

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

LIDIANE ORLANDI

**INFLUÊNCIA DA DIETA RICA EM FRUTOSE SOBRE A HIPERALGESIA E
COMPORTAMENTO DOENTIO EM RATOS**

**ALFENAS/MG
2016**

LIDIANE ORLANDI

**INFLUÊNCIA DA DIETA RICA EM FRUTOSE SOBRE A HIPERALGESIA E
COMPORTAMENTO DOENTIO EM RATOS**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas - MG.
Área de Concentração:
Neuroendocrinologia.
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

**ALFENAS/MG
2016**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Orlandi, Lidiane.

Influência da dieta rica em frutose sobre a hiperalgesia e comportamento doentio em ratos. / Lidiane Orlandi. -- Alfenas/MG, 2016.

111 f.

Orientador: Alexandre Giusti-Paiva.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Frutose. 2. Dieta. 3. Lipopolissacarídeos. 4. Hiperalgesia.
5. Comportamento de doenças. 6. Regulação da Temperatura Corporal.
7. Citocinas. 8. Imunohistoquímica. I. Giusti-Paiva, Alexandre. II. Título.

CDD-612.397

LIDIANE ORLANDI

Influência da dieta rica em frutose sobre a hiperalgesia e comportamento doentio em ratos

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Neuroendocrinologia.

Aprovado em: 10/03/16

Prof. Alexandre Giusti-Paiva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Prof. Dra. Maria Martha Bernardi

Instituição: Universidade Paulista

Assinatura: 

Prof. Dra. Josie Resende Torres da Silva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Prof. Dra. Carla Speroni Ceron

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

*A minha mãe, Rita e minha mãzinha, Marina
que sempre foram o motivo de toda minha coragem.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, o Senhor que me guia e me dá forças para superar todas as dificuldades, Senhor de todas as coisas e responsável pela minha fé que me sustenta.

Ao meu pai César Augusto Orlandi (*in memoriam*) por me guiar e não me desamparar nos momentos mais difíceis.

À minha mãe, Rita P. Orlandi e minha mãezinha, Marina Orlandi, por acreditarem em mim, pelo amor e dedicação incondicional.

Ao Gustavo, pelo companheirismo e apoio durante esses anos.

Ao meu orientador, Alexandre Giusti-Paiva, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo e por todo ensinamento nessa caminhada que me fez evoluir muito como profissional.

Ao meu primeiro orientado de TCC e amigo, Délcio, por tudo que vivemos, compartilhamos, choramos e sorrimos.

Aos colegas de pós-graduação do Laboratório de Fisiologia da UNIFAL, por toda troca de conhecimento, ajudas nos experimentos, desabafos e comemorações.

Aos técnicos e auxiliares do Laboratório de Fisiologia, José Reis, Marina, Luis Felipe, Marília, Dani, Marta, Fátima, pelo cuidado com os animais e com nosso ambiente de trabalho.

À professora Andréa da Silva Torrão e a amiga Fernanda Crunfli, pela amizade e pela oportunidade em desenvolver parte experimental em seu laboratório.

Ao professor William T. L. Festuccia, Thiago Belchior de Oliveira e Patrícia Chimin pela colaboração nas análises de PCR-RT.

À secretária do PMPGCF da UNIFAL, Maria Antonieta, pelo auxílio com toda a burocracia e por ser tão querida.

Aos bioteristas, João Vitório, Érika, Gabriel, Fernando e João, pelo cuidado com os animais.

Aos animais, fundamentais para que todo esse trabalho se concretizasse.

À UNIFAL, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

*“E disse-me: A minha graça te basta,
porque o meu poder se aperfeiçoa na fraqueza.
De boa vontade, pois,
me gloriarei nas minhas fraquezas,
para que em mim habite o poder de Cristo.
Por isso sinto prazer nas fraquezas,
nas injúrias, nas necessidades,
nas perseguições, nas angústias por amor de Cristo.
Porque quando estou fraco então sou forte.”*

(SEGUNDA CARTA DE PAULO AOS CORÍNTIOS 12, 9-10)

RESUMO

O aumento da ingestão de alimentos industrializados e produtos como refrigerantes, bebidas açucaradas e xarope de milho contendo alta concentração de frutose podem originar desordens metabólicas como obesidade, resistência à insulina, *diabetes mellitus* tipo 2 e doenças cardiovasculares em humanos. Estas desordens metabólicas podem alterar a resposta imunológica destes indivíduos. O objetivo deste trabalho foi investigar a hiperalgesia inflamatória e comportamento doentio após um desafio imunológico em animais com desordens metabólicas induzidas por dieta rica em frutose. Ratos adultos machos foram tratados com água ou solução de frutose 10% por cinco semanas. A hiperalgesia inflamatória periférica através do teste de Von Frey eletrônico foi avaliada após estímulo com carragenina, lipopolissacarídeo (LPS) ou prostaglandina E₂ (PGE₂). Comportamento doentio foi avaliado 2 horas após a injeção de LPS ou veículo. Os animais foram sujeitos ao teste de campo aberto, interação social, ingestão alimentar e avaliação da resposta febril. Expressão de citocinas foi avaliada nos tecidos adiposos e hipotálamo e a resposta neural foi investigada via imunohistoquímica para c-Fos. Comparado ao grupo controle, a frutose induziu dislipidemias, altos níveis de glicose, aumento da adiposidade retroperitoneal e epididimal e resistência a insulina. O aumento da hiperalgesia inflamatória periférica foi observado em animais tratados com frutose. Em resposta ao LPS os animais tratados com frutose exibiram respostas comportamentais exacerbadas e aumento da febre além do aumento da expressão de citocinas no hipotálamo e tecido adiposo quando comparados aos animais tratados com água. A expressão de Fos induzida pelo LPS foi maior em diversas áreas cerebrais nos animais controle e esta resposta foi aumentada nos ratos induzidos por dieta de frutose. Neste estudo podemos concluir que a dieta rica em frutose desempenha um importante papel na indução de desordens metabólicas as quais irão intensificar a hiperalgesia inflamatória e o comportamento doentio em resposta a um desafio imunológico via indução de citocinas no hipotálamo.

Palavras-chave: Frutose. Dieta. Lipopolissacarídeos. Hiperalgesia. Comportamento de doença. Termorregulação. Citocinas. Imunohistoquímica.

ABSTRACT

The increased intake of processed foods and products such as soft drinks, sweetened drinks and corn syrup containing high concentration of fructose can cause metabolic disorders such as obesity, insulin resistance, type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease in humans. These disorders may alter the immune response of these individuals. The objective of this study was to investigate the inflammatory hyperalgesia and sickness behavior after an immune challenge in animals with metabolic disorders induced by diet rich in fructose. Adult male Wistar rats were provided either water or a fructose solution (10%) for 5 weeks. Peripheral inflammatory hyperalgesia according to the Von Frey test were evaluated after stimuli with carrageenan, lipopolysaccharide (LPS) and prostaglandin E₂ (PGE₂). Sickness behaviors were assessed 2 h following the injection of either a lipopolysaccharide (LPS) or vehicle. The rats were subjected to an open field test, a social interaction test, a food intake test and a fever evaluation. Cytokine expression was assessed in both adipose tissue and hypothalamus samples. The neural response was assessed in the forebrain via immunohistochemistry for c-Fos. Compared with the control group, the fructose diet induced dyslipidemia and significantly higher plasma glucose levels as well as both epididymal and retroperitoneal adiposity and insulin resistance. Increased peripheral inflammatory hyperalgesia were observed in animals treated with fructose. Furthermore, in response to LPS, the rats subjected to a fructose diet exhibited exacerbated sickness behaviors and accentuated febrile responses. Larger increases in cytokine expression were observed in both the hypothalamus and the adipose tissue of the obese rats compared with the control rats in response to LPS. LPS induced Fos protein expression in several areas of the brains of the control rats; however, larger numbers of Fos-positive cells were observed in the brains of the rats that were fed a fructose diet. In this study we conclude that the high-fructose diet plays an important role in the induction of metabolic disorders which will enhance inflammatory hyperalgesia and sickness behavior in response to an immune challenge induction via cytokines in the hypothalamus.

Key-words: Fructose. Diet. Lipopolysaccharide. Hyperalgesia. Sickness behavior. Thermoregulation. Cytokines. Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Vias metabólicas da frutose e a relação com o metabolismo lipídico e glicídico.....	22
Figura 2 -	Interação da sinalização da insulina e vias inflamatórias.....	26
Figura 3 -	Protocolo experimental esquemático representando o início do tratamento, o tempo de tratamento e os procedimentos realizados após 5 semanas de tratamento com água de beber ou frutose.....	37
Figura 4 -	Protocolo experimental esquemático representando o início do tratamento, o tempo de tratamento e o teste de Von Frey eletrônico realizado para avaliar a hiperalgesia inflamatória.....	41
Figura 5 -	Protocolo experimental esquemático representando o início do tratamento e o tempo de tratamento com água ou frutose, assim como o momento de realização dos testes para avaliação do comportamento doentio após aplicação de salina ou LPS.....	42
Figura 6 -	Aparato de campo aberto. Adaptado de Insight – Equipamentos, Pesquisa e Ensino LTDA (2015).....	44
Figura 7 -	Protocolo experimental esquemático representando o início do tratamento e o tempo de tratamento com água ou frutose, assim como o momento de realização do monitoramento da temperatura corporal após aplicação de salina ou LPS.....	46
Figura 8 -	Protocolo experimental esquemático representando o início do tratamento e o tempo de tratamento com água ou frutose, assim como o momento de realização da coleta de tecido para avaliação do teste de PCR após aplicação de salina ou LPS.....	47
Figura 9 -	Protocolo experimental esquemático representando o início do tratamento e o tempo de tratamento com água ou frutose, assim como o momento de realização da anestesia, perfusão e coleta de tecido após aplicação de salina ou LPS.....	49
Figura 10 -	Perfil glicêmico dos ratos tratados com água ou solução de frutose 10% mediante ao teste de tolerância oral à glicose.....	54

Figura 11 - Perfil glicêmico dos ratos tratados com água ou solução de frutose 10% mediante o teste de tolerância intraperitoneal à insulina.....	55
Figura 12 - Parâmetros de resistência a insulina em ratos tratados com água ou solução de frutose 10%.....	56
Figura 13 - Perfil hormonal de ratos tratados com água ou solução de frutose 10%.....	56
Figura 14 - Efeito da solução de frutose 10% ou água na hiperalgesia inflamatória induzida por injeção intraplantar de carragenina (1mg/pata) em ratos.....	57
Figura 15 - Efeito da solução de frutose 10% ou água na hiperalgesia inflamatória induzida por injeção intraplantar de LPS (100µg/pata) em ratos.....	58
Figura 16 - Efeito da solução de frutose 10% ou água na hiperalgesia inflamatória induzida por injeção intraplantar de PGE ₂ (100ng/pata) em ratos.....	59
Figura 17 - Efeitos do LPS (10 µg/Kg) em ratos tratados com água (Controle) e tratados com solução de frutose 10% (Frutose) no Teste Campo Aberto.....	60
Figura 18 - Efeitos do LPS (100 µg/Kg) em ratos tratados com água (Controle) e tratados com solução de frutose 10% (Frutose) no Teste Campo Aberto.....	61
Figura 19 - Efeitos do LPS (1000 µg/Kg) em ratos tratados com água (Controle) e tratados com solução de frutose 10% (Frutose) no Teste Campo Aberto.....	63
Figura 20 - Efeitos do LPS (1000 µg/Kg) em ratos tratados com água (Controle) e tratados com solução de frutose 10% (Frutose) no Teste de Interação Social.....	64
Figura 21 - Efeitos do LPS (1000 µg/Kg) em ratos tratados com água (Controle) e tratados com solução de frutose 10% (Frutose) no Teste de Ingestão Alimentar.....	66

Figura 22 - Efeitos do LPS (100 e 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) em ratos controle (Controle) e tratados com solução de frutose 10% (Frutose) sobre a termorregulação.....	68
Figura 23 - Efeitos do LPS (1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) em ratos controle (Controle) e tratados com solução de frutose 10% (Frutose) sobre a expressão gênica de citocinas nos tecidos adiposos retroperitoneal, epididimal e hipotálamo.....	70
Figura 24 - Efeitos do LPS (1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) em ratos controle (Controle) e tratados com solução de frutose 10% (Frutose) sobre a expressão de C-Fos.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de primers para análise da expressão gênica IL-6, TNF- α e IL1- β	49
Tabela 2 - Parâmetros biométricos em animais tratados com água ou solução de frutose 10%.....	53
Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos em animais tratados com água ou solução de frutose 10%.....	53
Tabela 4 - Análises de variância de duas vias dos grupos controle e pré-tratados com solução de frutose 10% (pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico) no teste do Campo Aberto.....	61
Tabela 5 - Análises de variância de duas vias dos grupos controle e pré-tratados com solução de frutose 10% (pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico) no teste do Campo Aberto.....	62
Tabela 6 - Análises de variância de duas vias dos grupos controle e pré-tratados com solução de frutose 10% (pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico) no teste de Ingestão Alimentar.....	65
Tabela 7 - Análises de variância de duas vias dos grupos controle e pré-tratados com solução de frutose 10% (pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico) na expressão de citocinas no hipotálamo e tecido adiposo.....	69
Tabela 8 - Efeitos da solução de frutose ou água sobre o números de células positivas para c-Fos no BNST, SON, PCx, MPOA, LS e PVN depois da administração de salina ou LPS (1000 μ g/Kg).....	71
Tabela 9 - Análise de variância Two-way de grupos tratados com solução de frutose ou água (fator pré-tratamento) e submetidos a administração de salina ou LPS (fator desafio imunológico) nos números de neurônios marcados para c-Fos.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

Actb	- β -actina
ACTH	-hormônio adrenocorticotrófico
ADP	- <i>adenosina difosfato</i>
Akt	-proteína quinase B
AMPc	-monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	-análise de variância
AP	-área postrema
AP-1	-proteína ativadora 1
ATP	- <i>adenosina trifosfato</i>
AUC	-área sob a curva
BNST	-bed núcleo da stria terminal
CD14	- <i>cluster of differentiation 14</i>
cDNA	-DNA complementar
CNA	-comprimento nasoanal
CO	-monóxido de carbono
COX-2	-ciclooxigenase 2
CRH	-fator liberador de corticotrofina
CRP	-proteína C-reativa
DAB	-hidrocloro de diaminobenzidina
DM tipo 2	- <i>diabetes mellitus</i> tipo 2
E.P.M.	-erro padrão da média
FAS	-ácido graxo sintase
GAPDH	-gliceraldeído 3-fosfato
GIP	-polipeptídeo inibitório gástrico
GLP-1	-peptídeo-1 semelhante ao glucagon
GLUT-2	-transportadores de glicose 2
GLUT-5	-transportadores de glicose 5
GTT _o	-teste de tolerância oral à glicose
H ₂ O ₂	-peróxido de hidrogênio
HDL	-lipoproteína de alta densidade

HFCS	- <i>high fructose corn syrup</i>
HOMA	- <i>Homeostatic Model Assessment</i>
HPA	-hipotálamo-pituitária-adrenal
ICAM-1	-molécula 1 de adesão intercelular
IL-1	-interleucina 1
IL-12	-interleucina 12
IL-1 β	-interleucina 1 β
IL-6	-interleucina 6
IL-8	-interleucina 8
iNOS	-óxido nítrico sintetase induzível
IRAK-1	- <i>interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
IRAK-4	- <i>interleukin-4 receptor-associated kinase</i>
IRS	-substratos do receptor da insulina
IT	-índice térmico
ITTi	-teste de tolerância intraperitoneal à insulina
I κ B	-inibidor do fator de transcrição NF- <i>kappa</i> B
JAK-2	- <i>Janus kinase-2</i>
JNK	- <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
K _{ATP}	-canais de potássio ATP-dependente
K _{ITT}	-constante de redução da glicemia
K _m	-constante de Michaelis-Menten
LBP	- <i>lipopolysaccharide binding protein</i>
LDL	-lipoproteína de baixa densidade
LPL	-lipase lipoprotéica
LPS	-lipopolissacarídeo
LS	-área septal lateral
MnPO	-núcleo pré-ótico mediano
MPOA	-área pré-ótica mediana
mTOR	- <i>mammalian target of rapamicina</i>
NaCl	-cloreto de sódio
NF κ B	-fator de transcrição nuclear
NO	-óxido nítrico

HFCS	- <i>high fructose corn syrup</i>
HOMA	- <i>Homeostatic Model Assessment</i>
HPA	-hipotálamo-pituitária-adrenal
ICAM-1	-molécula 1 de adesão intercelular
IL-1	-interleucina 1
IL-12	-interleucina 12
IL-1 β	-interleucina 1 β
IL-6	-interleucina 6
IL-8	-interleucina 8
iNOS	-óxido nítrico sintetase induzível
IRAK-1	- <i>interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
IRAK-4	- <i>interleukin-4 receptor-associated kinase</i>
IRS	-substratos do receptor da insulina
IT	-índice térmico
ITTi	-teste de tolerância intraperitoneal à insulina
I κ B	-inibidor do fator de transcrição NF- <i>kappa</i> B
JAK-2	- <i>Janus kinase-2</i>
JNK	- <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
K _{ATP}	-canais de potássio ATP-dependente
K _{ITT}	-constante de redução da glicemia
K _m	-constante de Michaelis-Menten
LBP	- <i>lipopolysaccharide binding protein</i>
LDL	-lipoproteína de baixa densidade
LPL	-lipase lipoprotéica
LPS	-lipopolissacarídeo
LS	-área septal lateral
MnPO	-núcleo pré-ótico mediano
MPOA	-área pré-ótica mediana
mTOR	- <i>mammalian target of rapamicina</i>
NaCl	-cloreto de sódio
NF κ B	-fator de transcrição nuclear
NO	-óxido nítrico

NTS	-núcleo do trato solitário
OVLT	-órgão vascular da lâmina terminal
PAI-1	-inibidor do ativador de plasminogênio-1
PAMP's	-padrões moleculares associados a patógenos
PB	-tampão fosfato
PCR	- <i>polymerase chain reaction</i>
PCx	-córtex piriforme
PGE ₂	-prostaglandina E ₂
PI3-K	-fosfatidilinositol-3-quinase
PKB	-proteína quinase B
PKC	-proteína quinase C
POA	-área pré-óptica do hipotálamo anterior
PPAR	- <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PVN	-núcleo paraventricular
RI	-receptor de insulina
RI	-resistência a insulina
RNA	-ácido ribonucleico
RPL19	-proteína ribossomal L19
RT-PCR	- <i>real time-polymerase chain reaction</i>
SM	-síndrome metabólica
SON	-núcleo supra-ótico
Src	- <i>Src homology collagen</i>
SREBP-1c	- <i>Sterol regulatory element binding protein-1c</i>
TAK-1	-quinase 1 ativada por TGF- β
TLR	-receptores do tipo <i>toll-like</i>
TNF- α	-fator de necrose tumoral α
TRAF6	-fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral
TyG	-índice triacilglicerídeos/glicose
VCAM-1	-molécula 1 de adesão de células vasculares
VLDL	-lipoproteína de muita baixa densidade
Vmax	-velocidade máxima

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 ANIMAIS	36
3.2 SUPLEMENTAÇÃO COM FRUTOSE NA ÁGUA DE BEBER.....	36
3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS DISTÚRBIOS METABÓLICOS	37
3.3.1 Quantificação da adiposidade abdominal e ganho de peso do fígado	37
3.3.2 Índice de Lee.....	38
3.3.3 Dosagens bioquímicas	38
3.3.4 Teste de Tolerância oral a Glicose (GTT _o) e a Insulina (K _{ITT}).....	38
3.3.5 Determinação da resistência a insulina.....	40
3.3.6 Dosagem hormonal para Insulina, Leptina e Adiponectina.....	40
3.4 AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA INFLAMATÓRIA PERIFÉRICA	40
3.4.1 Teste de Von Frey eletrônico.....	41
3.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOENTIO	42
3.5.1 Avaliação do efeito do LPS sobre o teste de campo aberto.....	43
3.5.2 Interação Social	44
3.5.3 Ingestão Alimentar	45
3.6 MONITORAMENTO DA TEMPERATURA CORPORAL	45
3.7 EXTRAÇÃO DE RNA E PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL.....	47
3.8 PERFUSÃO, PREPARAÇÃO DO TECIDO E IMUNOHISTOQUÍMICA PARA c-FOS ..	49
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	51
4 RESULTADOS	52
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS DISTÚRBIOS METABÓLICOS	52

4.1.1	Quantificação da adiposidade abdominal, ganho de peso do fígado e índice de Lee..	52
4.1.2	Dosagens bioquímicas	53
4.1.3	Teste de Tolerância oral a Glicose (GTT_o) e a Insulina (K_{ITT}).....	54
4.1.4	Determinação da resistência a insulina.....	55
4.1.5	Dosagem hormonal para Insulina, Leptina e Adiponectina.....	56
4.2	AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA INFLAMATÓRIA PERIFÉRICA	57
4.2.1	Teste de Von Frey eletrônico.....	57
4.3	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOENTIO	59
4.3.1	Avaliação do efeito do LPS sobre o teste de campo aberto.....	59
4.3.2	Interação Social.....	63
4.3.3	Ingestão Alimentar	64
4.4	MONITORAMENTO DA TEMPERATURA CORPORAL	66
4.5	EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO HIPOTÁLAMO E TECIDO ADIPOSE.....	69
4.6	IMUNOHISTOQUÍMICA PARA c-FOS	70
5	DISCUSSÃO	73
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
	REFERÊNCIAS.....	85
	ANEXOS	110

1 INTRODUÇÃO

Todo ser vivo possui necessidades nutricionais vitais que são, na maioria das vezes, supridas por intermédio da alimentação. A qualidade dos alimentos ingeridos por um indivíduo pode influenciar na sua saúde, qualidade de vida e longevidade, uma vez que a adoção de maus hábitos alimentares esta associada ao desenvolvimento de diversas doenças. O aumento no consumo de alimentos industrializados, com alta densidade energética e baixo valor nutricional, aliado a inatividade física contribuem para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos como *diabetes mellitus* e obesidade, os quais aumentam o risco de aparecimento de doenças cardiovasculares e síndrome metabólica (FORD et al., 2002; KEANE et al., 2015; MONTEIRO, 2009; RUIZ-NÚÑEZ et al., 2013).

