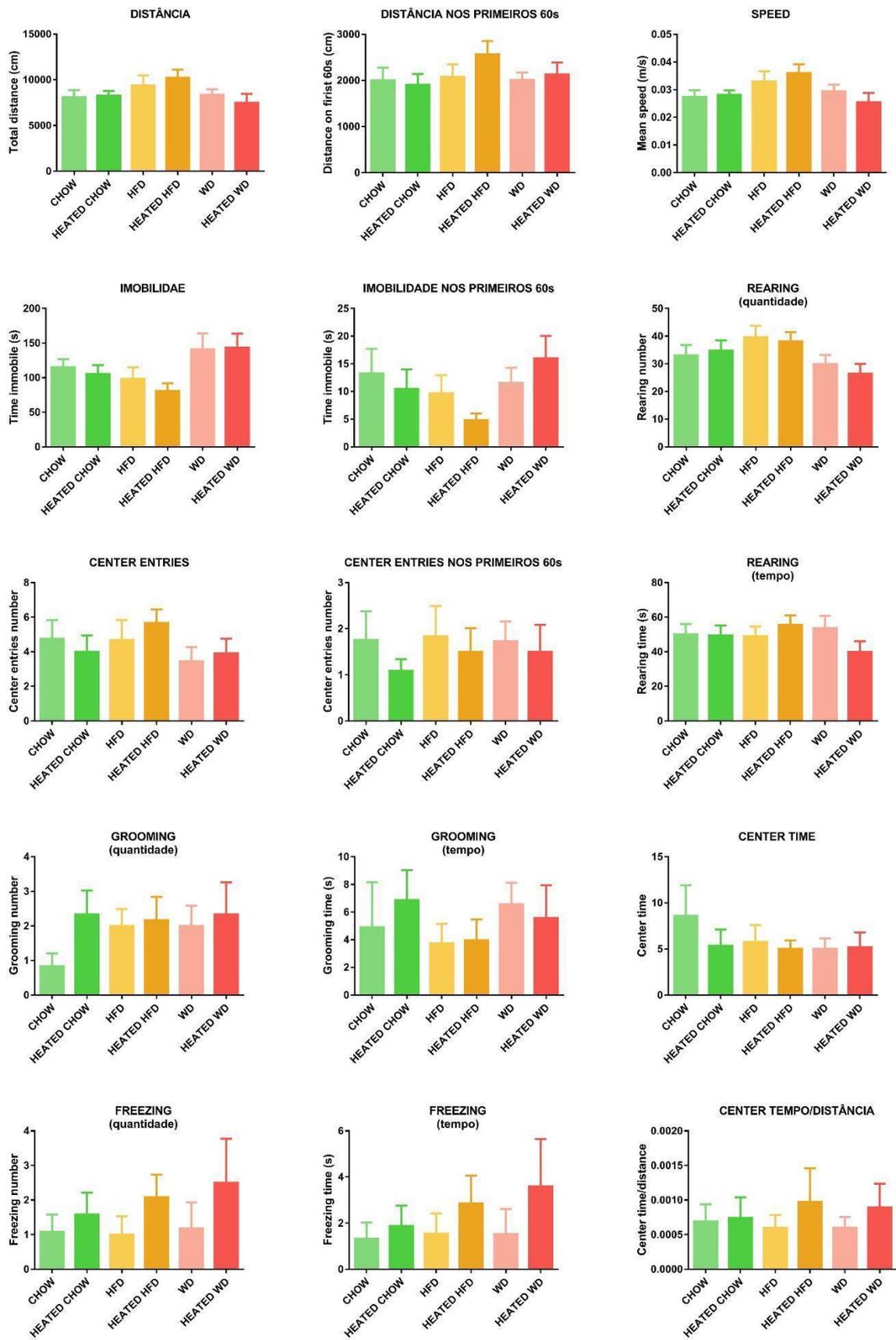


**Figura 13:** (A) Quantificação de catalase (CAT) medindo a razão da diminuição da absorbância do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). (B) Quantificação de glutathione s-

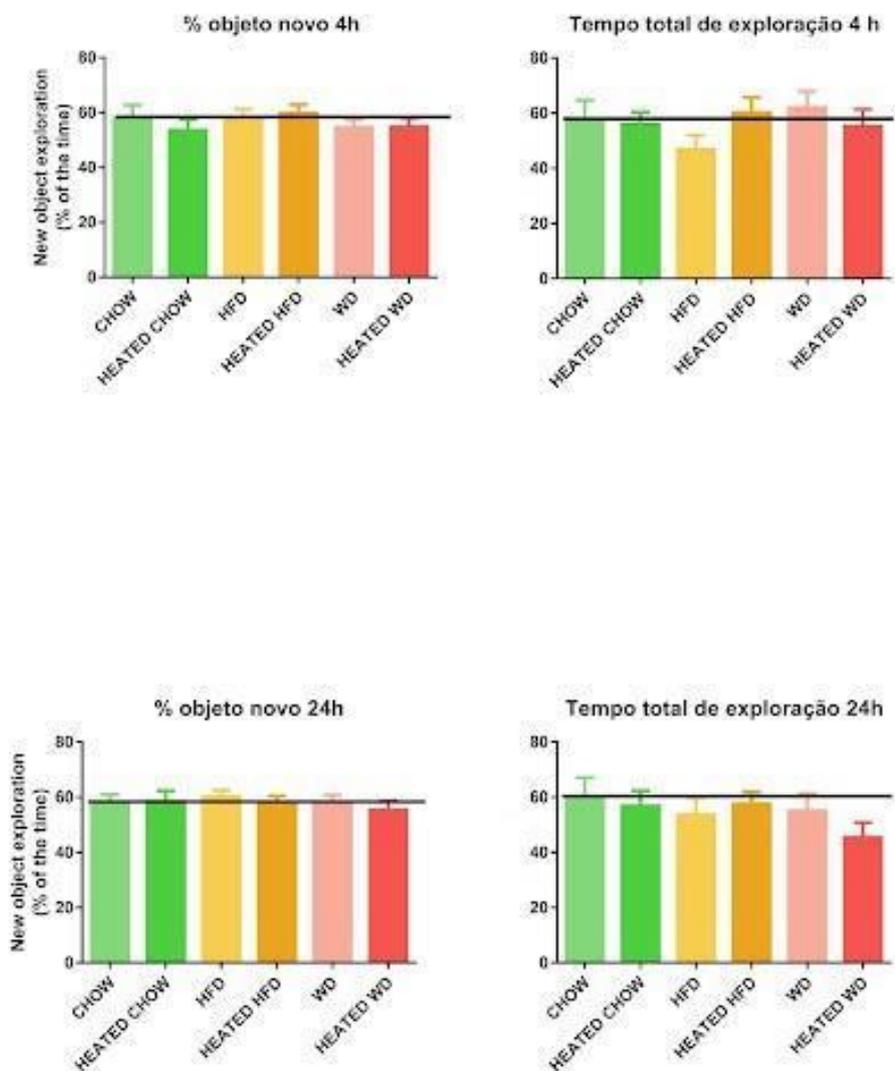
transferase. (C) Quantificação de glutathione peroxidase através da taxa de oxidação de NADPH. (D) Quantificação de superóxido dismutase. Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM (Standard error of the mean) n=6. Diferenças significativas são expressadas por \* (1-way ANOVA e múltiplas comparações).