Dietas com alto teor de açúcares, ou alto teor de gorduras, e aquelas que apresentam altos teores de açúcares e de gorduras, as denominadas dietas de cafeteria, participam da gênese da obesidade em animais e caracterizam a atual mudança no hábito alimentar em humanos, uma vez que o estilo de vida dos indivíduos nas sociedades modernas, principalmente nas ocidentais, é caracterizado pela predominância de uma alimentação rica em lipídeos e carboidratos e pobre em nutrientes (JOHNSON; MAKOWSKI, 2015; SAMPEY et al., 2011).

Dentre os alimentos que contem xarope de milho (HFCS-*high fructose corn syrup*), uma solução que apresenta alta concentração de frutose em sua formulação estão: refrigerantes, bebidas adoçadas, condimentos como ketchup e mostarda, pães e bolos industrializados, dentre outros. O aumento na ingestão de frutose, presente nestes tipos de alimentos, tem sido relacionado com o surgimento e prevalência de diversos distúrbios metabólicos a exemplo do *diabetes mellitus* tipo 2 (DM tipo 2) (GORAN, 2013), obesidade (BASU, 2013), gota (CHOI, 2010) e dislipidemias (STANHOPE, 2012), além de hepatopatias como esteatose (VOS; LAVINE, 2013).

A obesidade, DM tipo 2, dislipidemia e a hipertensão arterial são fatores que inicialmente caracterizavam a denominada “síndrome X” descrita por Reaven (1988) ou “síndrome de resistência à insulina” descrita por Alexander et al. (2003), Moller; Kaufman (2005) ou Eckel et al. (2005). Atualmente estes fatores caracterizam a

síndrome metabólica (SM) (DEFRONZO; FERRANNINI, 1991; KAHN et al., 2005; REAVEN, 1988).

A Síndrome Metabólica é caracterizada por um conjunto de achados clínicos e bioquímicos que incluem obesidade visceral, intolerância à glicose/resistência a insulina e dislipidemia, que juntos aumentam o risco desenvolvimento de doença cardiovascular e *diabetes mellitus* tipo 2 (ECKEL et al., 2005; FORD et al., 2002; REAVEN, 1988; WAJCHENBERG et al., 1994). Além dessas patologias, aumento da reatividade vascular à noradrenalina (BARON et al., 1994) e resistência à insulina associada com o aumento da atividade simpática (THORP; SCHLAICH, 2015) também estão associados a SM.

Um dos achados clínicos que apresenta bastante relevância para síndrome metabólica e que vem sendo alvo de diversos estudos é a adiposidade visceral. O aumento do tecido adiposo parece ser o grande vilão da SM (KAHN, 2000). Atualmente, o tecido adiposo é considerado um órgão endócrino ativo, que secreta diversos hormônios e citocinas, e não somente um órgão de armazenamento de energia passiva (BERG; SCHERER, 2005). O tecido adiposo visceral está localizado dentro das cavidades do corpo, essencialmente na cavidade abdominal, ele é metabolicamente mais ativo que o tecido adiposo subcutâneo e se difere deste por possuir adipócitos maiores, mais responsivos às enzimas lipolíticas e mais resistentes a insulina (FRÜHBECK et al., 2001). Um aumento deste tipo de tecido adiposo leva ao aumento da resistência à insulina, processo que está diretamente relacionado ao aumento da secreção de adipocinas como, IL-1 β e TNF- α e que pode culminar com aparecimento do DM 2 (KOVACEVIC et al., 2015).

No quadro de resistência à insulina observa-se elevação plasmática deste hormônio, que é capaz de exercer atividade mitogênica nas fibras musculares lisas das artérias, contribuindo para o aumento da resistência periférica e para o desenvolvimento da aterosclerose (CABALLERO, 2004; HSUEH et al., 2004; SJÖHOLM; NÝSTROM, 2005). Os pacientes com a SM também apresentam hipertrigliceridemia, redução de lipoproteína de alta densidade (HDL) e aumento de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (CORNIER et al., 2008; GOFF et al., 2005; REAVEN et al., 1993; SALTIEL, 2000). Todos esses fatores estão associados com o aparecimento de disfunção endotelial, a qual reduz a função dilatadora arterial e aumenta ainda mais o risco de

aterosclerose e doença cardiovascular (KATAKAM et al.,1999; MILLER et al., 1998; SALTIEL, 2000).

Para mimetizar as desordens metabólicas causadas pela adoção de maus hábitos alimentares vistas em humanos são utilizados modelos pré-clínicos, tais como os que envolvem a manipulação genética e os que utilizam dietas (KENNEDY et al., 2010). Modelos experimentais que utilizam dieta rica em frutose são amplamente empregados para desencadear o aparecimento de sinais característicos da síndrome metabólica, permitindo assim, avaliar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da mesma (HAVEL, 2005; HERNÁNDEZ-SALINAS et al., 2015; RICHARD; ROBERT, 2010; SIL et al., 2015; TRAN et al., 2009). A ingestão crônica de frutose pode também desencadear um aumento no tecido adiposo visceral, considerado uma característica marcante da síndrome metabólica (BURSAĆ et al., 2014).

A ingestão excessiva de frutose e os danos metabólicos associados a ela têm feito com que organizações de saúde em todo o mundo voltassem sua atenção para os efeitos nocivos, à saúde humana, decorrentes da adoção de uma dieta rica deste monossacarídeo. A frutose é um açúcar simples, do grupo das hexoses, que muito se assemelha a glicose, diferindo apenas pela posição do grupo carbonila, que na frutose encontra-se no carbono 2 e na glicose no carbono 1, fazendo com que aquela pertença ao grupo das cetoses e esta ao grupo das aldoses (LE; TAPPY, 2006).

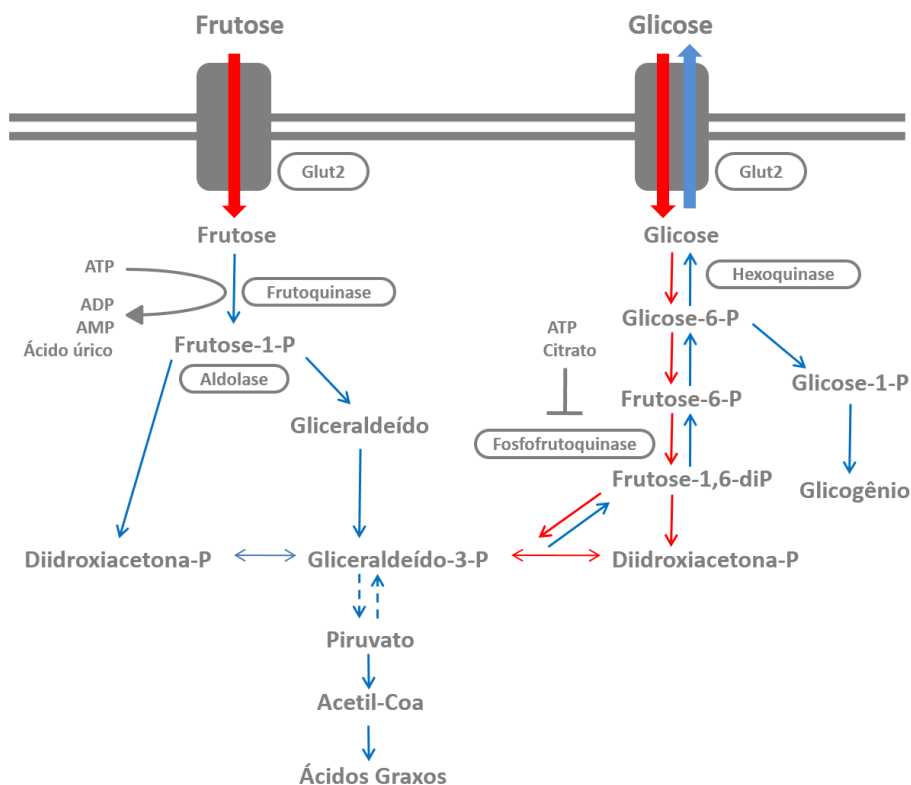
Após ser ingerida, a frutose ganha a luz do intestino delgado, de onde é transportada para o citoplasma dos enterócitos via transportadores GLUT-5. Diferentemente do transporte da glicose, a entrada da frutose no enterócito independe da hidrólise de ATP e do simporte com sódio. Por meio de transportadores GLUT-2, presentes na membrana basolateral dos enterócitos, a frutose ganha a corrente sanguínea e posteriormente o fígado, seu principal órgão metabolizador. Uma vez na circulação hepática a frutose é captada pelos hepatócitos via GLUT-2. Dentro dos hepatócitos, a frutose é rapidamente fosforilada e transformada em frutose-1-fosfato, reação catalisada pela frutoquinase, enzima que apresenta um baixo Km (constante de Michaelis-Menten) para a frutose e velocidade máxima (Vmax) alta, o que justifica o rápido metabolismo que a frutose sofre no fígado (AKRAM; HAMID, 2013; LE; TAPPY, 2006; MAYES, 1993).

Como pode ser visto na Figura 1 o metabolismo de glicose e frutose convergem para a formação de duas trioses, a diidroxiacetona-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato.

Entretanto, o metabolismo da frutose se difere marcadamente da glicose. A entrada da glicose na via glicolítica está em dependência da atividade da hexoquinase, enzima que fosforila a glicose em glicose-6-fosfato, no entanto esta enzima apresenta alto K_m para a glicose, o que faz com que a reação só ocorra em presença de altas concentrações de glicose. A próxima reação da via, catalisada pela fosfofrutoquinase, converte glicose-6-fosfato em frutose-1,6-difosfato, esta enzima é regulada negativamente por níveis elevados ATP, citrato e por baixos níveis de insulina. Em contrapartida, o metabolismo da frutose independe da sinalização da insulina, bem como não sofre feedback negativo pelo ATP ou citrato, o que faz com que a frutose seja metabolizada mais rápida e espontaneamente do que a glicose (LE; TAPPY, 2006; MALIK; HU, 2015; TORNHEIM; LOWENSTEIN, 1976).

O gliceraldeído-3-fosfato é isômero de função da diidroxiacetona-fosfato, de modo que esta, ao ser produzida durante o metabolismo das hexoses, pode ser convertida, por ação de uma isomerase, em gliceraldeído-3-fosfato. Este por sua vez, sofre uma cascata de reações que ao final produzirá Acetil-coA que pode ter dois destinos metabólicos: entrar no ciclo de Krebs para dar origem ao ATP ou servir de substrato em rotas lipogênicas de produção de ácidos graxos, que provocaram hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo (AKRAM; HAMID, 2013; BAR-ON; STEIN, 1968).

Figura 1- Vias metabólicas da frutose e a relação com o metabolismo lipídico e glicídico.



Fonte: Adaptado de Tappy; Lê (2010).

Uma vez dentro das células B ou β do pâncreas, a glicose é metabolizada gerando assim sinais intracelulares capazes de estimular a secreção de insulina. Esta secreção é estimulada nas células β do pâncreas a partir da entrada de glicose pelos transportadores GLUT-2, estes transportadores possuem elevado K_m (entre 15 e 20 mmol/L), portanto, não sendo saturável em concentrações fisiológicas de glicose e V_{max} elevado, permitindo um rápido transporte de glicose quando há aumento da glicemia (BONADONNA et al., 1996; LENZEN; PANTEN, 1988; REGAZZI et al., 2015).

Além do transporte da glicose, as enzimas responsáveis pela fosforilação deste açúcar à glicose-6-fosfato desempenham importante papel na secreção de insulina. A glicose é convertida em glicose-6-fosfato pela ação da glicocinase, também denominada hexoquinase IV, que possui baixa afinidade pela glicose e da hexoquinase I de alta afinidade. Embora a hexoquinase I seja a enzima que apresenta mais afinidade, ela é inibida pela glicose-6-fosfato, acarretando, dessa maneira, numa maior atividade da glicocinase. Esse mecanismo exerce papel fundamental na regulação da via

glicolítica no estado pós-prandial. Após sua conversão, a glicose-6-fosfato entra na via glicolítica e é convertida em piruvato (GIROIX et al., 1984; LENZEN, 2015).

No citoplasma o piruvato é transportado à mitocôndria para metabolização aeróbia onde é convertido a acetil-Coa pela piruvato desidrogenase. Em seguida, o acetil-Coa entra no ciclo de Krebs levando ao aumento de ATP e da razão ATP/ADP. No citoplasma, esse aumento da relação ATP/ADP provoca fechamento dos canais de potássio ATP-dependente (K_{ATP}) e a consequente despolarização da membrana celular que leva a ativação de canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem. Consequentemente há um aumento do influxo de cálcio para as células β pancreáticas desencadeando a exocitose da insulina (ASHCROFT, 1984; COOK; HALES, 1984; SEINO, 2012). A secreção de insulina estimulada pela glicose pode ser potencializada pelos hormônios incretinas peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e polipeptídeo inibitório gástrico (GIP). Esses hormônios auxiliam na secreção de insulina após uma elevação da glicose proveniente da alimentação contribuindo para a homeostase dos níveis deste açúcar no organismo (DUPRE et al., 1973; LUND, 2005).

De maneira diferente da glicose, após a ingestão de frutose, não ocorre a liberação de insulina por duas razões. Primeiramente, o pâncreas não contém os transportadores de glicose GLUT-5 (CURRY, 1989), que são limitantes para a captação de frutose, além da frutose não estimular a liberação do peptídeo inibitório gástrico (GANDA et al., 1979; RAYNER et al., 2000; TEFF et al., 2004).

Após a secreção de insulina pelas células β do pâncreas inicia-se a via clássica da sinalização deste hormônio, a via IRSs/PI3-K/Akt. Essa via é estimulada quando a insulina se liga a subunidade α do seu receptor induzindo assim a autofosforilação da subunidade β . O receptor de insulina (RI) pertence a classe dos receptores tirosina quinase, a fosforilação em resíduos tirosina ativa o receptor e em resíduos serina o inativa (HOTAMISLIGIL et al., 1996; TANIGUCHI et al., 2006). A ativação desse receptor leva a fosforilação de substratos intracelulares, como os substratos do receptor da insulina (IRS1-4), *Src homology collagen* (Src) e *Janus kinase-2* (JAK-2). A fosforilação dos IRS1-4 permite a associação dessas proteínas com a subunidade p85 da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-K) desencadeando a ativação de outras proteínas como proteína quinase B (PKB) também denominada de Akt. A estimulação dessa via clássica da insulina vai então ser responsável pelos efeitos biológicos desse hormônio

(BEDINGER; ADAMS, 2015; CROSS et al., 1995; SALTIEL; KAHN, 2001; TANIGUCHI et al., 2006; WHITE, 2003).

Dentre os efeitos biológicos da insulina podemos considerar o aumento da captação de glicose em tecidos musculares e adiposo; inibição da produção hepática de glicose através da redução de neoglicogênese e glicogenólise, lipólise e proteólise; aumento da síntese de ácidos graxos, proteínas e glicogênio; controle da ingestão alimentar pelo hipotálamo; prevenção de apoptose e por fim, produção de óxido nítrico no endotélio (PESSIN; SALTIEL, 2000).

O consumo excessivo de frutose aumenta os níveis de ácidos graxos os quais estão associados a alterações nas vias clássicas da sinalização insulínica podendo causar um quadro de resistência a este hormônio. Estes ácidos graxos desencadeiam a fosforilação dos resíduos serina dos receptores de insulina, inativando-os e diminuindo a ativação da PI3-K promovendo, assim, a diminuição no transporte de glicose para dentro da célula estimulado pela insulina. Essa diminuição na captação de glicose estimula ainda mais a secreção de insulina na tentativa de compensar os níveis aumentados de glicose, gerando um círculo vicioso piorando o quadro da resistência. Portanto, se há modificações na sinalização da insulina dentro da célula a resposta metabólica e os efeitos biológicos deste hormônio podem ser alterados frente aos seus níveis circulantes (BELL; POLONSKY, 2001; KAHN, 2001; NOLAN et al., 2015).

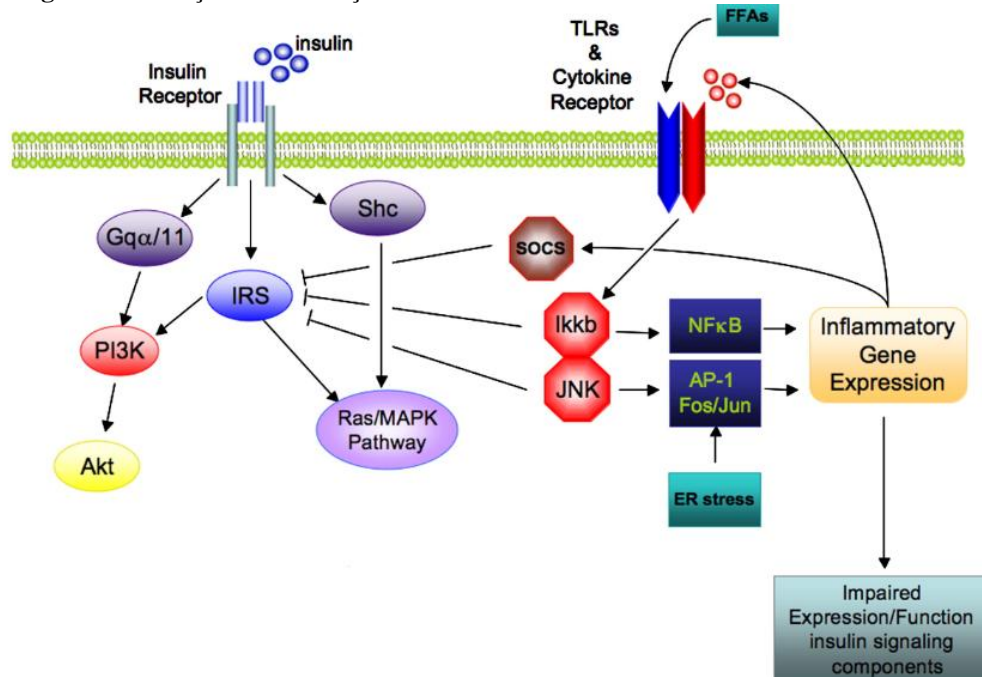
Além da via IRSs/PI3-K/Akt outra via importante no desenvolvimento da resistência à insulina é a via PI3-K/Akt/GLUT-4 a qual é responsável pelo transporte de glicose para dentro da célula. Os transportadores de glicose (GLUTs) medeiam a entrada da glicose para o interior da célula através de sua translocação para a membrana plasmática, este mecanismo é modulado pela ativação das proteínas PI3-K/Akt independente de ATP. A insulina então estimula esta translocação e conseqüentemente a entrada da glicose na célula. Dessa maneira, se há uma alteração nesta sinalização a glicose não é transportada para dentro da célula e seus níveis plasmáticos aumentam podendo levar ao quadro de DM tipo 2 (HUANG; CZECH, 2007).

O estímulo da resistência a insulina a partir do aumento nos níveis de lipídeos e carboidratos pode desencadear obesidade, hipertrigliceridemia, diminuição dos níveis de HDL-c, aumento dos níveis de VLDL-c, hipertensão, aumento da resistência vascular, aterosclerose e DM tipo 2 (FINKELSTEIN et al., 2012; KWON; PESSIN, 2013).

A resistência à insulina originada pela inflamação de tecidos metabólicos foi primeiramente descrita por Hotamisligil et al., em 1993. Estes autores relataram que o tecido adiposo tinha a capacidade de secretar fator de necrose tumoral α (TNF- α), uma citocina pró-inflamatória que prejudicava a sinalização da insulina. Posteriormente, vários outros mediadores inflamatórios foram descobertos sendo secretados pelo tecido adiposo como proteína C-reativa (CRP), interleucina 6 e 1 (IL-6, IL-1), inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) entre outros (HALBERG et al., 2008; KERSHAW; FLIER, 2004; KWON; PESSIN, 2013).

Desta forma, a obesidade aumenta a secreção de TNF- α pelos adipócitos, esta citocina inativa os receptores de insulina por intermédio da inibição da fosforilação deste receptor em resíduos tirosina o que impede sua sinalização celular resultando, gerando assim o de resistência à insulina (PERALDI et al., 1996). Além disso, a inflamação induzida pela obesidade aumenta níveis de proteínas quinase, tais como, inibidor do fator de transcrição NF-*kappa* B (I κ B), a proteína quinase C (PKC) e a *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) (HOTAMISLIGIL et al., 1996; SAMUEL; SHULMAN, 2012). NF κ B e JNK são os principais fatores de transcrição responsáveis pela expressão de grande variedade de genes envolvidos na resposta inflamatória e que estão associados a resistência à insulina. A atividade da proteína JNK estimula a fosforilação do fator de transcrição AP-1, que por vias ainda não conhecidas promove a fosforilação em resíduos serina do receptor de insulina. Já o NF κ B permanece no citoplasma inativado pelo inibidor de κ B, o I κ B. Após fosforilação de I κ B pelas quinases IKK o complexo NF κ B- I κ B é desfeito e o NF κ B é translocado para o núcleo. O TNF- α é um importante estimulador destes dois fatores de transcrição, que irão desencadear a resistência a insulina por vias de sinalização intermediárias, ainda pouco conhecidas, que ativarão a fosforilação em resíduos serina do receptor de insulina (Figura 2) (BAEUERLE; BALTIMORE, 1996; GAO et al., 2003; SHOELSON et al., 2006).

Figura 2- Interação da sinalização da insulina e vias inflamatórias.



Fonte: Adaptado de Luca; Olefsky (2008).

A sinalização inflamatória induzindo a resistência à insulina caracteriza uma relação fundamental entre inflamação e resistência insulínica consistindo, assim, um dos mecanismos que explicam a fisiopatologia das complicações metabólicas da obesidade.

Alterações nas respostas imunológicas em indivíduos obesos têm sido alvo de diversas pesquisas que utilizam modelos animais de obesidade induzida por dieta. Estudos realizados em animais tratados com dieta rica em açúcar e gorduras, capazes de desencadear um quadro de obesidade, demonstraram uma resposta febril prolongada, anorexia, redução do comportamento social e aumento de mediadores pró-inflamatórios após o sistema imune ser estimulado por tratamento com diversos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP's) (AMAR et al., 2007; MARISSAL-ARVY et al., 2014; POHL et al., 2009; SMITH et al., 2007).