### **6.3 Comportamento**

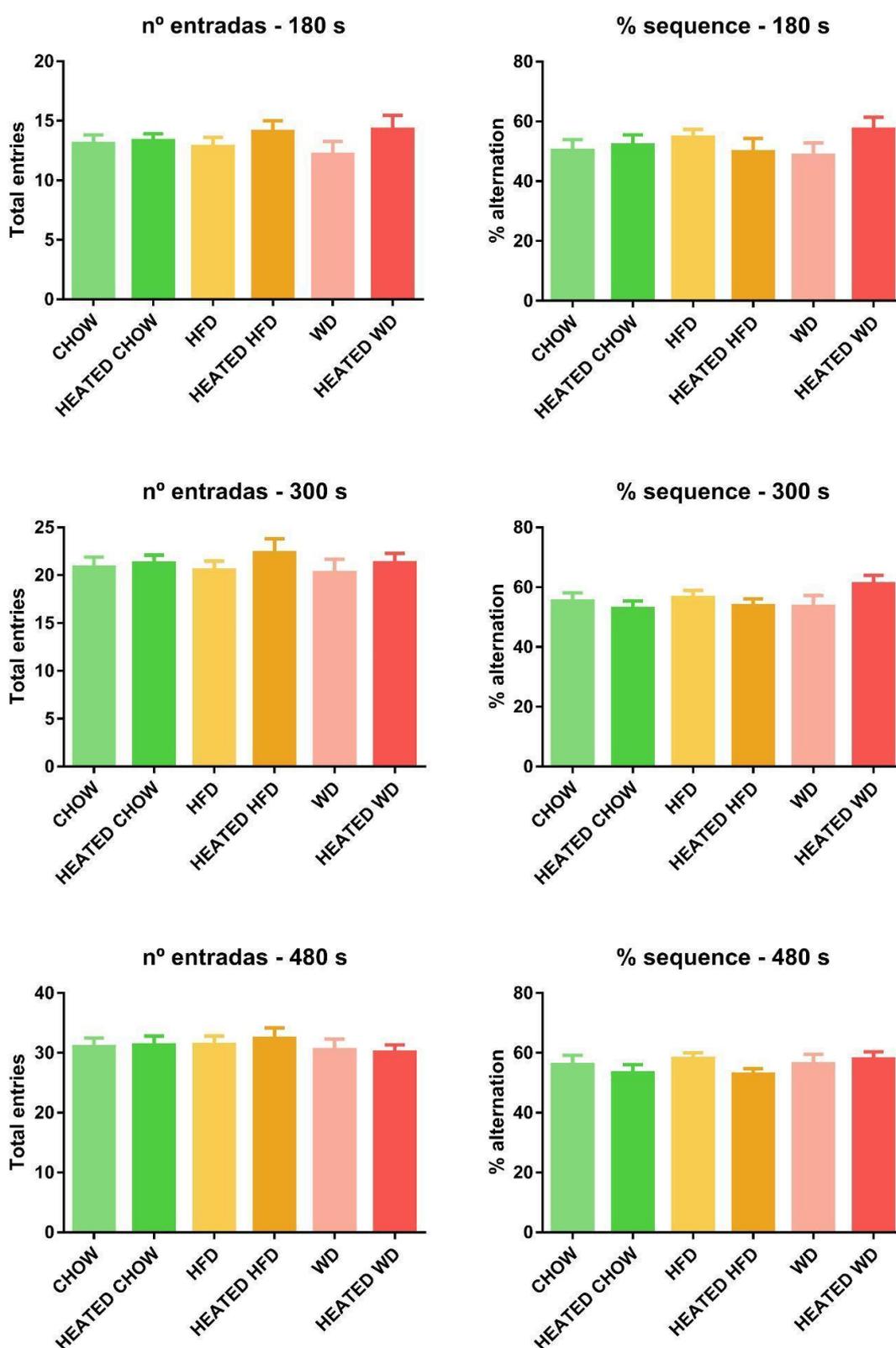
Devido à quantidade crescente de estudos correlacionando doenças degenerativas ao consumo excessivo de AGEs (Xu, X. Y. et al., 2017) e a obesidade à psicopatologias (Stunkard et al., 2003) realizamos também diversas análises comportamentais para verificar se seria, ou não, possível observar o transparecimento dessas alterações a partir do comportamento dos animais. Neste trabalho não observamos diferenças significativas comportamentais entre os diferentes grupos.



**Figura 14:** Resultados referentes ao teste comportamental em campo aberto. Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM (Standard error of the mean)  $n=12$ , Kruskal-Wallis.



**Figura 15:** Resultados referentes ao teste comportamental de reconhecimento de objetos. Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM (Standard error of the mean)  $n=12$ , Kruskal-Wallis.



**Figura 16:** Resultados referentes ao teste comportamental Y-Maze. Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM (Standard error of the mean)  $n=12$ , Kruskal-Wallis.

**PARTE III**

## 7 DISCUSSÃO

AGEs estão presentes em alimentos derivados de animais mesmo quando crus, mas sua quantidade irá aumentar à medida que ele for processado (principalmente através do aquecimento). Os processos de grelhar, assar, ferver, dourar e fritar são particularmente favoráveis para a formação de AGEs (Sharma, C. et al, 2015). Estes processos são, em geral indispensáveis para a preparação de produtos na indústria alimentícia nos dias de hoje, pois além de evitarem certas contaminações, também aumentam a palatabilidade do produto, modificando seu sabor, sua cor e aparência, aumentando seu prazo de validade e reduzindo a probabilidade de doenças que podem ser transmitidas por alimentos (Uribarri, J. et al, 2010). Além destes processos, diversos produtos comumente consumidos nas dietas modernas (como sopas enlatadas ou misturas secas) são ricos em açúcares e proteínas e sofrerem a reação de Maillard por serem processados a altas temperaturas, o que leva a uma rápida formação de AGEs (Koschinsky, T. et al, 1997).

Devido a esses importantes elementos para a maior produção de AGEs exógenos através da dieta fez-se importante a utilização da dieta padronizada Western Diet assim como a High Fat Diet para comparar os diferentes resultados entre a presença de AGEs em dietas mais ricas em açúcares e uma mais rica em gorduras assim como suas versões aquecidas, para a investigação de seus efeitos.

A dieta ocidental, aqui tratada como western diet (WD) (desenvolvida no Centro de Estudos de Estresse Oxidativo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul) foi, dentre diferentes dietas, avaliada como o modelo mais robusto para estudar obesidade (Bortolin, R. C. 2018). Nossos resultados demonstram que a dieta

apresentou efeitos diferenciais sobre os parâmetros aqui analisados, como por exemplo na medida de insulina, leptina, quantidades séricas de carboximetil-lisina e conteúdo de TBARS e GST em amostras hepáticas. É importante ressaltar, assim como exposto anteriormente na **tabela 2**, que esta dieta apresenta altos índices de açúcar e maiores níveis de gordura quando comparada com a dieta utilizada como controle, porém ainda apresentando um menor nível de gordura quando comparada com a HFD, a qual apresenta menor índice de açúcar. Outro fator diferencial da dieta é seu conteúdo fortemente aumentado de sal, e seu baixo conteúdo de fibras quando comparada com as outras duas dietas (controle e HFD).