Adipócitos e macrófagos desempenham funções análogas nestas respostas. Pré-adipócitos possuem a capacidade de se diferenciar em macrófagos e a consequente hiperplasia destas células gera o aumento da síntese de mediadores pró-inflamatórios como, por exemplo, TNF- α , IL-1 β , IL-6, leptina, resistina, visfatina, PAI-1 e PPAR (*Peroxisome proliferator-activated receptor*) caracterizando, assim, um estado de inflamação crônica sub-clínica em indivíduos obesos (CHAKRABORTI, 2015; GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011).

O processo inflamatório causado pelo tecido adiposo difere da inflamação resultante da ativação do sistema imune decorrente da invasão por microorganismos. A literatura clássica descreve a inflamação como sendo uma resposta recrutada pelo organismo diante de lesões, suas principais características são edema, vermelhidão, dor e febre, determinando assim os sinais cardinais da inflamação como, tumor, rubor, dor e calor (LARSEN; HENSON, 1983).

A inflamação é uma resposta biológica complexa de tecidos vasculares a estímulos nocivos, tais como patógenos, danos celulares ou irritantes (físicos ou químicos). É um mecanismo de defesa destinado a remover os estímulos lesivos e iniciar o processo de reparo tecidual (GALLIN et al., 1992).

Uma resposta inflamatória perante um microorganismo é estimulada pelo sistema imune que reconhece esses agressores através dos sistemas de reconhecimento de agentes patogênicos como os receptores do tipo *toll-like* (TLR). Estes receptores são expressos em células musculares, enterócitos, adipócitos e em células do sistema imune incluindo macrófagos, o que estabelece uma integração entre o sistema imune e metabólico (BEUTLER, 2004; SHI et al., 2006; SONG et al., 2006). Estes receptores possuem como seus ligantes o lipopolissacarídeo (LPS) e os ácidos graxos saturados. A interação entre esses ligantes e o receptor estimula a síntese de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8 e IL-12, as quais atuam como mediadores da inflamação patogênica e da inflamação decorrente da obesidade.

Dantzer et al. (1998) descrevem que as citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β desempenham, portanto, um papel fundamental na inflamação. Cada uma possui suas propriedades características e são sintetizadas por células do sistema imune, neurônios e adipócitos, exercendo potente efeito no sistema nervoso central desencadeando assim, febre, ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e comportamento doentio (HOTAMISLIGIL et al., 1995).

O comportamento doentio representa, junto com a resposta febril, uma estratégia organizada do organismo no sentido de combater a infecção (HART, 1988). Kent, Bluthé, Kelley e Dantzer (1992) destacam alterações nas respostas comportamentais dos animais tais como anedonia ou falta de interesse em estímulos agradáveis, redução da ingestão de alimentos, diminuição do comportamento exploratório, diminuição da interação social, redução do comportamento sexual, sono e diminuição da atividade locomotora como sendo mecanismos que auxiliam o animal no combate a infecção.

Estas respostas comportamentais podem ser verificadas em modelos animais que utilizam LPS ou citocinas pró-inflamatórias para simular a evocação do sistema imune (DANTZER, 2006; HARDEN et al., 2015; KENT et al., 1992).

A falta de interesse em estímulos agradáveis ou anedonia é amplamente investigada por pesquisadores em animais experimentais. Um modelo de anedonia bastante utilizado é a preferência a sacarose visto que os roedores possuem preferência por bebidas adoçadas (DE LA GARZA, 2005; WEIL et al., 2006). Esta busca pelo estímulo agradável da bebida adoçada corresponde uma resposta comportamental controlada não só por regiões cerebrais de recompensa, mas também pelo hipotálamo e tronco cerebral, áreas cerebrais que controlam a ingestão alimentar e homeostase energética (AHIMA et al., 2008; DE ARAUJO et al., 2008; PIZZAGALLI et al., 2009).

A redução da ingestão alimentar talvez seja a alteração mais clássica do comportamento doentio. Falta de apetite, perda de peso e diminuição da ingestão alimentar manifestam-se durante respostas a agentes infecciosos como LPS (DE PAIVA et al., 2010). O controle da ingestão alimentar é regulado por várias regiões do sistema nervoso central como núcleo arqueado, hipotálamo lateral, complexo vagal dorsal e núcleos da rafe as quais são fundamentais no controle da ingestão alimentar uma vez que essas regiões são responsáveis pela integração de sinais do estado energético e ingestão calórica (DHILLO, 2007; SCHWARTZ et al., 2000).

Além da anedonia e da redução da ingestão alimentar, a diminuição da atividade locomotora e da exploração também caracterizam o comportamento doentio. O teste de campo aberto é um modelo extensivamente utilizado por pesquisadores para verificar a atividade locomotora do animal uma vez que seu instinto o incita a explorar novos ambientes. A locomoção na parte central do aparato esta relacionada ao medo, já a locomoção na periferia relaciona-se com a atividade locomotora em geral (BELZUNG; GRIEBEL, 2001; PRUT; BELZUNG, 2003). Estudos realizados por Swiergiel e Dunn (2007) e Otterness et al. (1988) demonstram que administração de LPS e IL-1 causam diminuição da atividade locomotora no aparato de campo aberto, o que revela a eficácia do teste no que tange evidenciar o aparecimento do comportamento doentio.

O teste de interação social foi primeiramente descrito por File e Hyde (1978) como modelo para avaliação da ansiedade, no entanto ele também é utilizado para avaliação do comportamento doentio. Manifestações próprias da espécie são observadas neste teste que consiste em confrontar o animal a ser avaliado com outro desconhecido

da mesma espécie e idade inferior. Os parâmetros analisados consistem em limpar, cheirar, morder, imitar, explorar a região anogenital, seguir o visitante ou colocar as patas dianteiras sobre ele (COHN; DE SÁ-ROCHA, 2006; GRANT; MACKINTOSH, 1963). O aumento da interação social sem o aumento da atividade locomotora caracteriza um efeito ansiolítico enquanto diminuição da interação social indica efeito ansiogênico (FILE; SETH, 2003), no comportamento doentio estas duas respostas podem ser observadas uma vez que Hennessy et al. (2014) afirmam que a diminuição da interação social não é um comportamento invariável nesta situação.

Comportamento doentio e febre são uma consequência do complexo processo de inflamação. A inflamação ocorre como uma imediata resposta de defesa inata a patógenos invasores independentemente do fato do estímulo inflamatório apresentar-se infeccioso ou não, a resposta é resultante de uma ativação rápida e bastante estereotipada da resposta imune inata (ROTH; BLATTEIS, 2014).

Em animais homeotérmicos a temperatura corporal exerce papel fundamental no metabolismo influenciando as funções fisiológicas, para isso ela deve ser mantida constante independente das variações térmicas do ambiente. A termorregulação mantém a temperatura corporal diante de uma ampla faixa de condições ambientais através de mecanismos autonômicos e comportamentais (BICEGO et al., 2007).

A termorregulação autonômica decorre do ganho, produção ou conservação, e perda de calor. A produção de calor pode ser oriunda do metabolismo basal, pelo tremor da musculatura estriada e pela produção metabólica a partir do tecido adiposo marrom (NAKAMURA; MORRISON, 2011). A piloereção e vasoconstrição periférica são mecanismos responsáveis pela conservação do calor e a vasodilatação periférica, ofegação e sudorese conferem mecanismos de perda de calor (BOULANT, 2000).

Variações térmicas do ambiente são detectadas por sensores localizados na pele, os termorreceptores periféricos, classificados em dois tipos, sensíveis ao frio e os sensíveis ao calor. Posteriormente, aferências térmicas periféricas são conduzidas ao sistema nervoso central através da raiz dorsal da medula espinhal até regiões de integração térmica superiores do sistema nervoso central. A regulação da temperatura corporal não é determinada por uma única região do sistema nervoso central, mas por uma série de estruturas neurais como hipotálamo, sistema límbico, troncocerebral, a formação reticular, medula espinhal e gânglios simpáticos (BLATTEIS, 1998). Apesar de todas essas regiões desempenharem um controle na temperatura corporal estudos

demonstraram que a área pré-óptica do hipotálamo anterior (POA) é uma das estruturas termorreguladoras mais importantes. A POA é um sítio termossensível que recebe informações térmicas dos termorreceptores periféricos e da medula espinhal exercendo um papel fundamental no controle da temperatura corporal (MORRISON et al. 2008; ROMANOVSKY, 2007).

Os mecanismos de perda ou ganho de calor podem ser regulados pelo *set point* termorregulatório, que é definido como valor de temperatura corporal aceitável em determinada circunstância. O *set point* pode ser considerado como um termostato e por isso gera respostas compensatórias diante de variações de temperatura (KANOSUE et al., 1997).

Baseado nas alterações deste termostato e na sua falha em manter a temperatura homeostática podemos definir os termos hipotermia, hipertermia e febre. Na hipotermia, a temperatura corporal diminui abaixo do valor do *set point* termorregulador e geralmente ocorre quando a temperatura corporal cai abaixo dos 35°C. A hipertermia se caracteriza pela elevação da temperatura corporal acima do valor do *set point* devido uma alta sobrecarga de calor ambiental ou metabólica e depende da temperatura ambiente. Entretanto, variações diretas do *set point* termorregulador a fim de elevar a temperatura corporal induzem a resposta febril. A febre é uma elevação regulada da temperatura corporal e não uma consequência da incapacidade dos mecanismos termorreguladores de dissipar o ganho de calor como ocorre na hipertermia, nestas circunstâncias a resposta febril não depende da temperatura ambiente ela se desenvolve em qualquer temperatura (CABANAC; MASSONNET, 1980; IUPS, 2001).

A febre é um aumento regulado da temperatura corporal em resposta a um agente invasor, exerce função protetora e adaptativa visto que a elevação na temperatura corporal aumenta a eficiência do sistema imunológico em combater os agentes agressores e induz condições desfavoráveis para o crescimento de microorganismos patogênicos. Porém, temperaturas muito altas por períodos prolongados podem ser prejudiciais ao funcionamento do organismo e podem levar a morte (HARDEN et al., 2015).

Dentre os benefícios imunológicos da febre podemos considerar o aumento da mobilidade e migração de neutrófilos e monócitos, aumento da fagocitose, da produção de radicais livres de oxigênio, da produção de interferon e da atividade de linfócitos T auxiliares (BLATTEIS, 2006; ROSENSPIRE et al., 2002).

A resposta febril caracteriza-se pela participação de múltiplos sistemas como endócrino, neurológico e imunológico estimulados através da ação de agentes pirogênicos, que podem ser endógenos ou exógenos. Os agentes pirogênicos exógenos são, na maioria das vezes, oriundos de vírus, bactérias e fungos e exercem um efeito indireto uma vez que estimulam a produção de agentes pirogênicos endógenos por células do sistema imune. Citocinas como, IL-1, IL-6 e TNF- α , prostaglandinas e endotelinas são considerados endógenos envolvidos na geração da febre (KLUGER, 1991; ROMANOVSKY et al., 2005).

Estas citocinas desencadeiam a febre a partir da estimulação da síntese de prostaglandinas, principalmente a PGE₂, considerada mediador final na resposta febril devido sua ação direta na POA. A PGE₂ quando presente na POA, região rica em receptores para este mediador, eleva o *set point* termorregulador aumentando a temperatura corporal (ENGSTRÖM et al., 2012; LAZARUS et al., 2007).

A administração de pirogênicos exógenos, como o LPS, resulta na síntese de óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO) e PGE₂. Apesar de estudos relatarem a participação do NO e do CO na geração da febre, a PGE₂ é considerada o principal eicosanóide envolvido nesta resposta (GERSTBERGER, 1999; STEINER et al., 1999).

O tratamento com LPS ativa a cascata complemento, produzindo C5a o qual estimula a produção de PGE₂ pelas células de Kupfer, estes mediadores ligam-se em seus receptores presentes nos nervos aferentes vagais conduzindo estímulos para o núcleo do trato solitário e finalmente para a POA no hipotálamo. Dessa maneira, neurônios sensíveis ao calor são inibidos nesta região, determinando a fase inicial da febre também denominada fase neural. Posteriormente, citocinas pró-inflamatórias estimulam a produção de PGE₂ dependente de COX-2, causando a inibição dos neurônios sensíveis ao calor, caracterizando, assim, a fase tardia da febre ou fase humoral. A manifestação destas duas fases após tratamento com LPS determina a resposta febril bifásica (ROTH; BLATTEIS, 2014; ROTH; SOUZA, 2001).

A ativação da circuitaria neural pelas PGE₂ provoca respostas autonômicas e comportamentais, tais como vasoconstrição periférica, produção metabólica de calor, tremores (calafrios) contribuindo, assim, para o estabelecimento e manutenção da resposta febril (NAKAMURA, 2011; ROMANOVSKY et al., 2005; SAPER et al., 2012). A febre também ocorre a partir da sinalização direta das citocinas no sistema nervoso central que pode chegar via órgãos circunventriculares ou por meio de

aferências vagais subdiafragmáticas (KUHT; FARMERY, 2014; ROMANOVSKY, 2004; TAKAHASHI et al., 1997).

Todas essas alterações comportamentais e também a febre são desencadeadas pelo tratamento com LPS, componente externo da parede celular de bactérias gram negativas que é reconhecido por células imunes, principalmente macrófagos. Esta toxina apresenta-se como um complexo glicolípídico composto por um polissacarídeo hidrofílico associado a um domínio hidrofóbico, o lipídeo A, o qual é altamente conservado nas bactérias, uma vez que é o centro biologicamente ativo da molécula e o responsável pelos seus efeitos (GALANOS et al., 1972; SIMPSON et al., 2015). Devido à sua apolaridade, na corrente sanguínea, o LPS é transportado por lipoproteínas de alta densidade (HDL), sendo a formação do complexo HDL-LPS fator importante na redução da resposta imunológica visto que este complexo permite que o LPS fique aprisionado na circulação (FREUDENBERG et al., 2001).

O LPS é considerado um padrão molecular associado a patógenos (PAMP's) que é reconhecido pelos receptores TLR4 (receptores *toll-like 4*), primeiramente o LPS liga-se a proteínas ligantes do hospedeiro, as LBPs (*lipopolysaccharide binding protein*), produzidas pelo fígado na resposta de fase aguda. Assim o complexo LPS-LBP se liga nos receptores CD14 dos macrófagos interagindo, conseqüentemente, com os receptores TLR4 desencadeando a sinalização intracelular (LAFLAMME; RIVEST, 2001; NADEAU; RIVEST, 2000).

Quando ocorre esta interação os domínios intracelulares TIR dos receptores TLR4 estimulam a proteína MyD88 a recrutar as cinases associadas ao receptor da interleucina-1 (IRAK-1 e IRAK-4) para ativar o fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6) estimulando uma cascata de quinases que envolvem TAK-1, IKK e I κ B, que, por sua vez, promove liberação do fator de transcrição nuclear (NF- κ B), que será translocado ao núcleo para induzir a expressão de genes responsáveis pela produção das citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β (YAMAMOTO et al., 2004; WISSE et al., 2007). Além desses mediadores o tratamento com LPS pode estimular a síntese de prostaglandinas, histamina e serotonina (KELMER, 2009), ainda, estimula a óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e a cicloxigenase 2 (COX 2) (NISHIO et al., 2013).

As citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β podem alcançar diretamente o sistema nervoso central através dos órgãos circunventriculares, como estes mediadores não conseguem

atravessar a barreira hemato-encefálica é por meio dos órgãos circunventriculares, que não possuem essa barreira, que as citocinas atingem o cérebro (DANTZER et al., 2000; KONSMAN et al., 2002).

Outro mecanismo pelo qual as citocinas podem atingir o cérebro se dá pelo nervo vago, responsável pela inervação dos órgãos da cavidade abdominal. No cérebro possui projeções para o núcleo do trato solitário e núcleo parabraquial, de lá para o núcleo paraventricular do hipotálamo, tálamo, amígdala e córtex (KELLEY et al., 2003). Neurônios sensoriais do nervo vago expressam receptores para IL-1 e em resposta a administração de LPS macrófagos e células dendríticas de sua bainha perineural também sintetizam esta citocina (GOEHLER et al., 1999). A importância desta via na comunicação entre sistema imune e sistema nervoso central tem sido amplamente investigada por pesquisadores, nesses estudos utilizam-se a técnica de vagotomia subdiafragmática em roedores e posterior administração intraperitoneal de IL-1 ou LPS. A lesão no nervo impede a ação da IL-1 no cérebro provocando uma ausência no comportamento doentio dos animais demonstrando, assim, o papel fundamental do nervo vago na comunicação imuno-cerebral (BLUTHÉ et al., 1994; HANSEN et al., 2001; HANSEN et al., 1998; LAYÉ et al., 1995).

Uma vez no sistema nervoso central estas citocinas podem ativar o eixo HPA através da liberação de fator liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo, responsável por estimular a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da glândula pituitária desencadeando o aumento dos glicocorticóides. O tempo e a duração da ativação do eixo HPA pelas citocinas podem ser considerados os principais fatores que regulam o sistema imune e sistema nervoso central influenciando, dessa maneira, no comportamento doentio (PAULI et al., 1998; RIVEST, 2003; SHIRAZI et al., 2015).

Outra via importante na interação entre as citocinas pró-inflamatórias e cérebro se dá por meio das células endoteliais e perivasculares que levarão à ativação de células do sistema nervoso, como micróglia, promovendo assim alterações no sistema nervoso autônomo e endócrino regulando a resposta do indivíduo à infecção (BANKS; ERICKSON, 2010; MARTIN et al., 2013; MCCUSKER; KELLEY, 2013).

De acordo com Lawrence et al. (2012) e Pohl et al. (2014), respostas comportamentais como diminuição do apetite, do comportamento exploratório e da interação social além da resposta febril foram encontradas em animais com obesidade induzida por dieta após estímulo do sistema imune. Além disso, respostas inflamatórias

como hiperalgesia foram demonstradas em animais obesos Zucker (*fa/fa*) (CROCI; ZARINI, 2007; ROANE, PORTER, 1986; SUGIMOTO et al., 2008). Tais resultados apontam para a existência de uma interação entre sistema imune e metabólico, na qual o tecido adiposo parece exercer um importante papel modulador.

Nesse contexto não foi encontrado nenhum trabalho que avaliasse os efeitos dos distúrbios metabólicos induzidos por dieta de frutose sobre a hiperalgesia inflamatória e comportamento doentio. Considerando que essas respostas possam estar modificadas devido às alterações metabólicas e aumento do tecido adiposo visceral, nossos estudos tiveram por objetivo avaliar a hiperalgesia e o comportamento doentio induzido por LPS em modelos animais com alterações metabólicas induzidas por ingestão de frutose.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho estão descritos abaixo.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a hiperalgesia inflamatória e o comportamento doentio em ratos com alterações metabólicas induzidas por solução de frutose 10%.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

São objetivos específicos:

- a) Caracterizar as alterações metabólicas induzidas pela ingestão com solução de frutose 10% em ratos;
 - perfil glicêmico, lipídico e hormonal (insulina, leptina e adiponectina);
 - ganho de peso corpóreo, peso da gordura e do fígado;
 - resistência a insulina;
- b) Avaliar a influência da dieta de frutose na hiperalgesia inflamatória;
- c) Avaliar a influência da dieta de frutose no comportamento doentio e febre;
- d) Avaliar a influência da dieta de frutose na expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 no tecido adiposo e hipotálamo;
- e) Avaliar a influência da dieta de frutose na ativação de áreas cerebrais relacionadas ao comportamento doentio durante a endotoxemia por LPS.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizados neste estudo estão descritos a seguir.

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar* com 7 semanas de vida no início dos experimentos, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção (39 x 31 x 17 cm³), tratados com ração comercial e água “*ad libitum*” ou solução de frutose 10% e mantidos em sala climatizada a 22 ± 2 °C em ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00h).

Os protocolos experimentais descritos abaixo aos quais os animais foram submetidos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas - MG (Protocolo nº. 530/2013).

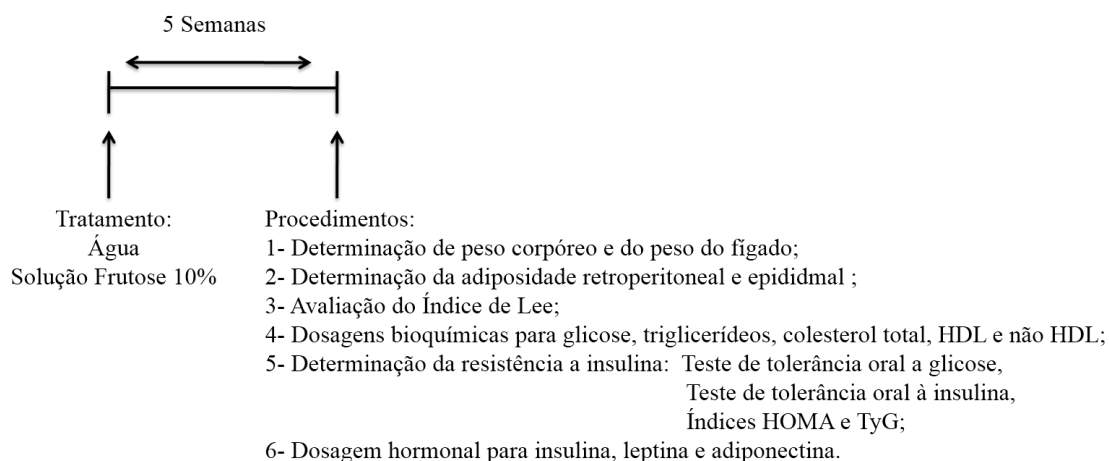
3.2 SUPLEMENTAÇÃO COM FRUTOSE NA ÁGUA DE BEBER

Os ratos foram randomizados e divididos em dois grupos, um grupo recebeu água (grupo Controle) e o outro grupo solução de frutose 10%, Labsynth[®], (grupo Frutose) “*ad libitum*” por cinco semanas, ambos receberam ração comercial padrão (ROGLANS et al., 2007).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS DISTÚRBIOS METABÓLICOS

Após 5 semanas de tratamento com água de beber ou dieta rica em frutose foram realizados os procedimentos experimentais para a caracterização dos distúrbios metabólicos, sendo eles: determinação do peso corpóreo, do peso do fígado, da adiposidade retroperitoneal e epididimal, do índice de Lee; dosagens bioquímicas para glicose, triglicérides, colesterol total, HDL e não HDL; determinação da resistência à insulina e dosagens hormonais para insulina, leptina e adiponectina demonstrados no delineamento experimental representado pela Figura 3.

Figura 3- Protocolo experimental esquemático representando o início do tratamento, o tempo de tratamento e os procedimentos realizados após 5 semanas de tratamento com água de beber ou frutose.



Fonte: Da autora.

3.3.1 Quantificação da adiposidade abdominal e ganho de peso do fígado

Os animais foram pesados antes do início do experimento e após cinco semanas do mesmo, para determinação do peso corporal total inicial e final. A quantificação da adiposidade abdominal e o peso de fígado foram realizados após a morte do animal por anestésico inalante, por meio de dissecação dos depósitos de gordura retroperitoneal e epididimal (n=8 por grupo) e fígado (n=10 por grupo) que foram imediatamente pesados. O resultado foi expresso em g/100g de peso corporal (HIGA et al., 2014).

3.3.2 Índice de Lee

A determinação do índice de Lee (n=13 por grupo) foi realizada com cálculo utilizando o peso e o comprimento nasoanal (CNA) dos animais. A relação entre a raiz cúbica do peso corporal e o comprimento nasoanal do animal [$\sqrt[3]{\text{Peso (g)}/\text{CNA(cm)}}$] resulta no índice de Lee (BERNARDIS; PATTERSON, 1968).

3.3.3 Dosagens bioquímicas

Após jejum prévio de 12h (HOU et al., 2011), os animais foram decapitados, o sangue coletado do tronco encefálico (5 mL) em tubos plásticos contendo heparina e mantidos sob gelo. O plasma foi separado por centrifugação (3000 rpm, 4°C, 15 min.) e as alíquotas mantidas a -20°C até o momento das dosagens bioquímicas (máximo 7 dias após a coleta). Com essas amostras foram realizadas as análises de glicose, triglicérides, colesterol total, colesterol HDL e colesterol não HDL (n=8 por grupo) através de kits *Labtest*[®].

3.3.4 Teste de Tolerância oral a Glicose (GTT_o) e a Insulina (K_{ITT})

Para avaliação da resistência a insulina (RI) após cinco semanas de tratamento os animais foram submetidos à avaliação da secreção e da ação periférica da insulina por meio do teste de tolerância oral à glicose (GTT_o; n=6 por grupo) e teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ITT_i; n=9 por grupo). Ambos os testes foram realizados após jejum de 12 horas (GTT_o) e 8-10 horas (ITT_i).

Na véspera dos experimentos, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250mg/kg, i.p.) e submetidos ao implante cirúrgico de cânulas de polietileno. As cânulas utilizadas foram confeccionadas a partir de um tubo de silicone flexível (*Silastic*[®]) de 12 cm preso a uma base de Parafilm “M”[®] Laboratory Film. Uma

agulha 20 G foi conectada na cânula. Com o animal sob anestesia, uma incisão longitudinal foi feita sobre a área onde a veia jugular externa direita passa sob músculo peitoral maior. A agulha conectada a cânula foi inserida para o lúmen da veia. A cânula foi passada por dentro e fora do recipiente. Depois de retirada agulha, a cânula foi puxada para trás ligeiramente, com intuito de inseri-la no vaso. Após esse processo, a cânula foi pressionada para baixo, em direção ao coração. Com a cânula na veia, a folha de silicone foi suturada no músculo peitoral. A cânula foi exteriorizada na região escapular dorsal do rato com o auxílio de um trocater (HARMS; OJEDA, 1974). Ao final do dia os animais foram submetidos a jejum e no dia seguinte procedeu-se a realização dos testes.

Para o teste de tolerância oral a glicose os animais tiveram o sangue coletado por meio da cânula na veia jugular antes de receberem uma sobrecarga de glicose 30% (2.5 g/Kg v.o.) e 30, 60, 90 e 120 min após a administração da glicose. A glicemia foi então mensurada através de métodos enzimáticos colorimétricos. A avaliação das respostas glicêmicas durante o teste foi efetuada através do cálculo da área sob a curva (AUC=nM.min) (KITAGAWA et al., 2011).

Para a realização do ITTi, os animais receberam insulina regular Insunorm R[®] (1,5UI/kg de massa corporal, i.p.) e tiveram o sangue coletado por meio da cânula na veia jugular antes da aplicação da insulina e 4, 8, 12 e 16 minutos após a aplicação da mesma. A glicemia foi então mensurada através de métodos enzimáticos colorimétricos e a constante de redução da glicemia (K_{ITi}) foi calculada utilizando-se o *software* Prisma 5.0 e expressa em %/minuto.

Todas as amostras obtidas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a -4°C, 3.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi pipetado e em seguida foram realizadas as dosagens de glicose. As concentrações de glicose sanguínea foram determinadas pelo método enzimático colorimétrico da glicose oxidase-peroxidase, com *kit Labtest*[®]. As absorvâncias das amostras e do padrão foram lidas em espectrofotômetro a 505nm.

3.3.5 Determinação da resistência à insulina

A quantificação da resistência à insulina foi calculada de duas maneiras, a primeira se deu pelo modelo homeostático de avaliação (*Homeostatic Model Assessment* – HOMA, n=6 por grupo), calculado utilizando-se a seguinte fórmula: $HOMA = \text{Glicemia em jejum (mMol)} \times \text{Insulina } (\mu\text{U/mL}) / 22,5$ (MATTHEWS et al., 1985).

A outra maneira de determinar a resistência a insulina se da pelo índice triacilglicerídeos/glicose (TyG, n=7 por grupo) calculado com base na seguinte fórmula: $\text{Ln} [\text{triacilgliceridemia de jejum (mg.dL}^{-1}) \times \text{glicemia de jejum (mg.dL}^{-1}) / 2]$ (GUERRERO-ROMERO et al., 2010).

3.3.6 Dosagem hormonal para Insulina, Leptina e Adiponectina

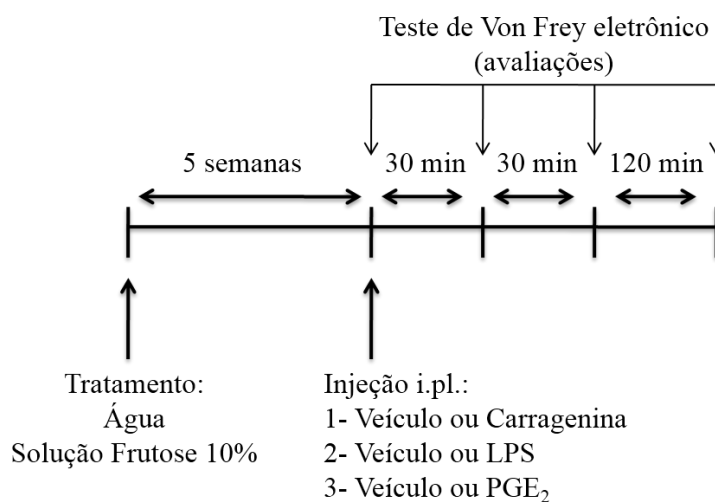
Após tratamento por 5 semanas com solução de frutose 10% ou água e jejum prévio de 8-10h, os animais Controle ou Frutose foram decapitados, o sangue coletado do tronco (5 mL) em tubos plásticos contendo heparina e mantidos sob gelo. O plasma foi separado por centrifugação (3000 rpm, 4°C, 15 min.) e as alíquotas mantidas a -20°C até o momento das dosagens hormonais. Os hormônios insulina (n=6 por grupo), leptina (n=5 por grupo) e adiponectina (n=5 por grupo) foram quantificados através do teste imunoenzimático ELISA (*Enzo Life Sciences*®) (RODRIGUES et al., 2011).

3.4 AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA INFLAMATÓRIA PERIFÉRICA

Os procedimentos experimentais realizados para a avaliação da hiperalgesia inflamatória periférica desencadeada pela dieta rica em frutose são demonstrados no delineamento experimental na Figura 4. Após 5 semanas de tratamento com água ou solução de frutose 10% foi administrado veículo, carragenina, LPS ou PGE₂ e o teste de

Von Frey eletrônico foi realizado após 30, 60 e 180 minutos após injeção destas substâncias.

Figura 4- Protocolo experimental esquemático representando o início do tratamento, o tempo de tratamento e o teste de Von Frey eletrônico realizado para avaliar a hiperalgesia inflamatória.



Fonte: Da autora.

3.4.1 Teste de Von Frey eletrônico

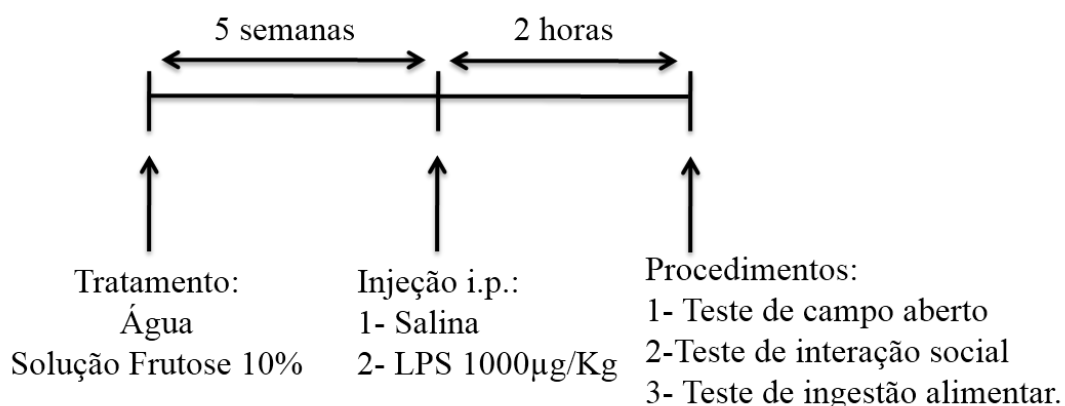
Após cinco semanas de tratamento com água ou solução de frutose 10% os animais foram submetidos ao teste de Von Frey eletrônico após administração intraplantar direita de carragenina (1 mg/pata, n=7 por grupo), lipopolissacarídeo (LPS) de *E.coli* (026: B6) (100 ng/pata, n=8 por grupo) ou prostaglandina E₂ (100 ng/pata, n=5 por grupo), no período matutino. Antes do teste, em ambiente silencioso, os animais foram colocados de 15 a 30 minutos, para ambientação, em caixas de acrílico (12 x 10 x 17 cm) sendo o chão uma rede de arames. O teste consiste em evocar a flexão da pata traseira com um transdutor de força (Electronic Anesthesiometer Insight model EFF-302, Brazil) adaptado com uma ponta de 0,5 mm² de polipropileno. O investigador foi treinado a aplicar esta ponta perpendicularmente a área central da pata traseira direita do animal com um aumento gradual de pressão. Antes da estimulação da pata os animais permaneceram quietos, sem movimentos exploratórios ou defecação e sem descansar

em cima das patas. O estímulo da pata foi repetido até que se conseguissem duas medidas similares. Durante esse período de adaptação, as patas dos animais foram tocadas 2-3 vezes com a ponta do transdutor e, após esse período, a leitura basal foi realizada. Posteriormente, foram administrados os estímulos e a hiperalgesia mecânica foi expressa como delta (Δ) do limiar de retirada (g) que é calculado pela subtração dos valores médios da leitura basal (tempo 0) pelos valores médios das leituras nos tempos de 30, 60 e 180 minutos após o estímulo hiperalgésico (CUNHA et al., 2004; ORLANDI et al., 2011).

3.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOENTIO

Os procedimentos experimentais realizados para a avaliação do comportamento doentio são demonstrados no delineamento experimental representado pela Figura 5. Após 5 semanas de tratamento com água ou solução de frutose 10% foi administrado salina ou LPS e após 2 horas foram analisados os testes de campo aberto, interação social e ingestão alimentar.

Figura 5- Protocolo experimental esquemático representando o início do tratamento e o tempo de tratamento com água ou frutose, assim como o momento de realização dos testes para avaliação do comportamento doentio após aplicação de salina ou LPS.



Fonte: Da autora.

Para avaliar a influência da frutose após cinco semanas de tratamento no comportamento doentio induzido por lipopolissacarídeo LPS de *Escherichia coli* (026: B6 – Sigma Aldrich, USA) os animais foram divididos em 4 grupos, sendo:

- a) Controle tratados com salina (0.9% NaCl; 1 ml/kg; i.p.);
- b) Controle tratados com LPS (1000 μ g/Kg; i.p.);
- c) Frutose tratados com salina (0.9% NaCl; 1 ml/kg; i.p.);
- d) Frutose tratados com LPS (1000 μ g/Kg; i.p.).

Para avaliar o efeito do pré-tratamento de frutose sobre o comportamento doentio induzido por LPS foram realizados os testes descritos a seguir, como teste de campo aberto, interação social, ingestão alimentar e monitoramento da temperatura corporal.

3.5.1 Avaliação do efeito do LPS sobre o teste de campo aberto

Para a determinação da melhor dosagem de LPS sobre os efeitos no comportamento doentio foram comparadas diferentes doses. Primeiramente foram comparadas as doses de 10 μ g/Kg (n=5 por grupo); 100 μ g/Kg (Grupo Salina, n=7; Grupo LPS, n=9) e 1000 μ g/Kg (n=10 por grupo) de LPS. A administração do LPS ou do veículo foi realizada por via intraperitoneal, em dose única e os efeitos no teste de campo aberto foram analisados após duas horas da injeção das substâncias.

Para execução do teste de campo aberto os animais foram colocados em uma arena circular de acrílico, com 60 cm de diâmetro e paredes com altura de 50 cm. O piso da arena apresentava-se dividido em áreas, sendo 8 periféricas (próximos a parede do aparato) e 4 centrais (Figura 3). Cada animal foi colocado na região central do campo aberto e seu comportamento registrado através de filmagem no decorrer de 5 minutos. Após cada filmagem a arena foi higienizada com etanol 10% antes de ser introduzido um novo animal. Na noite anterior ao teste os animais foram colocados na sala de experimentação para que se habituassem ao novo ambiente.

Os vídeos foram analisados e procedeu-se a quantificação do número de cruzamentos na área central e periférica, além do número de exploração vertical, também denominado *rearing*. Foi considerado cruzamento periférico a entrada do animal com as quatro patas em alguma das oito áreas periféricas e cruzamentos centrais quando o animal entrou com as quatro patas nas áreas centrais, a soma desses dois

cruzamentos resulta nos cruzamentos totais. A posição bípede sobre as duas patas traseira do animal foi considerada como *rearing* (SWIERGIEL; DUNN, 2007).

Figura 6- Aparato de campo aberto.
Adaptado de Insight –
Equipamentos, Pesquisa e
Ensino LTDA (2015).
Fonte: <http://insightltda.com.br>.



3.5.2 Interação Social

Três dias consecutivos antes de completar a quinta semana de tratamento com água ou solução de frutose 10% os animais foram colocados sozinhos na arena de campo aberto durante 15 minutos/dia com o intuito de que houvesse a ambientação com o aparato a fim de diminuir o comportamento exploratório com a arena a ponto de não interferir no comportamento de interação social.

O teste de interação social (n=8 por grupo) baseou-se no confronto entre o animal a ser testado (animal residente) e um indivíduo da mesma espécie, linhagem e sexo, que tenha, porém, idade e peso inferior – no mínimo 100g a menos - (animal intruso). Para tanto os animais foram colocados na arena de campo aberto e a interação entre residente e intruso foi registrada por uma câmera filmadora, durante 5 minutos.

O teste foi realizado duas horas após a administração de salina ou LPS (i.p.). O tempo total de interação social entre residente e intruso foi analisado através dos vídeos. Os parâmetros analisados foram: 1- exploração anogenital do intruso, através do cheiro; 2- seguir ou montar (colocar as patas dianteiras sobre o intruso); 3- imitar o intruso (OVERSTREET et al., 2002).

3.5.3 Ingestão Alimentar

O teste de ingestão alimentar foi conduzido em gaiolas metabólicas. Antes do dia do teste os animais foram habituados às gaiolas por 4 dias com livre acesso a ração e água ou frutose, de acordo com o grupo experimental (n=9 por grupo).

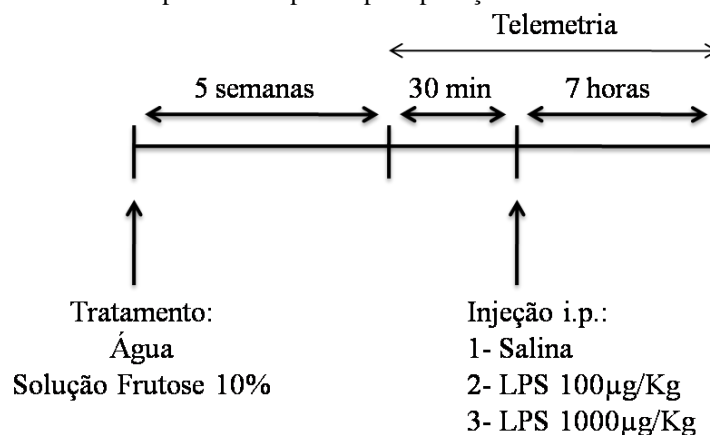
No dia anterior ao experimento os animais foram submetidos a jejum de 12 horas, contudo tiveram acesso irrestrito a água. Duas horas após a injeção de salina ou LPS (administrados com 10 horas de jejum) a ração comercial em pó foi reintroduzida na gaiola. Em seguida, o volume e a ingestão alimentar foram mensurados por subtração do volume e peso remanescentes após 2, 4, 6, 8 e 24 horas a partir da quantidade inicial introduzida na gaiola (RORATO et al., 2012).

A ingestão calórica foi analisada calculando a soma das calorias ingeridas na ração comercial (3,98 Kcal/g), água (0 Kcal/g) e solução de frutose (4 Kcal/g).

3.6 MONITORAMENTO DA TEMPERATURA CORPORAL

Os procedimentos experimentais realizados para o monitoramento da temperatura corporal em animais tratados com água ou dieta rica em frutose e tratamento com veículo ou LPS são demonstrados no delineamento experimental na Figura 7. Após 5 semanas de tratamento com água ou solução de frutose 10% a temperatura corporal foi monitorada através do teste de telemetria, trinta minutos após o início do monitoramento os animais foram tratados com salina, LPS 100µg/Kg ou LPS 1000µg/Kg e a temperatura corporal foi avaliada durante 7 horas após este tratamento.

Figura 7- Protocolo experimental esquemático representando o início do tratamento e o tempo de tratamento com água ou frutose, assim como o momento de realização do monitoramento da temperatura corporal após aplicação de salina ou LPS.



Fonte: Da autora.

O monitoramento da temperatura corporal foi realizado após cinco semanas de tratamento com água ou frutose. Os ratos foram primeiramente anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (Aldrich, Milwaukee, Wis., USA, 250 mg/kg i.p.). Uma laparotomia mediana foi realizada para a inserção de uma cápsula de probe biotelemétrica (modelo PDT-4000 E-Mitter[®], Bend, Oregon, USA) dentro da cavidade peritoneal. Após o implante do transmissor a incisão foi fechada por meio de dois pontos internos feitos no tecido muscular e dois externos feitos no tecido epitelial e a cápsula implantada foi usada para aferições da temperatura corporal. Após a cirurgia os animais foram tratados com benzilpenicilina (100,000 U i.m.) e colocados à temperatura de 32°C durante a recuperação da anestesia. Estes procedimentos foram previamente descritos por (GIUSTI-PAIVA et al., 2003; STEINER et al., 1999).

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante seis ou sete dias. No dia anterior ao teste as caixas foram posicionadas sobre o receptor de telemetria (modelo ER-4000 Energizer/Receiver Mini-Mitter[®], Bend, Oregon, USA) conectado a um computador. No dia do teste a temperatura basal foi calculada pela média das temperaturas aferidas 30 minutos antes da administração de salina (n=8 Controle, n=10 Frutose), LPS 100µg/Kg (n=12 Controle, n=13 Frutose) ou LPS 1000µg/Kg (n=11 Controle, n=13 Frutose), então, a temperatura corporal foi registrada em intervalos de 10 minutos durante 8 horas após esta injeção.

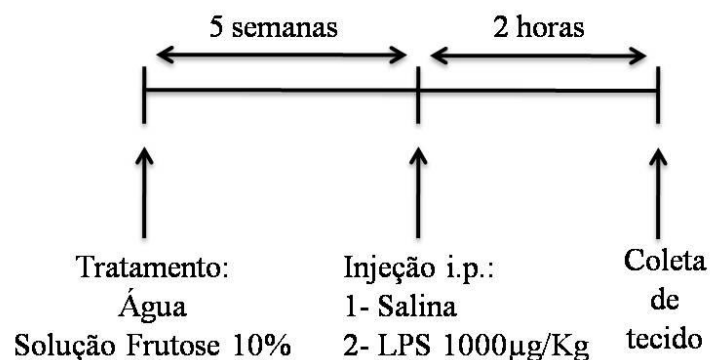
Os dados foram coletados usando software (Vital View, Mini-Mitter). A diferença entre a temperatura média basal e a temperatura obtida a cada intervalo foi

calculada para obtenção do delta de temperatura. O índice térmico (IT, Celsius x-minutos) foi calculado como a área sob a curva das medidas da temperatura corporal entre o intervalo de duas horas e meia e sete horas (SILVA; GIUSTI-PAIVA, 2014).

3.7 EXTRAÇÃO DE RNA E PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

Os procedimentos experimentais realizados para a avaliação da expressão gênica de citocinas através da técnica de PCR-RT são demonstrados no delineamento experimental demonstrado pela Figura 8. Após 5 semanas de tratamento com água ou solução de frutose 10% foi administrado salina ou LPS e duas horas após foram coletados tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal e hipotálamo para posterior análise de expressão gênica através do teste de PCR-RT.

Figura 8- Protocolo experimental esquemático representando o início do tratamento e o tempo de tratamento com água ou frutose, assim como o momento de realização da coleta de tecido para avaliação do teste de PCR após aplicação de salina ou LPS.