AGEs tem despertado, na última década, o interesse da comunidade científica devido a diferentes evidências de que os mesmos podem ser vistos em maior quantidade durante o envelhecimento e diabetes, e foram diretamente ligados à fisiopatologia de várias doenças como catarata e aterosclerose (Henle, 2007). Visto que AGEs podem ser reconhecidos por diferentes receptores celulares e desencadear diferentes vias de sinalização relacionadas à inflamação e estresse oxidativo (Twarda-Clapa, A. et al., 2022), sendo também apontados como “boosters” nestes mesmos processos (Garay-Sevilla, M. E., et al., 2021), nosso trabalho buscou explorar as vias relacionadas à inflamação e o estabelecimento do dano oxidativo.

Outro aspecto importante relacionado ao quadro de obesidade ocasionado pelas diferentes dietas e conseqüentemente à formação de AGEs é a resistência à insulina, visto que a mesma e a desregulação de adipocinas são distúrbios metabólicos relacionados a obesidade (Martyn, Kaneki, & Yasuhara, 2008). Sendo assim, visto que a geração de estresse oxidativo e inflamação estão associadas de forma estreita à resistência à insulina, torna-se concebível a ideia de que o sistema

entre AGEs-RAGE possa desempenhar um papel importante na patogênia da resistência à insulina e o desenvolvimento da doença de diabetes (Unoki, H., & Yamagishi, S. I., 2008). Esta ideia é reforçada pela literatura a partir de estudos que demonstram que dietas com alto teor de gordura e ricas em AGEs aumentam o peso corporal e a gordura visceral e acabam por prejudicar a sensibilidade à insulina em indivíduos camundongos como descrito em Sandu, O. et al. (2005).

Devido a essa conexão entre a ingestão de AGEs e o desenvolvimento de resistência à insulina, esse foi um dos parâmetros analisados neste trabalho, com a utilização de dietas aquecidas e sua comparação com as não aquecidas. A determinação da glicemia em jejum dos animais dos diferentes grupos, comprova nossa hipótese quando relacionado à dieta WD, a qual piorou o parâmetro tendo resultados significativos quando comparada ao controle aquecido. No entanto, não observamos diferença significativa nos grupos aquecidos.

Este resultado (**Figura 6**) corrobora com a ideia de que apenas o consumo de uma dieta com maior conteúdo de AGEs exógenos, independentemente do aquecimento subsequente, já seria um fator suficiente para gerar alterações importantes nos parâmetros aqui analisados, visto que observamos significância apenas no grupo WD.

Complementar à análise de insulina em jejum, podemos ver na **figura 7** a análise de HOMA-IR (avaliação do modelo de homeostase da resistência à insulina), à qual é considerada uma técnica confiável para avaliar a resistência à insulina in vivo (L'heveder, R., & Nolan, T. 2013) (HOMA-IR), e é calculada a partir de uma única medição de insulina e glicose em jejum (Eslam, M., Kawaguchi, T. et al, 2011), esta abordagem nos demonstra um resultado mais completo do que a análise anterior.

A análise sérica dos diferentes grupos experimentais utilizando a técnica de HOMA-IR mostrou resultados significativos entre três grupos: controle (CHOW), controle aquecido (HEATED CHOW) e HFD para com a dieta WD. Estes resultados apontam, assim como a análise de insulina/jejum, para um nível alterado de insulina no grupo WD, novamente independente do aquecimento. Estes resultados são corroborados pela literatura quando analisada a conexão obesidade/resistência à insulina, a qual é vastamente estudada e elucidada por diferentes pesquisas (Ye, J. 2013), visto que, como já foi explicitado anteriormente, o modelo experimental WD gera obesidade nos animais submetidos a ela. Sendo assim, o resultado obtido por estas duas análises (jejum/insulina e HOMA-IR) demonstram uma possível resistência à insulina gerada, primariamente, pelo consumo da dieta WD.

Seguindo uma linha de raciocínio guiada pela literatura e diferentes estudos, assim como os resultados aqui encontrados, a hipótese de um quadro de obesidade e inflamatório assim como alterações glicêmicas gerando algum nível de resistência à insulina em conjunto ao fato de que não só a última (insulina) é aspecto importante relacionado à obesidade, mas também a desregulação das adipocinas são distúrbios metabólicos relacionados à esta doença (como foi previamente mencionado), tornou-se importante para este estudo a realização de uma análise das principais adipocinas, leptina e adiponectina. Vemos estes fatores alinhados com a literatura, a qual demonstra que adipócitos e macrófagos infiltrados no tecido adiposo ao liberarem adipocinas levam a um “estado sub-inflamatório crônico”, o qual pode desempenhar um papel central no desenvolvimento de diabetes do tipo 2, resistência à insulina e um aumento considerável no risco de doenças cardiovasculares associadas à obesidade (Antuna-Puente, B. et al, 2008).

Como podemos visualizar no **gráfico B** da **Figura 8**, na análise dos níveis de leptina observamos que a dieta WD apresentou níveis significativamente aumentados em relação ao controle CHOW, ao controle aquecido (heated chow) e ao grupo HFD, enquanto às dietas heated HFD e heated WD apresentaram aumento significativo em relação ao controle aquecido. Este resultado se repete no gráfico A da figura 8, representante da razão leptina/adiponectina. Sendo assim, mais uma vez podemos perceber o grupo de tratamento WD apresentando diferenças significativas para com diferentes grupos, porém, nesta análise podemos também observar que as dietas aquecidas tanto HFD como WD também apresentaram resultados significativos aumentados (quando comparadas com a dieta controle aquecida) sugerindo um aumento neste parâmetro tão vastamente correlacionado na literatura com a diabetes, entre outras doenças metabólicas (Guo, Z. et al, 2015).

Para visualizarmos a análise de leptina de forma correta, é importante ressaltar que, mesmo que atualmente saibamos que a leptina é o principal sinalizador em nosso sistema relacionado aos estoques de energia e que a mesma exerce efeitos de feedback negativo sobre a ingestão de energia (Panariello, F. et al, 2012), ao termos valores da mesma em quantidades anormais, o organismo irá responder a esse fator de forma diferente. A maioria dos indivíduos com obesidade induzida por dietas, segundo a literatura, desenvolve resistência à leptina, a qual é caracterizada por níveis elevados de leptina circulante e diminuição da sensibilidade à mesma (Pan, H., Guo, J., & Su, Z. 2014). Comprovando de forma empírica este fenômeno, estudos onde foi injetada leptina em indivíduos obesos, a mesma falha em realizar seu papel e desencadear uma reação de parada em relação à alimentação excessiva, mantendo-se os indivíduos obesos (Maffei, Á. et al, 1995). Este resultado debruça-se sobre diversos estudos que demonstram uma baixa significativa na

quantidade de leptina e um aumento da adiponectina ao consumir dietas com baixo conteúdo de AGEs e o efeito contrário ao consumir uma dieta rica em AGEs (Sohouli, M. H. et al, 2020).