Fonte: Da autora.

O total de RNA foi extraído a partir de hipotálamo, tecido adiposo retroperitoneal e tecido adiposo epididimal. Para tanto foram utilizados reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies) e o kit de extração Mini Kit miRNeasy (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. O tecido adiposo retroperitoneal, epididimal e o hipotálamo foram coletados e homogeneizados separadamente com 600 µL de Trizol, em seguida adicionou-se 200 µL de clorofórmio, e todo conteúdo foi

centrifugado por 15 minutos a 1300 rpm. Os sobrenadantes foram retirados, transferidos para outros tubos, adicionou-se 700 µL de etanol (70%), em seguida todo o conteúdo foi transferido para as colunas de extração e centrifugados a 10000 rpm por 1 minuto. O volume do tubo coletor foi novamente transferido, acrescentou-se 350µL de RW1 em cada coluna, e novamente centrifugou-se. Transferiu-se novamente o conteúdo do tubo e adicionou-se 500µL de RPE, centrifugou-se, esse processo foi repetido por duas vezes. O conteúdo do tubo coletor foi descartado, as colunas foram transferidas para eppendorfs de 2 ml os quais foram centrifugados por 1 minuto a 14000 rpm com objetivo de secar ao máximo as colunas. Posteriormente, foram adicionados 30 µL de água RNasefree as colunas e centrifugadas. Para melhorar extração de RNA esse mesmo volume retransferido para a coluna e centrifugado novamente.

A concentração de RNA foi obtida a partir do NanoDrop2000 (ThermoScientific), sendo as concentrações de RNA obtidas em µg/µL. Foram consideradas adequadas as razões $260^{\text{RNA}}/280^{\text{Prot}}$ entre 1,8 e 2,0.

O cDNA foi sintetizado a partir de 1µg do RNA total utilizando o kit Super Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen) com uma mistura de *primers* OligodT (MgCl₂ → 4µL; dNTPs → 2µL; Oligo-DT → 1 µL; Buffer → 2 µL; RNasin → 0,5 µL; AMV → 0,5 µL) que foi colocada no Termociclador com a temperatura e o tempo programados corretamente conforme o protocolo.

As análises da expressão gênica de IL-6, TNF-α e IL1-β (n=4 por grupo) foram realizadas por meio do PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR) utilizando Sybr[®]Green Master Mix (AppliedBiosystems), com o detector de seqüências Rotor-Gene 3000 system (Montreal Biotech, Montreal, QC, Canada). As sequencias de primers são mostradas na Tabela 1. Os resultados são expressos como a razão entre a expressão do gene alvo gliceraldeído 3-fosfato (GAPDH), proteína ribossomal L19 (RPL19) e β-actina para hipotálamo, tecido adiposo retroperitoneal e tecido adiposo epididimal, respectivamente. Estes genes controle foram selecionados pois, não foram observadas variações significativas em sua expressão entre os tratamentos (VINOLO et al., 2012).

Tabela 1- Sequência de primers para análise da expressão gênica IL-6, TNF- α e IL1- β .

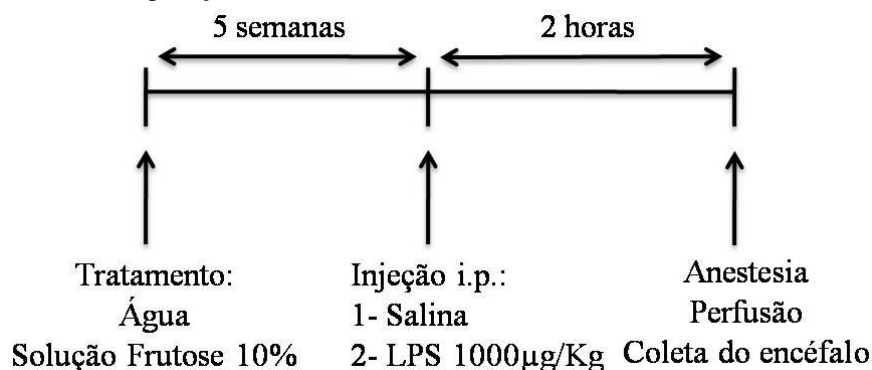
Gene	5' Primer (5'-3')	3' Primer (5'-3')
<i>Gapdh</i>	TCTCTGCTCCTCCCTGTTCT	TACGGCCAAATCCGTTTACACA
<i>Rpl19</i>	CCAATGCCAACTCTCGTCAAC	AAGGTGTTCTTCCGGCATCG
<i>Actb</i>	GTCGAGTCCGCGTCCAC	TCATCCATGGCGAACTGGTG
<i>Il1b</i>	TGGCAACTGTCCCTGAACTC	AGGGCTTGGAAGCAATCCTTA
<i>Il6</i>	CATTCTGTCTCGAGCCCACC	GCTGGAAGTCTCTTGCGGAG
<i>Tnf</i>	GGGCTCCCTCTCATCAGTTC	TCCGCTTGGTGGTTTGCTAC

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

3.8 PERFUSÃO, PREPARAÇÃO DO TECIDO E IMUNOHISTOQUÍMICA PARA c-FOS

Os procedimentos experimentais realizados para a avaliação da atividade neuronal mediante a utilização da técnica de imunohistoquímica para c-FOS são demonstrados na Figura 9. Após 5 semanas de tratamento com água ou solução de frutose 10% foi administrado salina ou LPS, duas horas após os animais foram anestesiados, perfundidos e os encéfalos foram coletados para posterior teste de imunohistoquímica.

Figura 9- Protocolo experimental esquemático representando o início do tratamento e o tempo de tratamento com água ou frutose, assim como o momento de realização da anestesia, perfusão e coleta de tecido após aplicação de salina ou LPS.



Fonte: Da autora.

Os ratos pré-tratados com água ou frutose por 5 semanas foram tratados com LPS de *Escherichia coli* (026: B6 – Sigma Aldrich, USA) 1mg/Kg ou salina estéril (0.1 ml/100g p.c.). Duas horas após, os animais foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (Aldrich, Milwaukee, Wis., USA, 250 mg/kg i.p.) e perfundidos com solução gelada de NaCl a 0.9% contendo heparina (50 UI/l), seguido de formaldeído 4% em tampão fosfato (PB) 0.1 M, pH 7.2. Os cérebros foram então removidos, pós-fixados por 4 horas na solução utilizada para perfusão e estocados em PB contendo 30% sacarose a 4°C. Os encéfalos foram seccionados em cortes de 30 µm de espessura utilizando um criostato, coletados em PB 0.01 M e armazenados em solução anti-freezing até o momento dos procedimentos imunohistoquímicos.

Primeiramente as seções foram incubadas em H₂O₂ 0.03% por 30 minutos e lavadas com PB 0.01 M. Posteriormente, foram incubadas em albumina bovina 5% em PB 0.1 M por uma hora, afim de bloquear os sítios não específicos. Em seguida, incubou-se overnight a temperatura ambiente com anticorpo anti-c-Fos de coelho (Ab-5, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA) diluído 1:10.000 em PB 0.1 M contendo normal goat 2% e Triton X-100 0.3% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Após a lavagem, as seções flutuantes livres foram incubadas com anticorpo biotilado (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA, 1:200 em PB 0.1 M contendo 1.5% normal goat serum) seguido por complexo peroxidase-avidina-biotina (Vector Elite, 1:200 em PB 0.1 M). Cada incubação foi realizada por uma hora a temperatura ambiente. A marcação azul-preta dos núcleos das células foi detectada usando hidrocloreto de diaminobenzidina (DAB, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) intensificado com cloreto de cobalto 1% e sulfato de níquel 1%.

Por fim, as seções foram montadas em lâminas gelatinizadas, secas durante a noite, desidratadas com xileno e cobertas com Entellan. As seções escolhidas para quantificação foram selecionadas usando um atlas do cérebro de rato para verificar a semelhança das áreas neuroanatomicas entre os grupos, experimental e controle.

Os neurônios imunoreativos para c-Fos foram contados na área pré-ótica mediana (MPOA, 0.30 mm anterior ao bregma; n=5 Controle, n=4 Frutose), núcleo da estria terminal (BNST, 0.20 mm anterior ao bregma; n=4 por grupo), área septal lateral (LS, 0.72 mm anterior ao bregma; n=4 por grupo), córtex piriforme (PCx, 0.12 mm anterior ao bregma; n=5 por grupo), núcleo paraventricular (PVN, 1.30 mm

posterior ao bregma; n=5 Salina, n=4 LPS) e núcleo supra-óptico (SON, 1.30 mm posterior ao bregma; n=5 por grupo) (PAXINOS; WATSON, 2007).

Uma área pontilhada para cada área a ser contada foi produzida de acordo com o atlas de cérebro de ratos, assim foi projetada uma delimitação para cada imagem da seção a ser contada (PAXINOS; WATSON, 2007). Posteriormente, as células foram contadas manualmente com o auxílio de um sistema computadorizado incluindo microscópio Nikon Eclipse 80i equipado com câmera digital Nikon DS-Ri1 anexado a um dispositivo de aumento de contraste. A contagem foi realizada unilateralmente em uma seção por animal, e o limiar de coloração positiva foi estabelecido individualmente por dois participantes diferentes que estavam cegos para as condições experimentais. Conforme relatado anteriormente, os resultados finais representam os resultados médios de duas avaliações independentes (VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2014).

3.9 ANALÍSES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados utilizando-se o programa do software Prism GraphPad versão 5.0 e expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Nas análises dos parâmetros bioquímicos, biométricos e hormonais, foi utilizado o teste T. Para avaliação da hiperalgesia inflamatória e edema de pata foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós teste de Newman-Keuls. Nos outros experimentos, o pré-tratamento (água ou solução de frutose) e desafio imunológico (salina ou LPS) foram analisados usando ANOVA de duas vias seguido do pós teste de Bonferroni. O nível de significância foi baseado em valores de p inferiores a 0,05 ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

Os resultados do presente estudo estão apresentados a seguir.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS DISTÚRBIOS METABÓLICOS

Os resultados referentes a caracterização dos distúrbios metabólicos estão apresentados a seguir.

4.1.1 Quantificação da adiposidade abdominal, ganho de peso do fígado e índice de Lee

Após cinco semanas de tratamento com água ou solução de frutose 10% podemos observar que não houve diferença entre o peso corporal total dos ratos. Porém, o tratamento com frutose induziu um aumento significativo no tecido adiposo epididimal ($p < 0,05$), tecido adiposo retroperitoneal ($p < 0,0001$) e peso do fígado ($p < 0,0001$) quando comparado ao controle. Além disso, o índice de Lee ($p < 0,05$) também apresentou um aumento significativo quando comparado ao controle (Tabela 2).

Tabela 2- Parâmetros biométricos em animais tratados com água ou solução de frutose 10%.

Parâmetros	Grupos	
	Controle	Frutose
Peso corporal total inicial (g)	215 ± 12.3	220 ± 8.4
Peso corporal total final (g)	403.5 ± 8.95	385.4 ± 8.19
Tecido adiposo epididimal (g/100 g peso)	3.66 ± 0.23	4.6 ± 0.25*
Tecido adiposo retroperitoneal (g/100 g peso)	2.83 ± 0.21	6.02 ± 0.39****
Peso do fígado (g/100 g peso)	3.18 ± 0.05	3.88 ± 0.12****
Índice de Lee	2.95 ± 0.02	3.03 ± 0.02*

Nota: Valores expressos como média (±EPM) * $p < 0,05$; **** $p < 0,001$. Teste *t* de Student.

Fonte: Da autora.

4.1.2 Dosagens bioquímicas

Os animais tratados com frutose demonstraram níveis elevados de glicose ($p < 0,01$), triglicérides ($p < 0,0001$), colesterol total ($p < 0,01$), colesterol HDL ($p < 0,05$) e colesterol não HDL ($p < 0,01$) quando comparados aos animais que somente ingeriram água, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3- Parâmetros bioquímicos em animais tratados com água ou solução de frutose 10%.

Parâmetros Bioquímicos	Grupos	
	Controle	Frutose
Glicose (mg/dL)	122.4 ± 1.68	138.1 ± 3.59**
Triglicérides (mg/dL)	56.45 ± 6.72	151.4 ± 12.73****
Colesterol Total (mg/dL)	50.78 ± 2.02	61.39 ± 1.63**
Colesterol HDL (mg/dL)	36.78 ± 1.62	43.95 ± 2.19*
Colesterol não HDL (mg/dL)	15.20 ± 1.079	23.06 ± 2.15**

Nota: Valores expressos como média (±EPM) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,001$. Teste *t* de Student

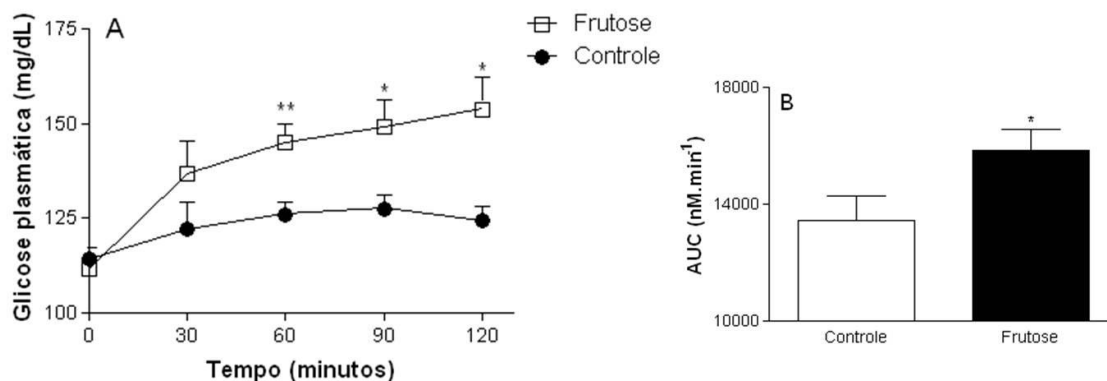
Fonte: Da autora.

4.1.3 Teste de Tolerância oral a Glicose (GTT_o) e a Insulina (K_{ITT})

A glicemia durante o teste de tolerância oral a glicose em animais tratados com água ou frutose é apresentado na Figura 10. Os animais tratados com frutose apresentaram um aumento significativo nos níveis de glicose plasmática nos tempos de 60 ($p < 0,01$), 90 ($p < 0,05$) e 120 minutos ($p < 0,05$) após a sobrecarga de glicose quando comparados com o controle (Figura 10A). A área sob a curva (AUC), obtida durante o teste de GTT_o, revelou um aumento significativo na resistência a glicose em animais tratados com frutose quando comparados com o controle ($p < 0,05$, Fig. 10B).

A resposta a tolerância a insulina está representada na Figura 11. Como podemos observar os níveis de glicose plasmática foram significativamente maiores nos tempos de 12 ($p < 0,01$) e 16 minutos ($p < 0,05$) após a sobrecarga de insulina quando comparados com o controle (Figura 11A). A taxa de decaimento da glicose (K_{ITT}) foi significativamente menor em animais tratados com frutose quando comparada com o controle ($p < 0,01$, Fig. 11B).

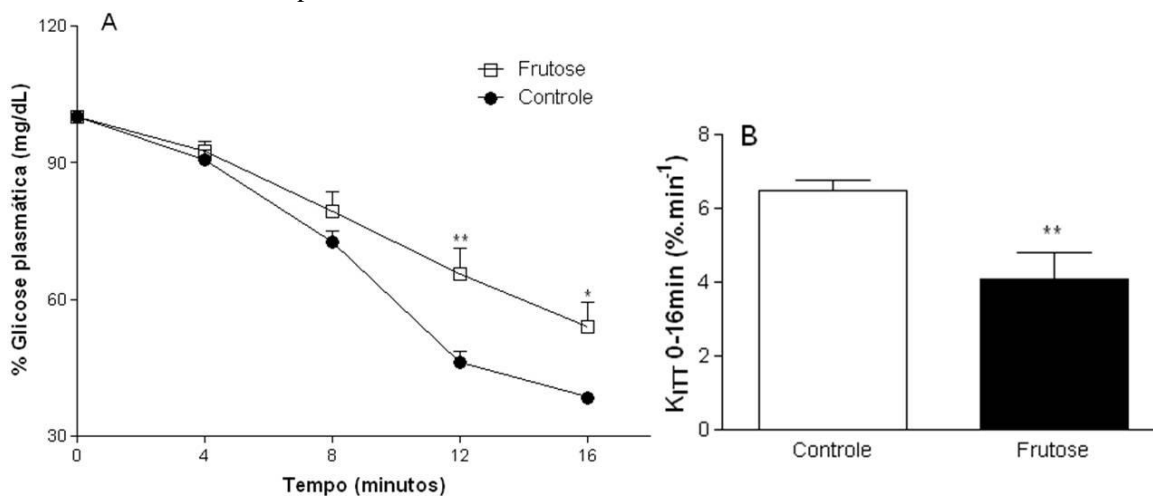
Figura 10- Perfil glicêmico dos ratos tratados com água ou solução de frutose 10% mediante ao teste de tolerância oral à glicose.



Legenda: A) Níveis plasmáticos de glicose nos dois grupos; B) Área sob a curva. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle. Valores expressos como média \pm EPM (Teste t de Student).

Fonte: Da autora.

Figura 11- Perfil glicêmico dos ratos tratados com água ou solução de frutose 10% mediante o teste de tolerância intraperitoneal à insulina.



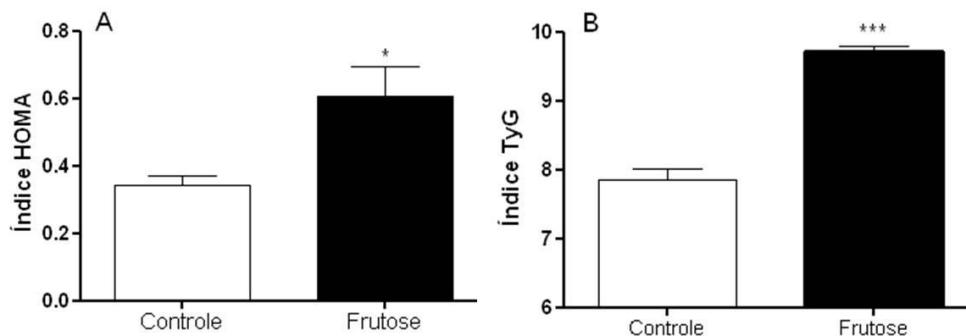
Legenda: A) Níveis plasmáticos de glicose; B) Taxa de decaimento de glicose (K_{ITT}). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; quando comparado ao grupo controle. Valores expressos como média \pm EPM (Teste t de Student).

Fonte: Da autora.

4.1.4 Determinação da resistência à insulina

Com relação à determinação da resistência a insulina os índices HOMA e TyG foram calculados e estão representados na Figura 12. Como se pode observar na Figura 12A o índice HOMA demonstrou-se maior em animais tratados com frutose ($0,6 \pm 0,09$) quando comparados com animais controle ($0,34 \pm 0,03$, $p < 0,05$). Por fim, o índice TyG também exibiu a mesma resposta (Frutose: $9,71 \pm 0,073$, vs Controle: $7,84 \pm 0,167$, $p < 0,0001$, Fig. 12B).

Figura 12- Parâmetros de resistência a insulina em ratos tratados com água ou solução de frutose 10%.



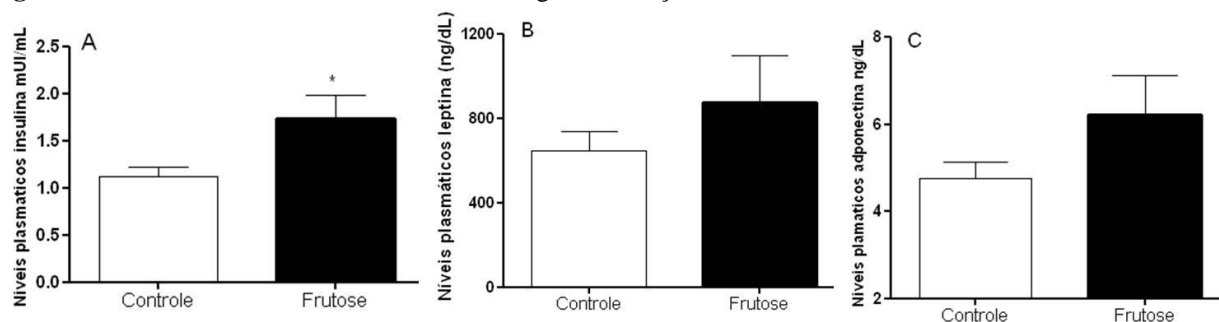
Legenda: A) Índice HOMA; B) Índice TyG. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$; quando comparado ao grupo controle. Valores expressos como média \pm EPM (Teste *t* de Student).

Fonte: Da autora.

4.1.5 Dosagem hormonal para Insulina, Leptina e Adiponectina

O tratamento durante cinco semanas de solução de frutose 10% aumentou de maneira significativa os níveis de insulina quando comparado com o tratamento somente com água (1.73 ± 0.25 e 1.12 ± 0.1 , respectivamente, $p < 0,05$) (Figura 13A). Já os hormônios leptina e adiponectina não apresentaram diferença significativa frente aos diferentes tratamentos conforme demonstrado na Figura 13B e C, respectivamente.

Figura 13- Perfil hormonal de ratos tratados com água ou solução de frutose 10%.



Legenda: A) Níveis plasmáticos de insulina; B) Níveis plasmáticos de leptina; C) Níveis plasmáticos de adiponectina. *, $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle. Valores expressos como média \pm EPM (Teste *t* de Student).

Fonte: Da autora.