Vemos também nesta análise que, ao aquecermos o controle, não obtemos uma significância tão acentuada como nos outros grupos, o que explica-se através do baixo conteúdo de gordura e açúcares na dieta, visto que são os mesmos que irão, principalmente quando aquecidos, gerar um alto número de AGEs. Este resultado conversa e corrobora com a hipótese deste trabalho, assim como com a literatura.

Outro fator a ser observado ainda no **gráfico B da figura 8**, é o fato de que percebe-se que este parâmetro apresenta-se deveras aumentado no grupo heated HFD quando em comparação com o HFD, enquanto entre WD e heated WD não vemos essa diferença tão acentuada. Este fator nos mostra mais uma vez que a WD é, por si só, danosa o suficiente para o organismo, ao não apresentar uma diferença tão significativa ao ser aquecida, enquanto a HFD sim. Esta diferença poderia se dar devido à diferença dos níveis de gordura entre as dietas, visto que HFD apresenta maior índice da mesma, enquanto WD apresenta menor índice de gordura e maior quantidade de açúcar. É importante ainda, mais uma vez, ressaltar que essa diferença não se vê tão acentuada nos grupos controle (chow e heated chow) devido ao baixo conteúdo de gorduras e açúcares dos mesmos e maior conteúdo de fibras.

Como foi citado anteriormente neste trabalho, a partir da literatura sabe-se que AGEs têm sido implicados em diversas vias de sinalização confluentes a estados inflamatórios assim como o envolvimento de AGEs em muitos processos fisiológicos e patológicos. Podendo, inclusive, serem elucidadas as vias pelas quais ocorre o

aumento dos estados inflamatórios e do estresse oxidativo dado pelos AGEs (Shen, C. Y., et al., 2020; Chaudhuri, J. et al., 2018; Dariya, B., & Nagaraju, G. P., 2020; Wautier, M. P. et al., 2001). Porém, em nossas análises os parâmetros inflamatórios possivelmente induzidos pelas dietas não encontramos diferenças significativas nos níveis de diferentes interleucinas anti e pró-inflamatórias assim como TNF-alfa, como podemos ver nas **figuras 10 e 11**.

Em contrapartida, dentre os marcadores de estresse oxidativo quantificados neste estudo para determinar quais poderiam ser alterados devido ao aquecimento das diferentes dietas, podemos ver que somente os níveis de espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) (**Figura 12-B**) demonstrou resultados significativos. No gráfico observamos um aumento no conteúdo total de TBARS nos grupos HFD, heated HFD e WD quando comparados com o controle e também um aumento nos mesmos grupos quando comparados com a dieta controle aquecida. Estes resultados corroboram a eficácia do modelo de dieta Western Diet já publicado por nós anteriormente (Bortolin, R. C. 2018) como um bom modelo indutor de danos oxidativos. Os resultados desta análise também sugerem que o aquecimento das dietas não foi um fator determinante no agravamento dos parâmetros induzidos pelas dietas em si, mas que os níveis de de macronutrientes presentes nas mesmas parecem ser mais significativos, como publicado anteriormente por Goldberg, T. et al. (2004), onde através de um estudo com diferentes tipos de gorduras, proteínas e carboidratos além de diversos tipos de aquecimento, os mesmos concluíram que “Existe uma clara relação entre o conteúdo de AGE e a composição de nutrientes. Assim, os alimentos ricos em lipídios e proteínas apresentam os maiores níveis de AGE.”.

Um fator relevante quando falamos sobre como os macronutrientes majoritariamente presentes em uma dieta podem alterar resultados de diferentes análises como as de estresse oxidativo, são os resultados obtidos analisando outros tipos de dieta e estes marcadores, para que possamos analisar se as mesmas resultam em dados diferentes. Em ensaios clínicos realizados com a dieta mediterrânea, a qual é conhecida por uma culinária baseada no uso de vegetais, frutas, cereais, nozes e legumes, a maioria deles cozidos com a adição de azeite de oliva, quantidades moderadas de peixe, frutos do mar ou laticínios e ingestão limitada de carne e álcool (Davis, C., Bryan, J., Hodgson, J., & Murphy, K., 2015), vemos resultados que demonstram as influências favoráveis dessa dieta no risco de síndrome metabólica, obesidade, diabetes mellitus tipo 2, câncer e doenças neurodegenerativas (Lăcătușu, C. M., et al, 2019). Enquanto, como já citado anteriormente, a dieta WD tende a piorar alguns destes quadros, é interessante comparar a composição das duas dietas. A dieta mediterrânea é pobre em gorduras saturadas e proteínas animais e rica em antioxidantes, fibras e gorduras monoinsaturadas, e exibe um equilíbrio adequado de ácidos graxos ômega-6/ômega-3, e a dieta ocidental (WD) é pobre em fibras, antioxidantes, vitaminas e minerais e rica em carboidratos (onde podemos ressaltar o açúcar), gorduras saturadas e sódio. Também corroborando a importância dos macronutrientes componentes de uma dieta com a produção de AGEs, Garay-Sevilla, M. E., et al., (2021) sugerem a dieta mediterrânea como modelo para a redução de AGEs provenientes da dieta (dAGEs), visto que a mesma fornece um baixo conteúdo de dAGEs, com a consequente redução de seus níveis circulantes e estresse oxidativo e inflamação em adultos idosos e pacientes com síndrome metabólica.

Outro parâmetro relacionado ao estresse oxidativo proveniente dos diferentes tratamentos que demonstrou resultados significativos foi a análise enzimática do conteúdo de glutathiona s-transferase. A análise de atividade da GST mostrou resultados significativamente aumentados entre a heated chow e HFD, heated HFD, WD e heated WD (**Figura 13-B**). Como já foi mencionado previamente no item **5.3.3.1 Enzimas antioxidantes e de detoxificação**, GST está envolvida na detoxificação celular de compostos eletrofílicos, sendo geradas intracelularmente ou encontradas na forma de xenobióticos e são o principal grupo de proteínas solúveis do fígado (HAYES & PULFORD, 1995). Sendo assim, os resultados significativos desta análise entre as diferentes dietas (HFD e WD) assim como suas versões aquecidas (heated HFD e heated WD) demonstram que, neste contexto alimentar, estas respostas de detoxificação estão ativadas.

Podemos também visualizar que, mesmo não apresentando diferenças significativas nas atividades, SOD e CAT apresentam uma redução não significativa nas atividades, onde a baixa atividade das mesmas pode estar prejudicando a metabolização de peróxido, não logrando realizar a limpeza de radicais produzidos na cadeia transportadora de elétrons. Porém, a falta de significância entre as diferenças nas atividades das enzimas em cada dieta e suas versões aquecidas nos leva a acreditar que o consumo das dietas ricas em gordura e/ou açúcar refinado e com baixo conteúdo de fibras por si só já seria o suficiente para alterar parâmetros relacionados a estresse oxidativo e gerar uma ativação diferenciado dos sistemas antioxidantes quando em comparação a uma dieta padrão mais saudável, não sendo necessário o alto aquecimento para observarmos esses resultados. Sendo assim, é importante ressaltar que, ainda assim, as dietas aquecidas também apresentam

maior atividade de glutathione s-transferase quando em comparação com a dieta controle aquecida.

Estes dados, tanto de danos oxidativos quanto de atividades enzimáticas, apresentam resultados similares, sugerindo que as dietas utilizadas neste estudo, principalmente WD, podem ativar as defesas enzimáticas do organismo, no entanto esta ativação não é o bastante para proteger totalmente o organismo, gerando danos residuais ao mesmo, assim como também observamos nas suas versões aquecidas.