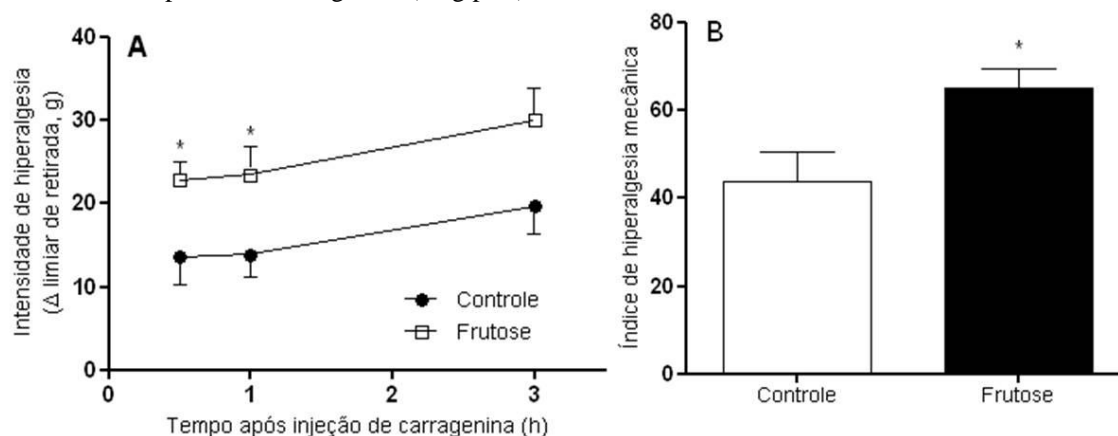
4.2 AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA INFLAMATÓRIA PERIFÉRICA

Os resultados referentes a avaliação da hiperalgesia inflamatória periférica estão descritos a seguir.

4.2.1 Teste de Von Frey eletrônico

Carragenina, LPS e prostaglandina E_2 foram utilizados como indutores da hiperalgesia inflamatória (Figuras 14, 15, 16, respectivamente). Após o tratamento por cinco semanas com água ou frutose pode-se observar diferença significativa na intensidade de hiperalgesia após injeção de carragenina (Fator tratamento: $F_{1,37} = 14.24$; $p = 0,0006$; Fator tempo: $F_{2,37} = 2.77$, $p = 0,076$; Interação tratamento x tempo: $F_{2,37} = 0.017$, $p = 0,982$, Fig. 14A). O índice de hiperalgesia mecânica, analisado através da área sob a curva, foi maior em animais tratados com frutose que os animais do grupo controle ($p < 0,05$, Fig. 14B).

Figura 14- Efeito da solução de frutose 10% ou água na hiperalgesia inflamatória induzida por injeção intraplantar de carragenina (1mg/pata) em ratos.

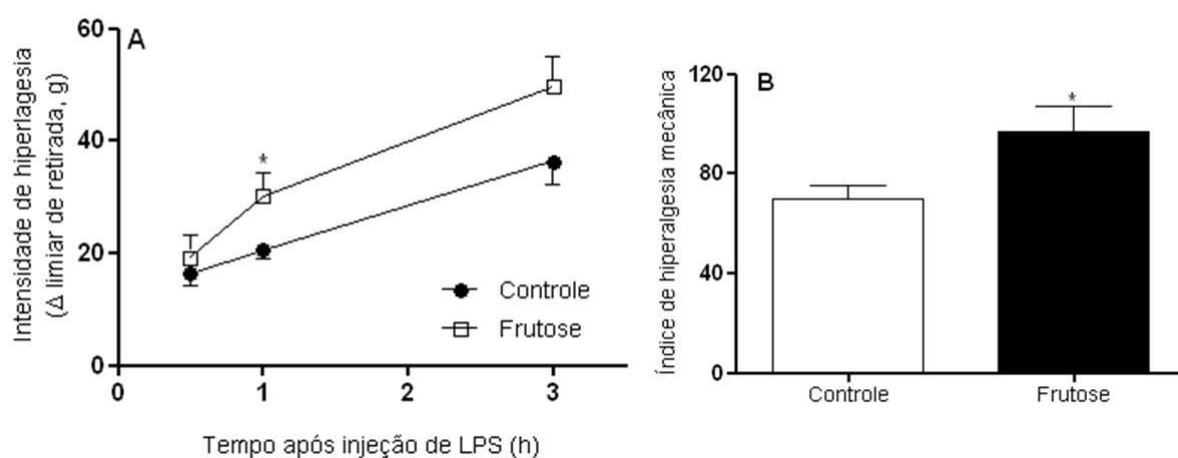


Legenda: Intensidade de hiperalgesia (A). Índice de hiperalgesia mecânica representado pela área sob a curva (B). *, $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle. Valores expressos como média \pm EPM. ANOVA *Two Way*, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls e Teste *t* de *Student* para o índice de hiperalgesia mecânica.

Fonte: Da autora.

Two-way ANOVA indicou um efeito significativo no tratamento com frutose e no tempo após administração do LPS, mas não mostrou significância na interação entre esses dois fatores no Δ limiar de retirada (g) (Fator tratamento: $F_{1,45} = 7.69$; $p = 0,008$; Fator tempo: $F_{2,45} = 22.61$, $p < 0,0001$; Interação tratamento x tempo: $F_{2,45} = 0.94$, $p = 0,397$, Fig. 15A). O índice de hiperalgesia mecânica foi maior no grupo frutose quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$, Fig. 15B).

Figura 15- Efeito da solução de frutose 10% ou água na hiperalgesia inflamatória induzida por injeção intraplantar de LPS (100 μ g/pata) em ratos.

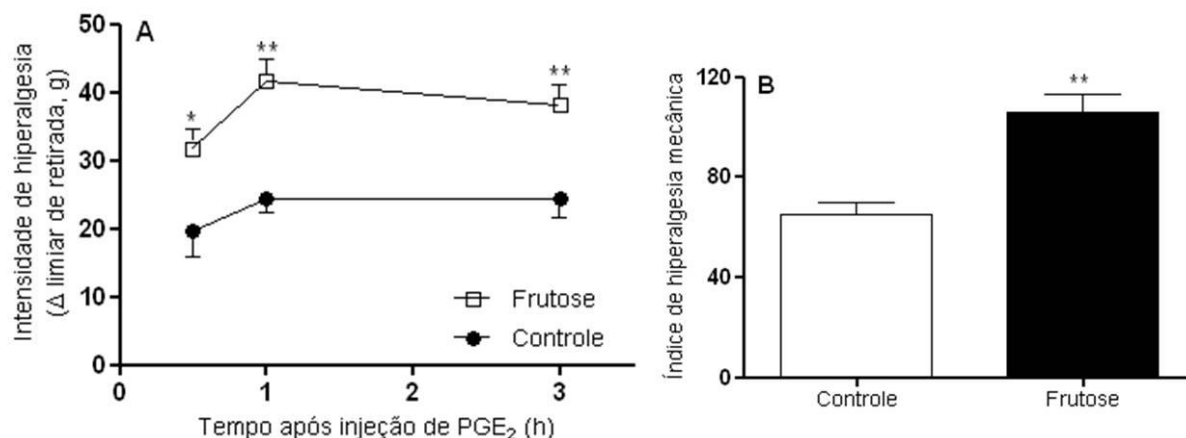


Legenda: Intensidade de hiperalgesia (A). Índice de hiperalgesia mecânica representado pela área sob a curva (B). *, $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle. Valores expressos como média \pm EPM. ANOVA *Two Way*, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls e Teste *t* de *Student* para o índice de hiperalgesia mecânica.

Fonte: Da autora.

O tratamento com frutose causou um aumento no Δ limiar de retirada (g) após injeção de PGE₂ (Fator tratamento: $F_{1,36} = 30.07$; $p < 0,0001$; Fator tempo: $F_{2,36} = 2.88$, $p = 0,069$; Interação tratamento x tempo: $F_{2,36} = 0.328$, $p = 0,722$, Fig. 16A). A área sob a curva da intensidade de hiperalgesia, índice de hiperalgesia mecânica, mostrou-se maior em animais tratados com frutose comparados com animais controle ($p < 0,01$, Fig. 16B).

Figura 16- Efeito da solução de frutose 10% ou água na hiperalgesia inflamatória induzida por injeção intraplantar de PGE₂ (100ng/pata) em ratos.



Legenda: Intensidade de hiperalgesia (A). Índice de hiperalgesia mecânica representado pela área sob a curva (B). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle. Valores expressos como média \pm EPM. ANOVA *Two Way*, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls e Teste *t* de *Student* para o índice de hiperalgesia mecânica.

Fonte: Da autora.

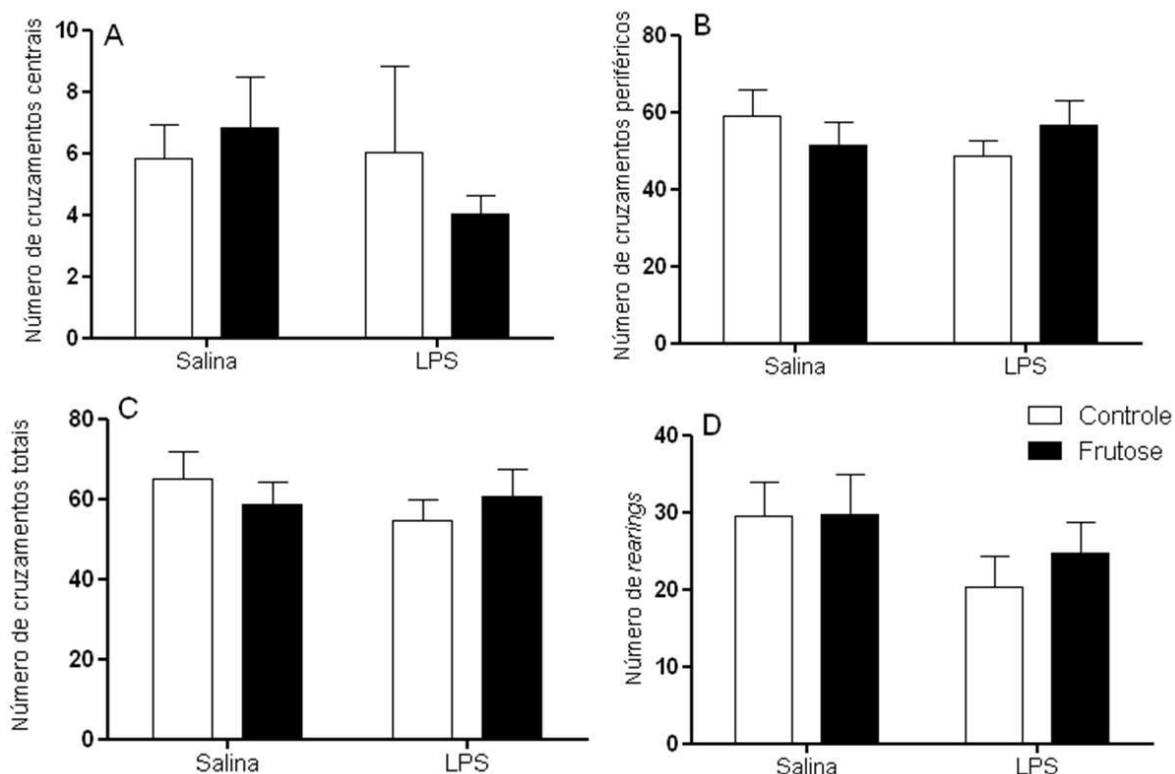
4.3 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOENTIO

Os resultados relacionados a avaliação do comportamento doentio estão demonstrados a seguir.

4.3.1 Avaliação do efeito do LPS sobre o teste de campo aberto

Decorridas duas horas da aplicação do LPS na dose de 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ os animais submetidos ao teste de campo aberto não demonstraram alterações significativas nos cruzamentos centrais (Figura 17A), nos cruzamentos periféricos (Figura 17B) nem no total de cruzamentos (Figura 17C). O número de *rearings* (Figura 17D) também não demonstrou diminuição significativa com relação à dose aplicada e tempo analisado.

Figura 17- Efeitos do LPS (10 µg/Kg) em ratos tratados com água (Controle) e tratados com solução de frutose 10% (Frutose) no Teste Campo Aberto.



Legenda: Análises realizadas 02 horas após a aplicação do LPS. A) Número de entradas no centro; B) Número de entradas na periferia; C) Número de Cruzamentos totais e D) Número de *Rearings*. Valores expressos como média ± EPM. ANOVA *Two Way*, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

Fonte: Da autora.

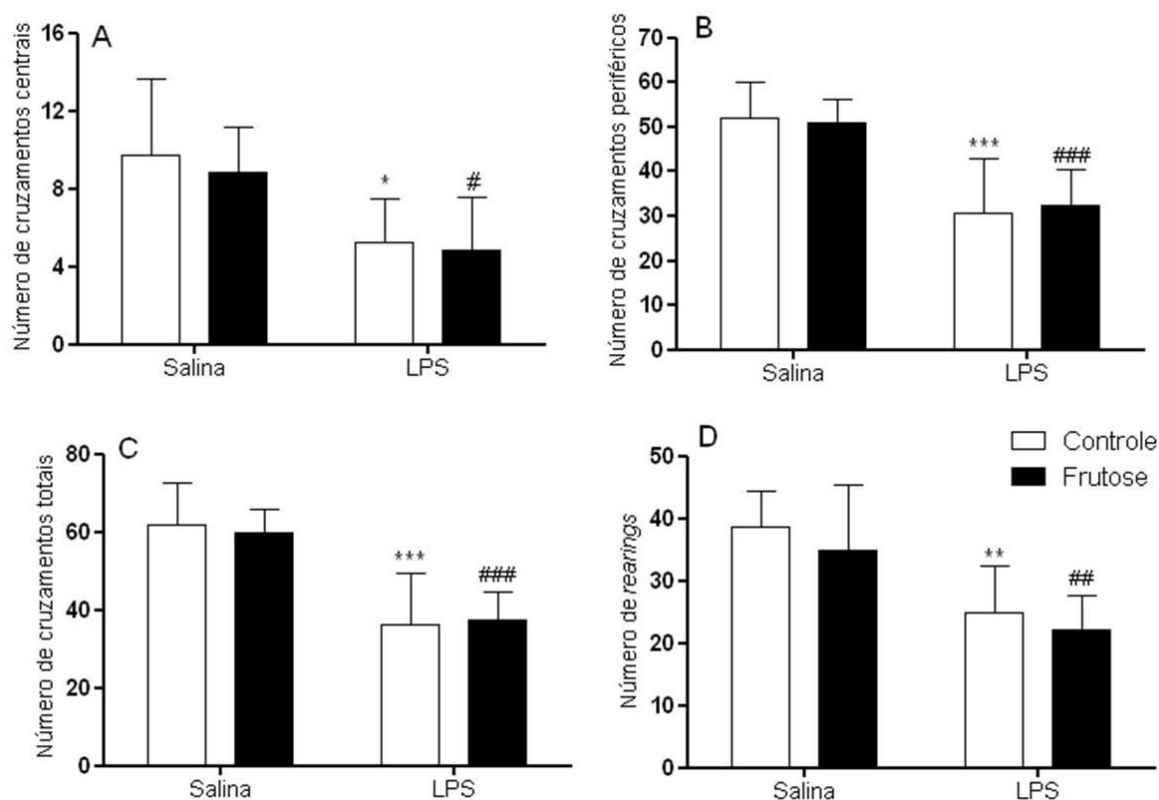
Após duas horas da aplicação do LPS na dose de 100 µg/Kg podemos observar uma diminuição significativa nos cruzamentos centrais (Figura 18A), nos cruzamentos periféricos (Figura 18B), no total de cruzamentos (Figura 18C) e no número de *rearings* (Figura 18D). Porém, o tratamento com frutose ou a interação entre esses dois fatores não causou efeito significativo no teste de campo aberto (Tabela 4).

Tabela 4- Análises de variância de duas vias dos grupos controle e pré-tratados com solução de frutose 10% (pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico) no teste do Campo Aberto.

Parâmetros	Desafio imunológico	Pré-tratamento	Interação
Centro	$F_{1,27} = 17.31, p = 0,0003$	$F_{1,27} = 0.35, p = 0,5593$	$F_{1,27} = 0.062, p = 0,8042$
Periferia	$F_{1,27} = 38.51, p < 0,0001$	$F_{1,27} = 0.0023, p = 0,96$	$F_{1,27} = 0.2, p = 0,66$
Total	$F_{1,27} = 44.26, p < 0,0001$	$F_{1,27} = 0.015, p = 0,903$	$F_{1,27} = 0.2182, p = 0,644$
Rearings	$F_{1,27} = 24.52, p < 0,0001$	$F_{1,27} = 1.52, p = 0,228$	$F_{1,27} = 0.0416, p = 0,84$

Fonte: Da autora.

Figura 18- Efeitos do LPS (100 µg/Kg) em ratos tratados com água (Controle) e tratados com solução de frutose 10% (Frutose) no Teste Campo Aberto.



Legenda: Análises realizadas 02 horas após a aplicação do LPS. A) Número de entradas no centro; B) Número de entradas na periferia; C) Número de Cruzamentos totais e D) Número de *Rearings*. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ quando comparado ao grupo salina controle. #, $p < 0,05$; ##, $p < 0,01$; ###, $p < 0,001$ quando comparado ao grupo salina frutose. Valores expressos como média \pm EPM. ANOVA *Two Way*, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

Fonte: Da autora.

Duas horas após a administração de LPS na dose de 1000 µg/Kg pode-se verificar uma diminuição significativa nos cruzamentos centrais (Figura 19A), nos cruzamentos periféricos (Figura 19B), no total de cruzamentos (Figura 19C) e no

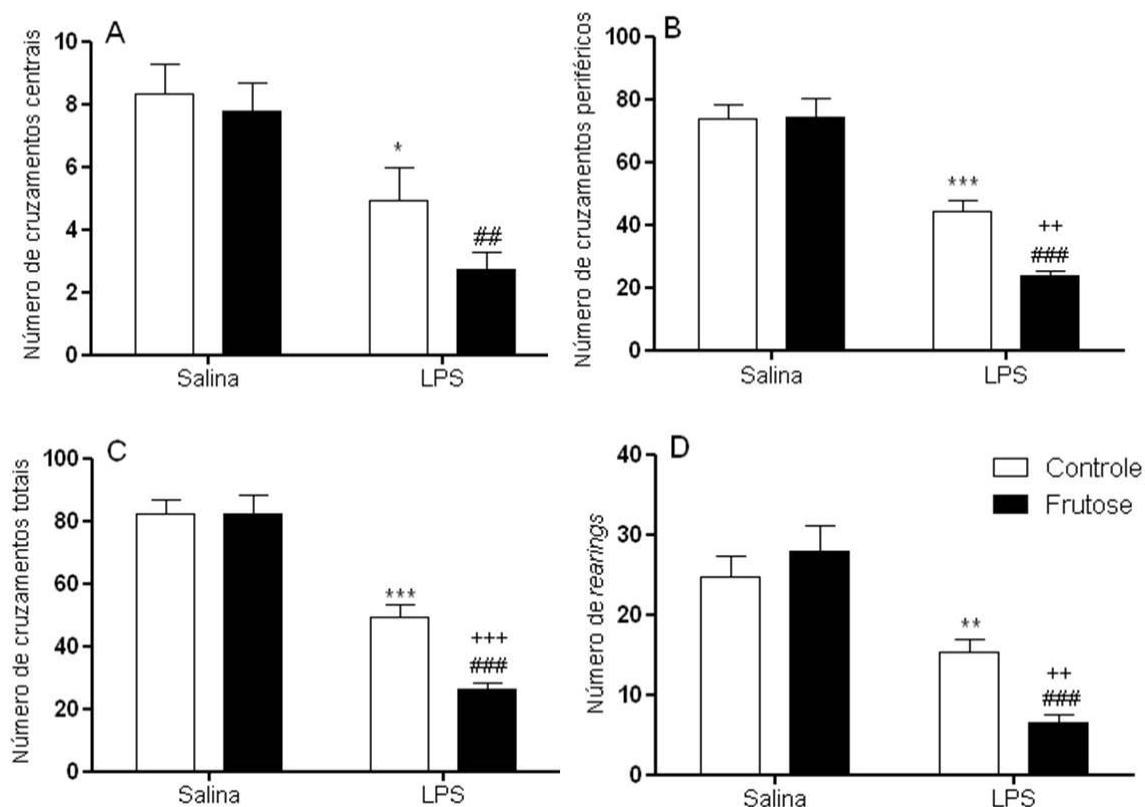
número de *rearings* (Figura 19D). O tratamento com frutose exacerbou essa diminuição, além disso, podemos observar um efeito significativo na interação entre esses dois fatores (Tabela 5).

Tabela 5- Análises de variância de duas vias dos grupos controle e pré-tratados com solução de frutose 10% (pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico) no teste do Campo Aberto.

Parâmetros	Desafio imunológico	Pré-tratamento	Interação
Centro	$F_{1,37} = 21.97, p < 0,001$	$F_{1,37} = 2.3, p = 0,137$	$F_{1,37} = 0.82, p = 0,37$
Periferia	$F_{1,37} = 96.23, p < 0,001$	$F_{1,37} = 5.89, p < 0,05$	$F_{1,37} = 6.64, p < 0,05$
Total	$F_{1,37} = 101.9, p < 0,001$	$F_{1,37} = 6.62, p < 0,05$	$F_{1,37} = 6.68, p < 0,05$
<i>Rearings</i>	$F_{1,37} = 48.9, p < 0,001$	$F_{1,37} = 1.67, p = 0,204$	$F_{1,37} = 7.43; p < 0,01$

Fonte: Da autora.

Figura 19- Efeitos do LPS (1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) em ratos tratados com água (Controle) e tratados com solução de frutose 10% (Frutose) no Teste Campo Aberto.



Legenda: Análises realizadas 02 horas após a aplicação do LPS. A) Número de entradas no centro; B) Número de entradas na periferia; C) Número de Cruzamentos totais e D) Número de *Rearings*. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ quando comparado ao grupo salina controle. ##, $p < 0,01$; ###, $p < 0,001$ quando comparado ao grupo salina frutose. +, $p < 0,01$; ++, $p < 0,001$ quando comparado ao grupo LPS Controle. Valores expressos como média \pm EPM. ANOVA *Two Way*, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

Fonte: Da autora.

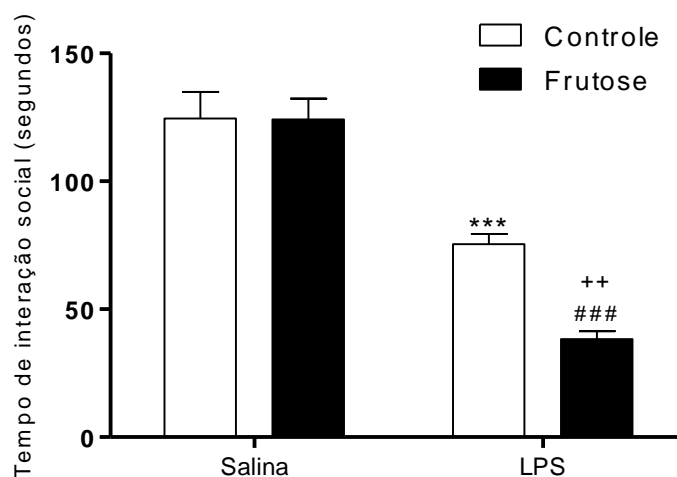
Diante desses resultados a dose escolhida para avaliar o efeito do LPS sobre o comportamento doenteio através dos testes de interação social, ingestão alimentar e febre em animais tratados com água ou solução de frutose 10% por cinco semanas foi a de 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ e os protocolos experimentais tiveram o início de sua investigação com 2 horas da aplicação do LPS.

4.3.2 Interação Social

Após cinco semanas de tratamento com água ou solução de frutose o tempo de interação social foi avaliado, conforme demonstrado na Figura 20. No teste de interação

social, ANOVA de duas vias revelou uma redução no tempo total de interação, e este efeito foi acentuado em animais pré-tratados com frutose (Fator desafio imunológico: $F_{1,31} = 86.87$, $p < 0,001$; Fator tratamento: $F_{1,31} = 6.65$, $p < 0,05$; Interação: $F_{1,31} = 6.42$; $p < 0,05$).

Figura 20- Efeitos do LPS (1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) em ratos tratados com água (Controle) e tratados com solução de frutose 10% (Frutose) no Teste de Interação Social.



Legenda: Análise feita após 02 horas da aplicação. Valores expressos como média \pm EPM. ***, $p < 0,001$ quando comparado ao grupo salina controle. ###, $p < 0,001$ quando comparado ao grupo salina frutose. ++, $p < 0,01$ quando comparado ao grupo LPS Controle. ANOVA *Two Way*, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

Fonte: Da autora.

4.3.3 Ingestão Alimentar

A administração de LPS no grupo controle reduziu a ingestão alimentar e ingestão calórica quando comparado ao grupo Salina. Este efeito pode ser observado duas horas após o desafio imunológico. Os animais pré-tratados com frutose também reduziram a ingestão alimentar, de solução e ingestão calórica após tratamento com LPS quando comparados ao grupo Salina. Após 24 horas da administração de LPS, pode-se observar uma diminuição da ingestão alimentar, bem como uma redução na ingestão de líquido e na ingestão calórica em animais controle tratados com LPS. Animais pré-tratados com frutose apresentaram uma diminuição acentuada desses parâmetros após

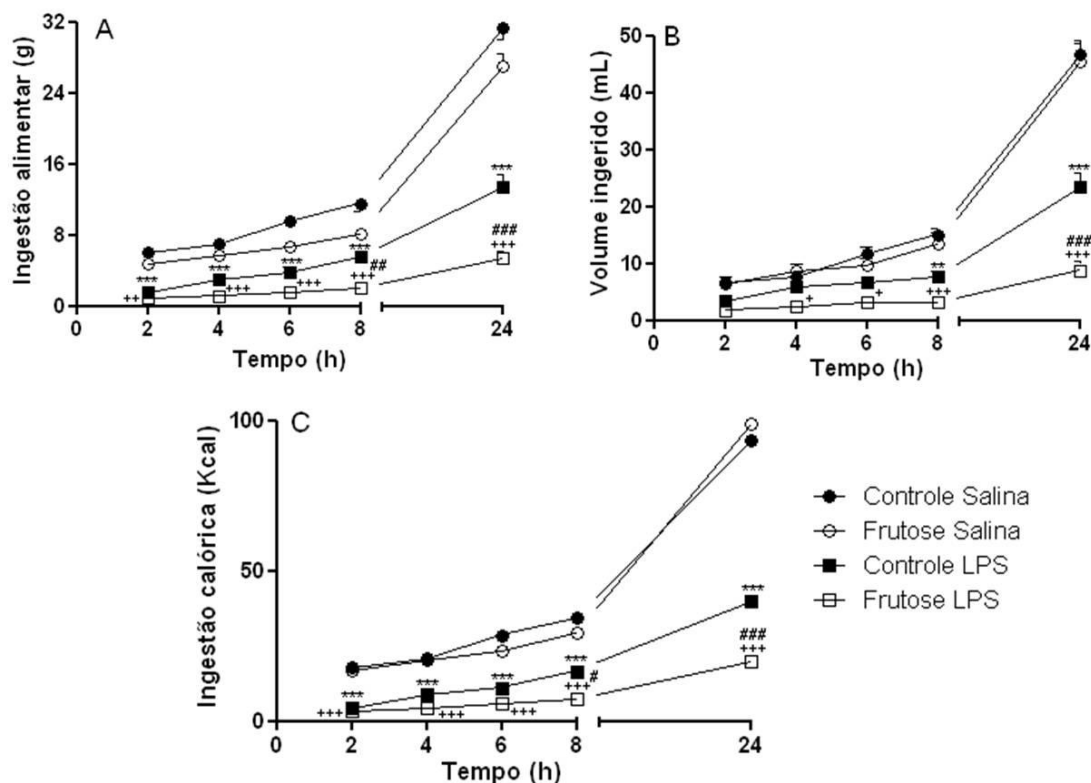
tratamento com LPS quando comparado com animais controle, conforme demonstrado na Figura 21, Tabela 6.

Tabela 6- Análises de variância de duas vias dos grupos controle e pré-tratados com solução de frutose 10% (pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico) no teste de Ingestão Alimentar.

Parâmetros	Fator Desafio imunológico	Fator Pré-tratamento	Interação
Ingestão Alimentar	$F_{1,32} = 244.3; p < 0,001$	$F_{1,32} = 22.11; p < 0,001$	$F_{1,32} = 2.14; p = 0,153$
Ingestão Solução	$F_{1,32} = 142.8; p < 0,001$	$F_{1,32} = 10.05; p < 0,01$	$F_{1,32} = 7.2; p < 0,05$
Ingestão calórica	$F_{1,32} = 292.5; p < 0,001$	$F_{1,32} = 7.11; p < 0,05$	$F_{1,32} = 8.52; p < 0,01$

Fonte: Da autora.

Figura 21- Efeitos do LPS (1000 µg/Kg) em ratos tratados com água (Controle) e tratados com solução de frutose 10% (Frutose) no Teste de Ingestão Alimentar.



Legenda: A) Ingestão Alimentar; ***, $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Controle Salina. ++, $p < 0,01$; +++, $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Frutose Salina. ##, $p < 0,01$; ###, $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Controle LPS. B) Volume ingerido; *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Controle Salina. +, $p < 0,05$; +++, $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Frutose Salina. ###, $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Controle LPS. C) Ingestão calórica; ***, $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Controle Salina. +++, $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Frutose Salina. #, $p < 0,05$; ###, $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Controle LPS. Valores expressos como média ± EPM. ANOVA *Two Way*, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

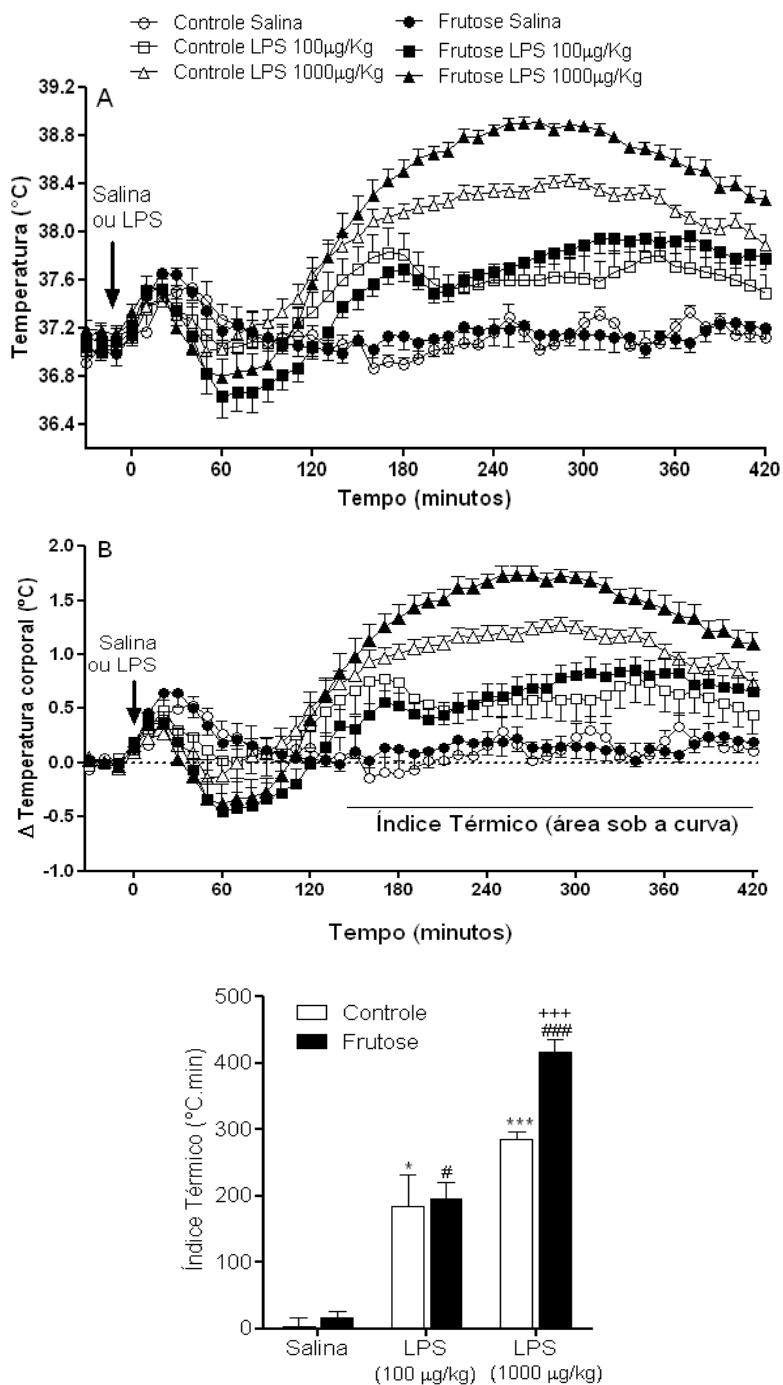
Fonte: Da autora.

4.4 MONITORAMENTO DA TEMPERATURA CORPORAL

A Figura 22A mostra o curso temporal da temperatura corpórea depois da administração de salina ou LPS em animais pré-tratados com água ou frutose. A injeção de LPS em animais controle induziu um aumento na temperatura corpórea (febre, Fig. 22B), como evidenciado pelo aumento no índice térmico. O índice térmico calculado a partir de 150 a 420 min depois da administração de salina ou LPS (Fig. 22B) mostrou um aumento na temperatura corpórea em ambos os grupos pré tratados com água ou frutose,

mas esse aumento foi maior no grupo frutose tratado com LPS (Fator desafio imunológico: $F_{2,55} = 71.06$, $p < 0,001$; Fator pré-tratamento: $F_{1,55} = 5.44$, $p < 0,05$; Interação: $F_{2,55} = 3.36$, $p < 0,05$).

Figura 22- Efeitos do LPS (100 e 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) em ratos controle (Controle) e tratados com solução de frutose 10% (Frutose) sobre a termorregulação.



Legenda: A) curso temporal da temperatura corpórea; B) variação da temperatura corporal; C) área sob a curva do índice térmico do período entre 02 e 07 horas. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com Controle Salina. # $p < 0,05$ quando comparado com Frutose Salina. *** $p < 0,001$ comparado com o grupo Controle Salina. ###, $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Frutose Salina. +++, $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Controle LPS (1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). ANOVA *Two Way*, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

Fonte: Da autora.

4.5 EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO HIPOTÁLAMO E TECIDO ADIPOSEO

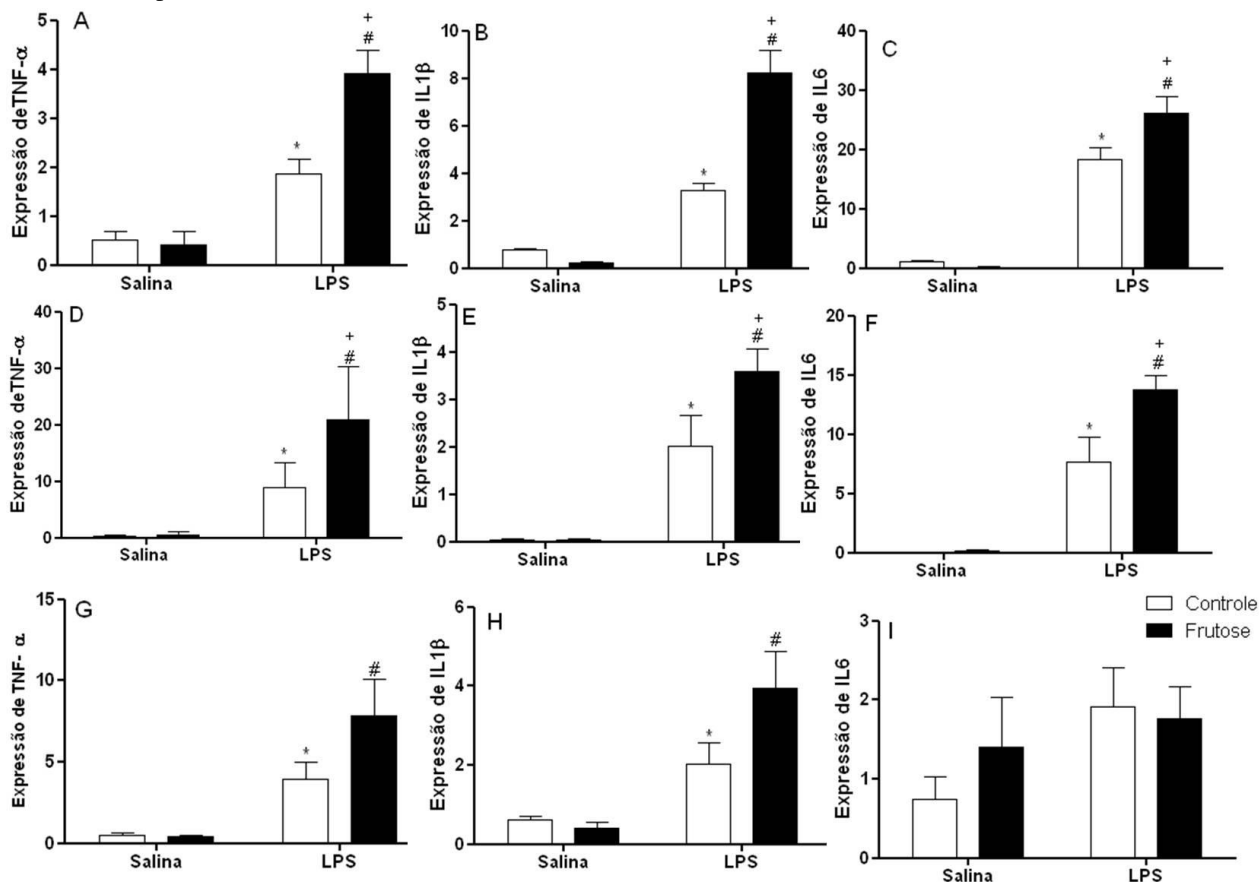
O tratamento com LPS aumentou a expressão gênica de TNF- α , IL-1 β and IL-6 no hipotálamo comparado com o tratamento com salina. O pré-tratamento com solução de frutose exacerbou o aumento da expressão dessas citocinas induzido por LPS quando comparado ao grupo controle. Da mesma maneira, a administração de LPS aumentou a expressão gênica de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no tecido adiposo retroperitoneal, e esta resposta foi acentuada em animais pré-tratados com frutose. Além disso, no tecido adiposo epididimal, a administração de LPS aumentou TNF- α e IL1- β , mas não IL6. A expressão gênica de citocinas no tecido adiposo epididimal não foi diferenciada devido o pré-tratamento com solução de frutose, conforme demonstrado na Tabela 7, Figura 23.

Tabela 7- Análises de variância de duas vias dos grupos controle e pré-tratados com solução de frutose 10% (pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico) na expressão de citocinas no hipotálamo e tecido adiposo.

	Fator Desafio Imunológico	Fator pré- tratamento	Interação
Hipotálamo			
TNF- α	$F_{1,15} = 51.3; p < 0,001$	$F_{1,15} = 8.35, p < 0,05$	$F_{1,15} = 10.2; p < 0,01$
IL-1 β	$F_{1,15} = 37.5; p < 0,001$	$F_{1,15} = 4.40; p = 0,053$	$F_{1,15} = 8.69; p < 0,01$
IL-6	$F_{1,15} = 72.8; p < 0,001$	$F_{1,15} = 5.39; p < 0,05$	$F_{2,55} = 8.35; p < 0,05$
Tecido adiposo Retroperitoneal			
TNF- α	$F_{1,15} = 30.2; p < 0,001$	$F_{1,15} = 7.78; p < 0,05$	$F_{1,15} = 7.25; p < 0,05$
IL-1 β	$F_{1,15} = 41.1; p < 0,001$	$F_{1,15} = 6.21; p < 0,05$	$F_{1,15} = 6.09; p < 0,05$
IL-6	$F_{1,15} = 76.3; p < 0,001$	$F_{1,15} = 6.65; p < 0,05$	$F_{1,15} = 5.97; p < 0,05$
Tecido adiposo Epididimal			
TNF- α	$F_{1,15} = 16.9; p < 0,001$	$F_{1,15} = 2.08; p > 0,05$	$F_{1,15} = 2.25; p > 0,05$
IL-1 β	$F_{1,15} = 16.1; p < 0,01$	$F_{1,15} = 1.38; p > 0,05$	$F_{1,15} = 2.02; p > 0,05$
IL-6	$F_{1,15} = 2.89; p > 0,05$	$F_{1,15} = 0.83; p > 0,05$	$F_{1,15} = 0.33; p > 0,05$

Fonte: Da autora.

Figura 23- Efeitos do LPS (1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) em ratos controle (Controle) e tratados com solução de frutose 10% (Frutose) sobre a expressão gênica de citocinas nos tecidos adiposos retroperitoneal, epididimal e hipotálamo.



Legenda: Hipotálamo: A) TNF- α ; B) IL1- β ; C) IL6. Tecido adiposo retroperitoneal: D) TNF- α ; E) IL1- β ; F) IL6. Tecido adiposo epididimal: G) TNF- α ; H) IL1- β ; I) IL6. Valores expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$ comparado Controle Salina. ###, $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Frutose Salina. ANOVA *Two Way*, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

Fonte: Da autora.

4.6 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA c-FOS

O tratamento com LPS aumentou o número de neurônios marcados para c-Fos nas áreas bed núcleo da estria terminal (BNST), área pré-ótica mediana (MPOA), núcleo paraventricular (PVN) e núcleo supra-ótico (SON) quando comparado com o tratamento com salina (Tabela 8). O pré-tratamento com solução de frutose exacerbou o aumento de neurônios marcados para c-Fos no BNST, córtex piriforme (PCx), MPOA, área septal lateral (LS) e SON e induzido por LPS quando comparado ao grupo que apenas ingeriu água por cinco semanas (Tabela 9, Figura 24).

Tabela 8- Efeitos da solução de frutose ou água sobre o números de células positivas para c-Fos no BNST, SON, PCx, MPOA, LS e PVN depois da administração de salina ou LPS (1000 µg/Kg).

c-Fos	Grupos experimentais			
	Controle+Sal	Controle+LPS	Frutose+Sal	Frutose+LPS
BNST	33.00±1.91	61.75±0.63*	37.00±2.34	71.75±1.10* [#]
PCx	118.0±4.07	147.6±20.34	119.8±11.34	232.0±12.00* [#]
MPOA	80.20±6.38	153.0±4.25*	95.25±1.93*	207.8±10.9* [#]
LS	115.0±13.45	118.5±10.73	99.50±9.53	188.3±9.86* [#]
PVN	70.40± 5.71	155.7± 33.7*	68.00± 9.13	166.7± 15.6*
SON	14.20±1.74	53.00±6.47*	12.00±1.22	87.60±7.49* [#]

Nota: Valores expressos como média ± E. P. M. * $p < 0,05$; comparando com Controle+Sal. # $p < 0,05$; comparando com Controle+LPS.