Uma última análise se fez necessária para gerar maior coesão entre as análises realizadas neste estudo, o qual foi a determinação do conteúdo de carboximetil-lisina nos diferentes grupos aqui analisados. Esta análise foi feita devido ao fato de que AGEs acabam por se formar quando compostos carbonílicos reagem com um grupo  $\epsilon$ -amino da lisina e o grupo guanidino da arginina para então poder formar estruturas como N $\epsilon$ -(carboximetil)lisina, N $\epsilon$ -(carboxietil)lisina e hidroimidazolonas (Ames, J. M., 2008). Sendo assim, podemos usar N $\epsilon$ -(carboximetil)lisina como um marcador para AGEs, tendo uma análise mais direta, para além das consequências causadas pelos AGEs, mas também observando sua presença.

Os resultados desta análise corroboram nossa hipótese inicial de que os grupos experimentais HFD e WD juntamente com suas versões aquecidas iriam proporcionar uma alta formação de AGEs quando comparados com o grupo controle, inclusive quando comparados com o controle aquecido, devido à diferença de macronutrientes presentes nas dietas dos diferentes grupos aqui analisados. Na **figura 9**, podemos então observar essa diferença significativa, onde a dieta controle (CHOW) apresentou diferenças no parâmetro elucidado quando comparada com as

dietas HFD, heated HFD, WD e heated WD; assim como o controle aquecido (HEATED CHOW), o qual demonstrou diferença significativa para com os mesmos grupos (HFD, HEATED HFD, WD e HEATED WD). Sendo assim, podemos observar que, não só as dietas HFD e WD resultaram em uma maior formação de AGEs devido ao seu conteúdo, mas também o aquecimento das mesmas manteve esta diferença quando comparadas com o controle aquecido. Este fator elucidado também que, o aquecimento por si só de uma dieta que não seja constituída por macronutrientes altamente geradores da reação de Maillard, não será fator essencial e suficiente para gerar maior dano oxidativo ao organismo que a consome e tão pouco aumentar a produção de AGEs quando comparada com uma dieta rica em macronutrientes precursores de AGEs sendo ela aquecida ou não.

## 8 CONCLUSÃO

Este trabalho procurou, durante o tratamento realizado, acompanhar a evolução do quadro inflamatório, do perfil lipídico e da resistência à insulina nos animais, assim como observar se existiriam mudanças comportamentais e cognitivas decorrentes dos tratamentos. Também, a partir de amostras coletadas, era tido como objetivo inicial investigar parâmetros de inflamação e degeneração. Estes objetivos foram alcançados através de diferentes análises bioquímicas e comportamentais previamente apresentadas, nas quais demonstrou-se haver um aumento nos níveis de insulina e leptina quando consumidas as dietas HFD e WD, assim como suas versões aquecidas. No entanto, quando observamos o comportamento e marcadores de inflamação, não foram encontradas diferenças significativas. Assim, estes resultados confirmam parcialmente nossa hipótese e estão de acordo com diferentes estudos já publicados e discutidos anteriormente ao decorrer desta dissertação.

Investigar parâmetros de estresse oxidativo em diferentes órgãos e então analisar os resultados entre tratamentos foi outro objetivo que este trabalho logrou alcançar ao realizar um perfil redox através de diferentes análises de danos a macromoléculas e de enzimas antioxidantes e de desintoxicação. Estas análises, assim como as citadas no parágrafo anterior, também nos demonstraram índices de danos e enzimas antioxidantes aumentados nas dietas HFD e WD não aquecidas e aquecidas, andando em paralelo com nossa hipótese inicial.

Ainda, este estudo procurou avaliar o papel do aquecimento das dietas no desencadeamento da síndrome metabólica ligada à obesidade, observando de forma integrada todos os parâmetros analisados fazendo um comparativo entre os resultados das dietas não aquecidas com as dietas aquecidas de forma pareada e

não pareada. Foi possível assim, ao analisar nossos resultados de forma conjunta, visualizar que a dieta ocidental (WD) foi capaz de alterar os parâmetros antes mesmo de sofrer aquecimento, sendo este um fator não decisivo para que essas alterações ocorram.

Acredita-se que mais estudos sejam necessários para que possamos desvendar mecanismos ainda não completamente elucidados que guardam diferentes chaves para entender de forma completa não só a relação causa/efeito quando se trata de alimentação e suas consequências, mas todos os fatores e cascatas bioquímicas ativadas para que o organismo chegue ao resultado final.

## REFERÊNCIAS

Abdel-Salam, O. M., Sleem, A. A., & Shafee, N. (2014). Hepatoprotective effects of Cynara extract and silymarin on carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats. *Comparative Clinical Pathology*, 23(3), 709-716.

Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. In *Methods in Enzymology* (Vol. 105, pp. 121- 126): Academic Press.

Aksu, Ö., & Altinterim, B. (2013). Hepatoprotective effects of artichoke (*Cynara scolymus*). *Bilim ve Genclik Dergisi*, 1(2), 44-49.

Ames, J. M. (2008). Determination of Nε- (Carboxymethyl) lysine in foods and related systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1126(1), 20-24.

Anguizola, J., Matsuda, R., Barnaby, O. S., Hoy, K. S., Wa, C., DeBolt, E., ... & Hage, D. S. (2013). Glycation of human serum albumin. *Clinica chimica acta*, 425, 64-76.

Antuna-Puente, B., Feve, B., Fellahi, S., & Bastard, J. P. (2008). Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes & metabolism*, 34(1), 2-11.

Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. D. C. G., De Paula, S. O., Minim, V. P. R., & Bressan, J. (2010). Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de nutrição*.

Bierhaus, A., Hofmann, M. A., Ziegler, R., & Nawroth, P. P. (1998). AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovascular research*, 37(3), 586-600.

Bondia-Pons, I., Ryan, L., & Martinez, J. A. (2012). Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *Journal of physiology and biochemistry*, 68(4), 701-711.

Borges, M.C., Vinolo, M.A.R., Nakajima, K., de Castro, I.A., Bastos, D.H.M., Borelli, P., Fock, R.A., Tirapegui, J., Curi, R., Rogero, M.M., 2013. The effect of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on metabolic and inflammatory parameters in high-fat diet-fed Wistar rats. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 64, 561–9.

Bortolin, R. C., Vargas, A. R., de Miranda Ramos, V., Gasparotto, J., Chaves, P. R., Schnorr, C. E., ... & Grunwald, M. S. (2019). Guarana supplementation attenuated obesity, insulin resistance, and adipokines dysregulation induced by a standardized human Western diet via brown adipose tissue activation. *Phytotherapy Research*, 33(5), 1394-1403.

Bortolin, R. C., Vargas, A. R., Gasparotto, J., Chaves, P. R., Schnorr, C. E., Martinello, K. B., ... & Moreira, J. C. F. (2018). A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and

cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. *International Journal of Obesity*, 42(3), 525-534.

Bortolin, Rafael Calixto. Desenvolvimento de uma nova dieta indutora de obesidade e avaliação do potencial do guaraná (*Paullinia cupana*) como agente terapêutico no tratamento da obesidade e síndromes associadas. 2018. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

Cai, W., He, J. C., Zhu, L., Chen, X., Zheng, F., Striker, G. E., & Vlassara, H. (2008). Oral glycotoxins determine the effects of calorie restriction on oxidant stress, age-related diseases, and lifespan. *The American journal of pathology*, 173(2), 327-336.

Chaudhuri, J., Bains, Y., Guha, S., Kahn, A., Hall, D., Bose, N., ... & Kapahi, P. (2018). The role of advanced glycation end products in aging and metabolic diseases: bridging association and causality. *Cell metabolism*, 28(3), 337-352.

Chen, Y., & Guo, T. L. (2021). Dietary advanced glycation end-products elicit toxicological effects by disrupting gut microbiome and immune homeostasis. *Journal of Immunotoxicology*, 18(1), 93-104.

Chung, H. Y., Cesari, M., Anton, S., Marzetti, E., Giovannini, S., Seo, A. Y., ... & Leeuwenburgh, C. (2009). Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing research reviews*, 8(1), 18-30.

Clarke, R. E., Dordevic, A. L., Tan, S. M., Ryan, L., & Coughlan, M. T. (2016). Dietary advanced glycation end products and risk factors for chronic disease: a systematic review of randomised controlled trials. *Nutrients*, 8(3), 125.

Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. (2015). Normativas do Concea para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: lei, decreto, portarias, resoluções normativas e orientações técnicas.

Cordain, L., Eaton, S.B., Sebastian, A., Mann, N., Lindeberg, S., Watkins, B. a, O'Keefe, J.H., Brand-Miller, J., 2005. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 341–54.

D'Hooge, R., & De Deyn, P. P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain research reviews*, 36(1), 60-90.

Da Silva Bittencourt, L., Zeidán-Chuliá, F., Yatsu, F.K.J., Schnorr, C.E., Moresco, K.S., Kolling, E.A., Gelain, D.P., Bassani, V.L., Moreira, J.C.F., 2014. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) Prevents  $\beta$ -Amyloid Aggregation, Generation of Advanced Glycation-end Products (AGEs), and Acrolein- Induced Cytotoxicity on Human Neuronal-Like Cells. *Phytother. Res.*

Dariya, B., & Nagaraju, G. P. (2020). Advanced glycation end products in diabetes, cancer and phytochemical therapy. *Drug Discovery Today*, 25(9), 1614-1623.

Davis, C., Bryan, J., Hodgson, J., & Murphy, K. (2015). Definition of the Mediterranean diet: a literature review. *Nutrients*, 7(11), 9139-9153.

De Assis, A.M., Rieger, D.K., Longoni, A., Battu, C., Raymundi, S., da Rocha, R.F., Andrezza, A.C., Farina, M., Rotta, L.N., Gottfried, C., Gonçalves, C. a, Moreira, J.C., Perry, M.L.S., 2009. High fat and highly thermolyzed fat diets promote insulin resistance and increase DNA damage in rats. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 234, 1296–304.

Del Rio, D., Morales, L., Ruiz-Gayo, M., & Del Olmo, N. (2016). Effect of high-fat diets on mood and learning performance in adolescent mice. *Behavioural brain research*, 311, 167-172.

Dhibi, M., Brahmi, F., Mnari, A., Houas, Z., Chargui, I., Bchir, L., ... & Hammami, M. (2011). The intake of high fat diet with different trans fatty acid levels differentially induces oxidative stress and non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. *Nutrition & metabolism*, 8(1), 65.

Dulloo, A. G., & Miller, D. S. (1986). The thermogenic properties of ephedrine/methylxanthine mixtures: animal studies. *The American journal of clinical nutrition*, 43(3), 388-394.

Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, 82(1), 70-77.

Eslam, M., Kawaguchi, T., Del Campo, J. A., Sata, M., Abo- Elneen Khattab, M., & Romero- Gomez, M. (2011). Use of HOMA- IR in hepatitis C. *Journal of viral hepatitis*, 18(10), 675-684.

Esmailzadeh, A., Kimiagar, M., Mehrabi, Y., Azadbakht, L., Hu, F. B., & Willett, W. C. (2007). Dietary patterns, insulin resistance, and prevalence of the metabolic syndrome in women. *The American journal of clinical nutrition*, 85(3), 910-918.

Espinola, E. B., Dias, R. F., Mattei, R., & Carlini, E. A. (1997). Pharmacological activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. *Journal of ethnopharmacology*, 55(3), 223-229.

Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. (1990). [42] Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 407-421). Academic Press.

Feijó, G. D. S. (2019). Efeitos da suplementação de aminoácidos de cadeia ramificada ou zinco nos parâmetros neuroinflamatórios e de memória de ratos obesos.

Foltz, C., Carbone, L., DeLong, D., Rollin, B. E., Van Loo, P., Whitaker, J., & Wolff, A. (2007). Considerations for determining optimal mouse caging density. *Lab Animal*, 36(10), 40.

França, B. K., Alves, M. R. M., Souto, F. M. S., Tiziane, L., Boaventura, R. F., Guimarães, A., & Alves Jr, A. (2013). Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. *GE jornal português de gastroenterologia*, 20(5), 199-206.

Fredholm, B. B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A., & Zvartau, E. E. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological reviews*, 51(1), 83-133.

Freeman, L. R., Zhang, L., Nair, A., Dasuri, K., Francis, J., Fernandez-Kim, S. O., ... & Keller, J. N. (2013). Obesity increases cerebrocortical reactive oxygen species and impairs brainfunction. *Free Radical Biology and Medicine*, 56, 226-233.

Fung, T. T., Rimm, E. B., Spiegelman, D., Rifai, N., Tofler, G. H., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2001). Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular disease risk. *The American journal of clinical nutrition*, 73(1), 61-67.

Gajda, A. M. (2009). High fat diets for diet-induced obesity models. *J Res Diets*.

Gajda, A. M., Pellizzon, M. A., Ricci, M. R., & Ulman, E. A. (2007). Diet-induced metabolic syndrome in rodent models. *Animal Lab News*, 74, 775-793.

Garay-Sevilla, M. E., Rojas, A., Portero-Otin, M., & Uribarri, J. (2021). Dietary AGEs as exogenous boosters of inflammation. *Nutrients*, 13(8), 2802.

Ghareeb, D. A., Hafez, H. S., Hussien, H. M., & Kabapy, N. F. (2011). Non-alcoholic fatty liver induces insulin resistance and metabolic disorders with development of brain damage and dysfunction. *Metabolic brain disease*, 26(4), 253.

Gill, V., Kumar, V., Singh, K., Kumar, A., & Kim, J. J. (2019). Advanced glycation end products (AGEs) may be a striking link between modern diet and health. *Biomolecules*, 9(12), 888.

Goldberg, T., Cai, W., Peppia, M., Dardaine, V., Baliga, B. S., Uribarri, J., & Vlassara, H. (2004). Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 104(8), 1287-1291.

Gould, T. D., Dao, D. T., & Kovacsics, C. E. (2009). The open field test. *Mood and anxiety related phenotypes in mice*, 1-20.

Guillen-Sans, R., & Guzman-Chozas, M. (1998). The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 38(4), 315-350.

Guo, Z., Huang, D., Tang, X., Han, J., & Li, J. (2015). Correlation between advanced glycation end-products and the expression of fatty inflammatory factors in type II diabetic cardiomyopathy. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 15(4), 15.

Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.

Hammond, R. S., Tull, L. E., & Stackman, R. W. (2004). On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiology of learning and memory*, 82(1), 26-34.

Hayes, J. D., & Pulford, D. J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part I. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 30(6), 445-520.

He, C., Sabol, J., Mitsuhashi, T., & Vlassara, H. (1999). Dietary glycotoxins: inhibition of reactive products by aminoguanidine facilitates renal clearance and reduces tissue sequestration. *Diabetes*, 48(6), 1308-1315.

Heidari, F., Rabizadeh, S., Rajab, A., Heidari, F., Mouodi, M., Mirmiranpour, H., ... & Nakhjavani, M. (2020). Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products levels are correlates of duration of type 2 diabetes. *Life sciences*, 260, 118422.

Heyns, K., & Beilfuss, W. (1970). Ketosylamine rearrangement of D-threo-pentulose (D-xylulose) with alpha-amino acids. *Chemische Berichte*, 103(9), 2873-2876.

Higa, T. S., Spinola, A. V., Fonseca-Alaniz, M. H., Sant, F., & Evangelista, A. (2014). Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*, 6(1), 47.

Hintze, K. J., Benninghoff, A. D., & Ward, R. E. (2012). Formulation of the Total Western Diet (TWD) as a basal diet for rodent cancer studies. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(27), 6736-6742.

Höper, A. C., Salma, W., Sollie, S. J., Hafstad, A. D., Lund, J., Khalid, A. M., ... & Larsen, T. S. (2014). Wax esters from the marine copepod *Calanus finmarchicus* reduce diet-induced obesity and obesity-related metabolic disorders in mice. *The Journal of nutrition*, 144(2), 164-169.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, & Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2004). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003: análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. *IBGE, Coordenação de Índices de Preços*.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2010). *Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil*. IBGE.

Jeon, B. T., Jeong, E. A., Shin, H. J., Lee, Y., Lee, D. H., Kim, H. J., ... & Roh, G. S. (2012). Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet. *Diabetes*, *61*(6), 1444-1454.

John, W. G., & Lamb, E. J. (1993). The Maillard or browning reaction in diabetes. *Eye*, *7*(2), 230-237.

Koschinsky, T., He, C. J., Mitsuhashi, T., Bucala, R., Liu, C., Buenting, C., ... & Vlassara, H. (1997). Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(12), 6474-6479.

Kraeuter, A. K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019). The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice. In *Pre-clinical models* (pp. 105-111). Humana Press, New York, NY.

Lăcătușu, C. M., Grigorescu, E. D., Floria, M., Onofriescu, A., & Mihai, B. M. (2019). The mediterranean diet: From an environment-driven food culture to an emerging medical prescription. *International journal of environmental research and public health*, *16*(6), 942.

L'heveder, R., & Nolan, T. (2013). International diabetes federation. *Diabetes research and clinical practice*, *101*(3), 349-351.

Lechuga-Sancho, A. M., Gallego-Andujar, D., Ruiz-Ocaña, P., Visiedo, F. M., Saez-Benito, A., Schwarz, M., ... & Mateos, R. M. (2018). Obesity induced alterations in redox homeostasis and oxidative stress are present from an early age. *PLoS one*, *13*(1), e0191547.

Lee, H., Lee, I. S., & Choue, R. (2013). Obesity, inflammation and diet. *Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition*, *16*(3), 143-152.

Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., ... & Stadtman, E. R. (1990). [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 464-478). Academic Press.

Luchsinger, J. A., & Mayeux, R. (2007). Adiposity and Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, *4*(2), 127-134.

Luppino, F. S., de Wit, L. M., Bouvy, P. F., Stijnen, T., Cuijpers, P., Penninx, B. W., & Zitman, F. G. (2010). Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Archives of general psychiatry*, *67*(3), 220-229.

Maffei, Á., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., ... & Friedman, J. M. (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature medicine*, 1(11), 1155-1161.)

Maillard, L. C. (1912). Action des acides amines sur les sucres: formation des melanoidines par voie methodique. *CR Acad Sci*, 154, 66-68.

Martins, I. J. (2013). Increased risk for obesity and diabetes with neurodegeneration in developing countries.

Masaki, H., Okano, Y., & Sakurai, H. (1999). Generation of active oxygen species from advanced glycation end-products (AGEs) during ultraviolet light A (UVA) irradiation and a possible mechanism for cell damaging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1428(1), 45-56.

Mazon, J. N., de Mello, A. H., Ferreira, G. K., & Rezin, G. T. (2017). The impact of obesity on neurodegenerative diseases. *Life sciences*, 182, 22-28.

Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase.

Moldogazieva, N. T., Mokhosoev, I. M., Mel'nikova, T. I., Porozov, Y. B., & Terentiev, A. A. (2019). Oxidative stress and advanced lipoxidation and glycation end products (ALEs and AGEs) in aging and age-related diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.

Münch, G., Thome, J., Foley, P., Schinzel, R., & Riederer, P. (1997). Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease. *Brain research reviews*, 23(1-2), 134-143.

Naderali, E. K., Ratcliffe, S. H., & Dale, M. C. (2009). Obesity and Alzheimer's disease: a link between body weight and cognitive function in old age. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*®, 24(6), 445-449.

Neeper, M., Schmidt, A. M., Brett, J., Yan, S. D., Wang, F. E. N. G., Pan, Y. C., ... & Shaw, A. (1992). Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 267(21), 14998-15004.

Nowotny, K., Jung, T., Höhn, A., Weber, D., & Grune, T. (2015). Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules*, 5(1), 194-222.

Ott, C., Jacobs, K., Haucke, E., Santos, A. N., Grune, T., & Simm, A. (2014). Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox biology*, 2, 411-429.

Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews immunology*, 11(2), 85-97.

- Pan, H., Guo, J., & Su, Z. (2014). Advances in understanding the interrelations between leptin resistance and obesity. *Physiology & behavior*, 130, 157-169.
- Panariello, F., Polsinelli, G., Borlido, C., Monda, M., & De Luca, V. (2012). The role of leptin in antipsychotic-induced weight gain: genetic and non-genetic factors. *Journal of obesity*, 2012.
- Panchal, S. K., & Brown, L. (2010). Rodent models for metabolic syndrome research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
- Park, E. J., Lee, J. H., Yu, G. Y., He, G., Ali, S. R., Holzer, R. G., ... & Karin, M. (2010). Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell*, 140(2), 197-208.
- Pesquisa nacional de saúde : 2019 : ciclos de vida : Brasil / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. - Rio de Janeiro : IBGE, 2021. 139p. 1.
- Pinheiro, A. R. D. O., Freitas, S. F. T. D., & Corso, A. C. T. (2004). Uma abordagem epidemiológica da obesidade. *Revista de Nutrição*, 17(4), 523-533.
- Prado, W. L. D., Lofrano, M. C., Oyama, L. M., & Dâmaso, A. R. (2009). Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício. *Revista brasileira de medicina do esporte*, 15, 378-383.
- Rahbar, S., Blumenfeld, O., & Ranney, H. M. (1969). Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochemical and biophysical research communications*, 36(5), 838-843.
- Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Methuen.
- Sampey, B. P., Vanhoose, A. M., Winfield, H. M., Freemerman, A. J., Muehlbauer, M. J., Fueger, P. T., ... & Makowski, L. (2011). Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity*, 19(6), 1109-1117.
- Sell, D. R., & Monnier, V. M. (1990). End-stage renal disease and diabetes catalyze the formation of a pentose-derived crosslink from aging human collagen. *The Journal of clinical investigation*, 85(2), 380-384.
- Serin, Y., Akbulut, G., Uğur, H., & Yaman, M. (2021). Recent developments in in-vitro assessment of advanced glycation end products. *Current Opinion in Food Science*, 40, 136-143.
- Sharma, C., Kaur, A., Thind, S. S., Singh, B., & Raina, S. (2015). Advanced glycation End-products (AGEs): an emerging concern for processed food industries. *Journal of food science and technology*, 52, 7561-7576.
- Shen, C. Y., Lu, C. H., Wu, C. H., Li, K. J., Kuo, Y. M., Hsieh, S. C., & Yu, C. L. (2020). The development of maillard reaction, and advanced glycation end product

(AGE)-receptor for AGE (RAGE) signaling inhibitors as novel therapeutic strategies for patients with AGE-related diseases. *Molecules*, 25(23), 5591.

Singh, R. B. A. M., Barden, A., Mori, T., & Beilin, L. (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, 44(2), 129-146.

Singh, R. B. A. M., Barden, A., Mori, T., & Beilin, L. (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, 44(2), 129-146.

Smyth, S., & Heron, A. (2006). Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nature medicine*, 12(1), 75-80.

Snelson, M., Tan, S. M., Clarke, R. E., De Pasquale, C., Thallas-Bonke, V., Nguyen, T. V., ... & Coughlan, M. T. (2021). Processed foods drive intestinal barrier permeability and microvascular diseases. *Science advances*, 7(14), eabe4841.

Sohouli, M. H., Sharifi-Zahabi, E., Lari, A., Fatahi, S., & Shidfar, F. (2020). The impact of low advanced glycation end products diet on obesity and related hormones: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*, 10(1), 1-11.

Stunkard, A. J., Faith, M. S., & Allison, K. C. (2003). Depression and obesity. *Biological psychiatry*, 54(3), 330-337.

Takahashi, M., Kushida, K., Ohishi, T., Kawana, K., Hoshino, H., Uchiyama, A., & Inoue, T. (1994). Quantitative analysis of crosslinks pyridinoline and pentosidine in articular cartilage of patients with bone and joint disorders. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 37(5), 724-728.

Takeuchi, M. (2020). Toxic AGEs (TAGE) theory: a new concept for preventing the development of diseases related to lifestyle. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 12(1), 1-12.

Takeuchi, M., Sakasai-Sakai, A., Takata, T., Takino, J. I., Koriyama, Y., Kikuchi, C., ... & Matsunaga, T. (2021). Intracellular toxic AGEs (TAGE) triggers numerous types of cell damage. *Biomolecules*, 11(3), 387.

Tavares Ribeiro, R., Paula Macedo, M., & Filipe Raposo, J. (2016). HbA1c, fructosamine, and glycated albumin in the detection of dysglycaemic conditions. *Current Diabetes Reviews*, 12(1), 14-19.

Teixeira, C. S. L.. TNF-alfa e metabolismo do adipócito. 2015. Tese (doutorado) - INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ.

Sandu, O., Song, K., Cai, W., Zheng, F., Uribarri, J., & Vlassara, H. (2005). Insulin resistance and type 2 diabetes in high-fat-fed mice are linked to high glycotxin intake. *diabetes*, 54(8), 2314-2319.

Twarda-Clapa, A., Olczak, A., Białkowska, A. M., & Koziółkiewicz, M. (2022). Advanced glycation end-products (AGEs): Formation, chemistry, classification, receptors, and diseases related to AGEs. *Cells*, 11(8), 1312.

- Twarda-Clapa, A., Olczak, A., Białkowska, A. M., & Koziółkiewicz, M. (2022). Advanced Glycation End-Products (AGEs): Formation, Chemistry, Classification, Receptors, and Diseases Related to AGEs. *Cells*, 11(8), 1312.
- Unoki, H., & Yamagishi, S. I. (2008). Advanced glycation end products and insulin resistance. *Current Pharmaceutical Design*, 14(10), 987-989.
- Uribarri, J., Woodruff, S., Goodman, S., Cai, W., Chen, X., Pyzik, R., ... & Vlassara, H. (2010). Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *Journal of the American Dietetic Association*, 110(6), 911-916.
- van Dam, R. M., Rimm, E. B., Willett, W. C., Stampfer, M. J., & Hu, F. B. (2002). Dietary patterns and risk for type 2 diabetes mellitus in US men. *Annals of internal medicine*, 136(3), 201-209.
- Vistoli, G., De Maddis, D., Cipak, A., Zarkovic, N., Carini, M., & Aldini, G. (2013). Advanced glycooxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free radical research*, 47(sup1), 3-27.
- Ward, C. G., & Loepke, A. W. (2012). Anesthetics and sedatives: toxic or protective for the developing brain?. *Pharmacological Research*, 65(3), 271-274.
- Ward, M. A., Carlsson, C. M., Trivedi, M. A., Sager, M. A., & Johnson, S. C. (2005). The effect of body mass index on global brain volume in middle-aged adults: a cross sectional study. *BMC neurology*, 5(1), 23.
- Wautier, M. P., Chappey, O., Corda, S., Stern, D. M., Schmidt, A. M., & Wautier, J. L. (2001). Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *American journal of physiology-endocrinology and metabolism*, 280(5), E685-E694.
- Wendel, A. (1981). [44] Glutathione peroxidase. In *Methods in Enzymology* (Vol. 77, pp. 325- 333): Academic Press.
- WHO (World Health Organization). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Recuperado em 15/08/2020.
- Woods, S. C., Seeley, R. J., Rushing, P. A., D'Alessio, D., & Tso, P. (2003). A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *The Journal of nutrition*, 133(4), 1081-1087.
- Xu, X. Y., Deng, C. Q., Wang, J., Deng, X. J., Xiao, Q., Li, Y., ... & Chen, G. J. (2017). Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products in Alzheimer's disease. *International Journal of Neuroscience*, 127(5), 454-458.
- Yang, X.R., Wat, E., Wang, Y.P., Ko, C.H., Koon, C.M., Siu, W.S., Gao, S., Cheung, D.W.S., Lau, C.B.S., Ye, C.X., Leung, P.C., 2013. Effect of Dietary Cocoa Tea (*Camellia ptilophylla*) Supplementation on High-Fat Diet-Induced Obesity, Hepatic Steatosis, and Hyperlipidemia in Mice. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2013, 783860.

Ye, J. (2013). Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Frontiers of medicine*, 7, 14-24.

Zeng, C., Li, Y., Ma, J., Niu, L., & Tay, F. R. (2019). Clinical/translational aspects of advanced glycation end-products. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 30(12), 959-973.

Zinöcker, M. K., & Lindseth, I. A. (2018). The Western diet–microbiome–host interaction and its role in metabolic disease. *Nutrients*, 10(3), 365.