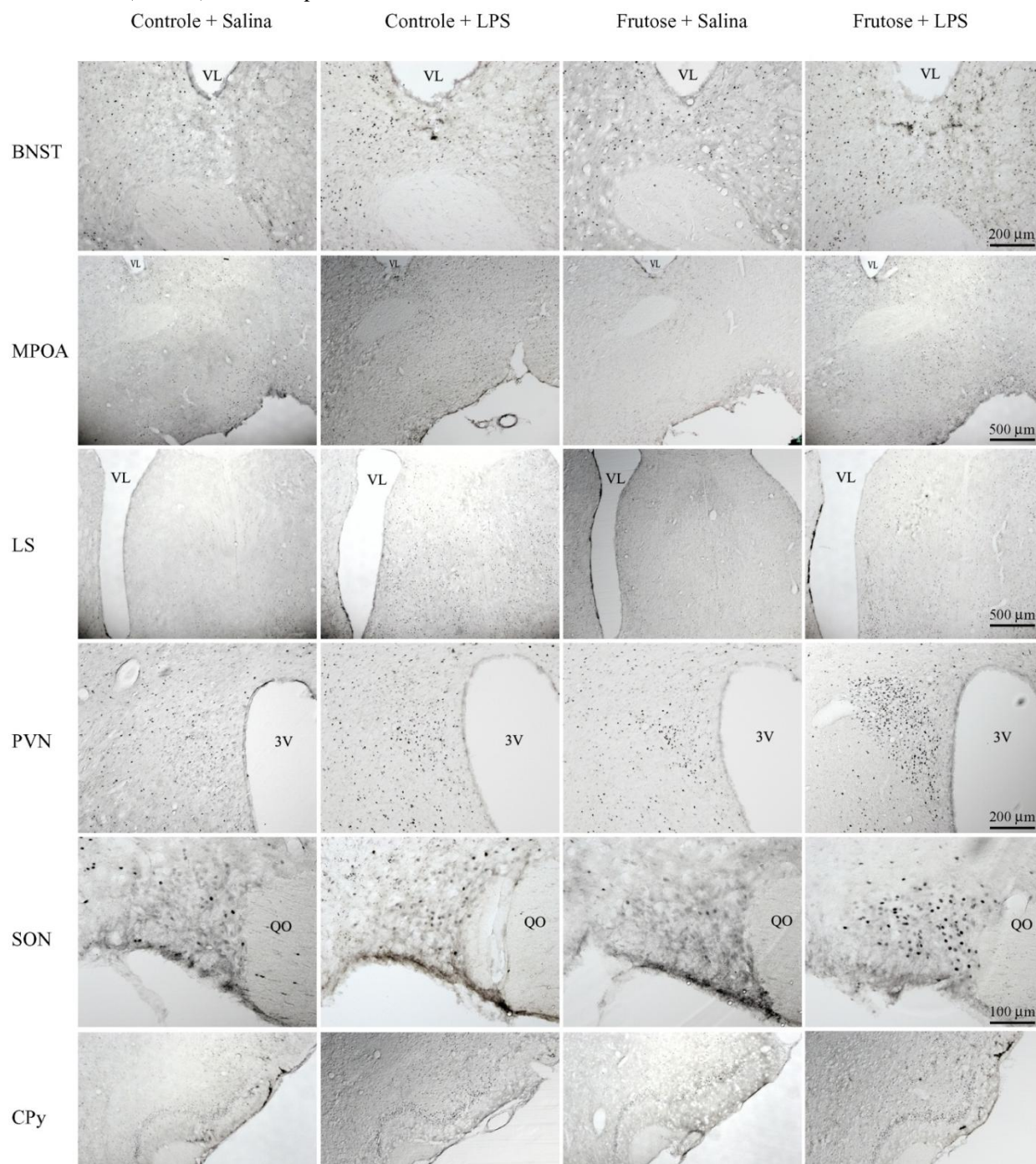
Fonte: Da autora.

Tabela 9- Análise de variância Two-way de grupos tratados com solução de frutose ou água (fator pré-tratamento) e submetidos a administração de salina ou LPS (fator desafio imunológico) nos números de neurônios marcados para c-Fos.

Área cerebral	Fator desafio imunológico	Fator pré-tratamento	Interação
BNST	$F_{1,12} = 373; p < 0,001$	$F_{1,12} = 18.1; p < 0,05$	$F_{1,12} = 3.34; p = 0,09$
PCx	$F_{1,16} = 28.6; p < 0,001$	$F_{1,16} = 10.6; p < 0,05$	$F_{1,16} = 9.71; p < 0,01$
MPOA	$F_{1,14} = 200.4; p < 0,001$	$F_{1,14} = 28.4; p < 0,001$	$F_{1,14} = 9.20; p < 0,01$
LS	$F_{1,17} = 22.6; p < 0,001$	$F_{1,17} = 5.55; p < 0,05$	$F_{1,17} = 10.6; p < 0,01$
PVN	$F_{1,17} = 22.6; p < 0,001$	$F_{1,17} = 5.55; p < 0,05$	$F_{1,17} = 10.6; p < 0,01$
SON	$F_{1,16} = 127.8; p < 0,001$	$F_{1,16} = 10.2; p < 0,05$	$F_{1,16} = 13.2; p < 0,01$

Fonte: Da autora.

Figura 24- Efeitos do LPS (1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) em ratos controle (Controle) e tratados com solução de frutose 10% (Frutose) sobre a expressão de C-Fos.



Legenda: Fotomicrografias representativas de cortes de encéfalos mostrando células positivas no BNST (10x), MPOA (10x), LS (10x), PVN (40x), SON (100x) e CPy (10x).

Fonte: Da autora.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho os resultados demonstraram que o tratamento durante cinco semanas de solução de frutose 10% induziu distúrbios metabólicos caracterizados por elevados níveis de glicose sanguínea, dislipidemias, aumento do tecido adiposo e desenvolvimento de resistência a insulina. Além disso, este pré-tratamento piorou a resposta inflamatória avaliada pelo teste de Von Frey eletrônico após tratamentos com LPS, PGE₂ ou carragenina. Houve também uma resposta acentuada na termorregulação e no comportamento doente avaliado pelos testes de campo aberto, interação social e ingestão alimentar após tratamento com LPS. O aumento da expressão gênica de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 no tecido adiposo e hipotálamo e da expressão de c-FOS em diversos núcleos cerebrais pode ser observado após desafio imunológico com LPS.

Os dados obtidos para os parâmetros metabólicos estão de acordo com Kelley et al. (2004) que demonstraram que dietas ricas em frutose aumentam glicose plasmática, triglicérides, colesterol total, colesterol HDL e não HDL. Este estudo mostrou que, tanto em humanos quanto em animais experimentais, dieta rica em frutose causa um aumento do metabolismo no fígado e em outros tecidos comprometendo a homeostasia de lipídeos e glicose. O mecanismo pelo qual a frutose provoca dislipidemia se dá pela entrada da frutose na célula através do transportador GLUT-5 independente de insulina, uma vez dentro da célula a frutose é fosforilada a frutose-1-fosfato que é convertido pela aldolase em trioses as quais são responsáveis pela síntese de fosfolipídeos e triglicerídeos (MAYES, 1993).

O metabolismo da frutose ocorre primeiramente no fígado (50-75%) onde são formados os substratos lipogênicos gliceraldeído 3-fosfato, acetil CoA e diacilglicerol. O aumento da síntese de lipídeos contribui para as dislipidemias e deposição de gordura ectópica no fígado e tecidos musculares promovendo assim resistência a insulina hepática e em todo organismo (TAPPY; LE, 2010). O consumo de frutose em humanos esta diretamente relacionado com dislipidemias, adiposidade visceral, resistência a insulina e aumento da pressão sanguínea, fatores que foram observados nos nossos resultados com exceção da hipertensão (LE et al., 2009; STANHOPE et al., 2009).

Apesar da crescente evidência ligando o consumo de frutose com a obesidade os efeitos da dieta rica em frutose sobre a massa corporal total são contraditórios em modelos animais. Alguns estudos demonstram aumento da massa corporal total após ingestão de frutose (JURGENS et al., 2005; KANAREK; ORTHEN-GAMBILL, 1982) enquanto outros trabalhos não observam nenhum efeito (BURSAC' et al., 2014).

A dieta rica em frutose associa-se ao aumento de gordura visceral como demonstrado por Arcego et al. (2014) e Fortino et al. (2007). Nossos dados confirmam estes e outros estudos que demonstram que diversos tipos de dieta com suplementação glicídica ou lipídica provocam o aumento da adiposidade abdominal. A lipogênese estimula a deposição de triglicerídeos no tecido adiposo, músculo e fígado resultando num quadro de dislipidemia, esteatose hepática e sinalização da insulina prejudicada (STANHOPE; HAVEL, 2009). A expressão do gene IL-1 β no tecido adiposo visceral é positivamente correlacionada com o aumento da circunferência da cintura originadas pela ingestão de frutose (ESSER et al., 2013; KOVACEVIC et al., 2015).

Estudos realizados por Sharawy et al. (2015) em modelos animais de resistência a insulina utilizando dieta rica em frutose demonstraram aumento de fatores de transcrição como *Sterol regulatory element binding protein-1c* (SREBP-1c) envolvidos no aumento da expressão de enzimas como, lipase lipoprotéica (LPL), ácido graxo sintase (FAS) e desidrogenase glicerol-3-fosfato (G3PDH) que promovem a síntese de triglicerídeos e ácidos graxos os quais inibem a sinalização insulínica prejudicando a ação desse hormônio.

Resistência insulínica também foi demonstrada em modelos animais por Giani et al. (2009), o tratamento com frutose aumentou a expressão de enzimas importantes na sinalização da insulina como IKK β , JNK e mTOR (*mammalian target of rapamicina*) as quais atuam na fosforilação em resíduos serina de substratos de receptores de insulina, inativando assim esse receptor impedindo a estimulação da via insulínica e seus consequentes efeitos biológicos. Nossos estudos corroboram os citados anteriormente os quais demonstram que uma dieta rica em frutose pode causar uma piora na sinalização insulínica deixando o organismo resistente a esse hormônio, porém não foram analisadas quais enzimas possam estar relacionadas a esta resposta.

Além da insulina, outros hormônios como leptina e adiponectina são alterados após dieta rica em frutose. Roglans et al. (2007) observaram um aumento nos níveis plasmáticos de leptina em ratos machos Sprague-Dawley após dieta enriquecida por

frutose. Aumento nos níveis plasmáticos de adiponectina, um hormônio produzido pelo tecido adiposo que regula a homeostasia da glicose, também pode ser observado em animais da mesma linhagem submetidos à dieta (KAMARI et al., 2007).

Por outro lado, Sakr (2013) observou uma diminuição nos níveis séricos de adiponectina em animais tratados com frutose. No presente trabalho os níveis plasmáticos desse hormônio e de leptina não apresentaram diferença comparados ao grupo controle.

Leptina e adiponectina são hormônios produzidos principalmente no tecido adiposo. O controle da ingestão alimentar e gasto energético e conseqüente regulação do peso corporal esta diretamente relacionado aos níveis de leptina e sua falta de sinalização pode estar associada ao aumento da adiposidade (BALLAND; COWLEY, 2015; ZHANG et al., 1994). A adiponectina está relacionada com o aumento da sensibilidade à insulina e seus níveis são diminuídos em indivíduos obesos, por essa razão, animais com obesidade induzida por dieta possuem uma piora na sensibilidade insulínica podendo desenvolver um quadro de resistência a esse hormônio (ESFAHANI et al., 2015; SAKR, 2013).

Conforme já mencionado, dieta rica em frutose tem sido utilizada como modelo de estudos para dislipidemias hepáticas e resistência a insulina (ALLEN; LEAHY, 1966; BAR-ON; STEIN, 1968), aterosclerose (CANNIZZO et al., 2012; NING et al., 2015), doenças renais (AOYAMA et al., 2012) e aumento do tecido adiposo visceral (KOVACEVIC et al., 2015; STANISIC et al., 2015). Além disso, depressão (HARRELL et al., 2015) e respostas inflamatórias (BENETTI et al., 2013; CASTRO et al., 2015; RAYSSIGUIER et al., 2006) também são investigadas neste modelo o qual agrava as respostas em função dos distúrbios metabólicos causados.

O processo inflamatório pode ser caracterizado por diversos fenômenos mediados por componentes celulares e vasculares que induzem a alterações bioquímicas e morfológicas ocasionando assim os sinais clássicos da inflamação tais como, dor, calor, rubor, tumor e perda de função (HURLEY, 1972; PUNCHARD et al., 2004). Conforme descrito por Barrot (2012), o aumento da sensibilização dos receptores da dor (nociceptores), causando hiperalgesia, determina um sinal clássico da resposta inflamatória. Neste sentido, a avaliação da intensidade de hiperalgesia como resposta inflamatória em animais com alterações metabólicas induzidas por frutose foi realizada no presente estudo.

A avaliação da dor foi realizada baseada no teste de Von Frey eletrônico, um método muito utilizado para medir a hiperalgesia mecânica em animais. Hiperalgesia é determinada como o aumento da sensibilidade a dor (BARROT, 2012) que pode ser provocada por diversos estímulos como carragenina e PGE₂. A hipersensibilidade induzida pela carragenina se dá pelo estímulo de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-8 as quais estimulam PGE₂ que aumentam a síntese de AMPc gerando um aumento no influxo de cálcio, com conseqüente despolarização da membrana celular e transmissão do impulso nervoso (DI ROSA et al., 1971; ROSSI et al., 2015; SOARES et al., 2000; VIVANCOS et al., 2004).

A utilização de diferentes substâncias inflamatórias como carragenina, LPS ou prostaglandina E₂ produz resposta algésica aumentada em ratos tratados com frutose, à semelhança de outros trabalhos que estudaram o aumento da sensibilidade a estímulos nocivos, mecânicos e térmicos nas caudas de ratos obesos Zucker (*fa/fa*) (ROANE; PORTER, 1986; SUGIMOTO et al., 2008; ZHUANG et al., 1997).

Os mecanismos que possivelmente expliquem a relação entre obesidade e dor ainda não estão completamente elucidados, entretanto, Greisen et al., (2001) demonstram que dor aguda pode causar resistência a insulina transitória em modelos experimentais, especificamente modelos relacionados a dietas, sugerindo uma possível associação entre metabolismo da glicose e dor. Outros estudos relatam que ratos obesos Zucker apresentaram aumento da inflamação periférica e sensibilidade à dor em resposta a injeção intradérmica de carragenina (IANNITTI et al., 2012). Além disso, animais obesos podem apresentar níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α e enzimas como cicloxigenase-2 (COX-2) aumentadas na medula espinhal contribuindo assim para a resposta dolorosa (IANNITTI et al., 2012; WANG et al., 2014). Dessa maneira podemos observar que a dieta rica em frutose agrava a resposta algésica conforme demonstrado em outros modelos de obesidade.

Além da hiperalgesia, a migração celular e produção de mediadores caracterizam a resposta inflamatória em animais obesos e esses fatores são amplamente investigados. Diversos estudos relatam o aumento na expressão de moléculas de adesão, como molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1), molécula 1 de adesão de células vasculares (VCAM-1) e P-selectina e infiltração de macrófagos em animais obesos caracterizando uma reação vascular inflamatória e trombogênica aumentada (BARBATO et al., 2005; VACHHARAJANI et al., 2005; VACHHARAJANI;

GRANGER, 2009; WEISBERG et al., 2003). Além disso, Caballero (2003) descreve a obesidade e resistência a insulina como causas do aprimoramento do fenótipo inflamatório e aumento do estresse oxidativo contribuindo para o comprometimento da reatividade vascular estimulando alterações pró-aterogênicas na vasculatura em resposta a hiperinsulinemia.

A obesidade tem sido associada a um estado de inflamação crônica devido à resposta de células metabólicas ao excesso de nutrientes e energia as quais liberam mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , IL-6, leptina e resistina a partir do aumento do tecido adiposo (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011; HOTAMISLIGIL, 2006; TILG; MOSCHEN, 2006).

Embora o aumento de citocinas pró-inflamatórias em animais submetidos a dieta de frutose seja bastante discutido atualmente, a influência dos distúrbios metabólicos provenientes desta dieta no comportamento doente e termoregulação em animais tratados com LPS ainda não foi reportada pela literatura.

No presente trabalho distúrbios metabólicos induzidos pela dieta com frutose agravaram o comportamento doente induzido por LPS. Ruth et al. (2008) demonstram que ratos obesos Zucker (*fa/fa*) possuem sistema imune alterado produzindo mais citocinas pró-inflamatórias que ratos magros. A atividade metabólica do tecido adiposo modula aumentando os níveis de fatores inflamatórios como os observados em infecções e doenças autoimunes (ASSY et al., 2008; BERG; SCHERER, 2005; FORSHÉE et al., 2007; OUYANG et al., 2008).

Pohl et al. (2014) demonstram resposta imune aumentada em animais que receberam dieta hipercalórica. Estes achados sugerem uma maior influência do estado energético do organismo modulando estas respostas do que somente a dieta por si só. A dieta de frutose também piorou resposta imune em camundongos que demonstraram influxo neutrofílico intenso no fígado e elevadas concentrações de citocinas (RODRIGUES et al., 2014).

O presente estudo demonstra que dieta rica em frutose altera o comportamento doente de acordo com os testes de locomoção, interação social, ingestão alimentar e febre em resposta a um desafio imunológico quando comparada a dieta normal. Conforme descrito, o mecanismo para essa alteração se deve ao aumento da expressão de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 no tecido adiposo e hipotálamo além do

aumento de neurônios marcados para c-Fos em núcleos cerebrais relacionados ao comportamento doentio e febre.

Nosso modelo para estimular o comportamento doentio e febre foi o de LPS, um modelo amplamente utilizado para acessar respostas comportamentais (BEUTLER, 2004). LPS pode induzir mudanças metabólicas periféricas e hematológicas modulando respostas controladas pelo cérebro como febre, anorexia, adipsia, atividade locomotora diminuída e alterações neuroendócrinas, respostas que caracterizam o comportamento doentio (CRUNFLI et al., 2015; DANTZER et al., 2008; DE PAIVA et al., 2010; RIBEIRO et al., 2013; SAPER et al., 2012; SILVA; GIUSTI-PAIVA, 2014; SONCINI et al., 2012; VELOSO et al., 2010).

A redução da locomoção no aparato de campo aberto mostrada em nosso estudo confirma uma alteração no comportamento doentio em animais do grupo controle tratados com LPS e o tratamento com frutose piorou esta resposta comportamental após o desafio imunológico. Diante de uma dieta e dose de LPS diferente, Baumgarner et al. (2014) não mostraram diferença na atividade locomotora entre o grupo controle e o grupo obeso, sendo a obesidade induzida por alta concentração lipídica na dieta após injeção de LPS na concentração de 250 µg/kg.

A interação social, outro parâmetro utilizado para investigar o comportamento doentio, é diminuída após o desafio imunológico. Uma maior redução nesta interação pode ser observada em animais submetidos à dieta rica em frutose. Neste teste ratos adultos machos são expostos por um breve período com outros da mesma espécie. Agentes indutores de comportamento doentio tal como LPS e IL-1 β interrompem a interação entre o animal desafiado imunologicamente e o intruso (BLUTHÉ et al., 1992; BLUTHÉ et al., 1998). Estudos que demonstram efeito da dieta no teste de interação social mostraram uma supressão nesta interação diante de dieta enriquecida com carboidrato (POHL et al., 2014), assim como observado em nossas investigações.

No presente estudo a ingestão alimentar apresentou-se diminuída após o tratamento com LPS em animais do grupo controle e dieta enriquecida com frutose exacerbou esta diminuição. Após o tratamento com LPS, dois outros modelos animais de obesidade, animais *ob/ob* geneticamente obesos por deficiência de leptina e dieta enriquecida de gordura, apresentaram diminuição da ingestão alimentar e aumento da temperatura corporal (LAWRENCE et al., 2012) corroborando nossos achados. Por outro lado, Clarke et al. (2011) avaliou a hipofagia em modelo de obesidade por

superalimentação pós-natal e após a administração de LPS na dose de 100 µg/kg a diminuição da ingestão alimentar entre o grupo obeso e controle foi a mesma, diferentemente da resposta encontrada no presente trabalho.

Resposta febril tem sido amplamente estudada em modelos animais de obesidade como superalimentação pós-natal, dieta enriquecida com gordura e animais *ob/ob*. O aumento na temperatura corporal após injeção de LPS pode ser demonstrado em todos esses modelos (CLARKE et al., 2011; LAWRENCE et al., 2012), assim como no presente trabalho o qual utiliza frutose como modelo para obesidade.

Pohl et al. (2014) também observaram aumento da resposta febril em animais obesos e sugerem que o mecanismo da febre esteja relacionado com o hormônio leptina o qual aumenta a produção de citocinas como IL-1 β e IL-6 a partir de células imunes, exercendo um importante papel na modulação da febre uma vez que estas citocinas atuam como pirógenos. Steiner e Romanovsky (2007) também sugerem o envolvimento da leptina no controle destes mediadores e conseqüentemente nas respostas febris. Apesar dos distúrbios metabólicos encontrados no grupo frutose, os níveis de leptina não apresentaram diferenças com relação ao grupo controle, conforme demonstrado neste trabalho. Porém, níveis aumentados de IL-1 β e IL-6 foram encontrados tanto no hipotálamo quanto no tecido adiposo, dessa maneira, pode-se justificar a resposta febril apresentada em nossos estudos baseada na produção desses mediadores a partir do tecido adiposo e não dependente da leptina.

No presente trabalho, o aumento nos níveis de expressão dos mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 β e IL-6 foram observados no hipotálamo, região cerebral que tem como função regular gasto energético e controle da fome, várias funções autonômicas responsáveis pelo metabolismo, além de temperatura corporal e ciclos circadianos (PEARSON; PLACZEK, 2013; VAN DE SANDE-LEE; VELLOSO, 2012). No tecido adiposo retroperitoneal pode ser observado aumento nos níveis de expressão de IL-1 β e IL-6, ambos após tratamento com LPS. A dieta enriquecida com frutose intensificou o aumento dessa expressão nesses tecidos. Baseado nesses achados, pode-se sugerir que o aumento das respostas comportamentais e termoregulação em resposta ao desafio imunológico deve-se aos distúrbios metabólicos desenvolvidos a partir da dieta rica em frutose.

Adicionalmente, foi verificado o efeito dos distúrbios metabólicos induzidos por frutose e administração de LPS na expressão de c-Fos em áreas específicas do cérebro,

tais como BNST, PVN, SON, MPOA, PCx e LS. Em 1987, Hunt et al. demonstraram que neurônios espinhais de ratos expressavam c-Fos logo após receberem estímulo sensorial. Desde então esta proteína é conhecida parte integrante da resposta nuclear a estímulos, como, por exemplo, fatores de crescimento, estímulos sensoriais e neurotransmissores, sendo por isso utilizada como marcador de atividade neuronal (CAPUTTO et al., 2014).

Um estímulo muito utilizado para avaliar a responsividade dos neurônios através de c-Fos é o LPS, sua administração aumenta o número de células positivas para c-Fos em diversas regiões como PVN, MPOA e núcleo pré-ótico mediano (MnPO) (DU PLESSIS et al., 2006), bed núcleo da stria terminal e núcleo central da amígdala (DALLAPORTA et al., 2007; HABA et al., 2012), no núcleo supraótico e córtex piriforme (MA et al., 2014). Nossos achados demonstram respostas similares a estes trabalhos visto que a expressão de c-Fos aumentou no SON, BNST e MPOA após a administração de LPS. Os animais pré-tratados com frutose apresentaram um aumento mais acentuado de c-Fos nestes mesmos núcleos e no LS e PCx em resposta ao desafio imunológico.

Estudos que avaliam a influência de distúrbios metabólicos induzidos por dieta sobre a ativação neural após estímulos imunológicos ainda são pouco relatados pela literatura. Lawrence et al. (2012) foram os primeiros a escrever sobre esse assunto, em seu trabalho relatam uma diminuição do número de células positivas para Fos no PVN, núcleo do trato solitário (NTS) e área postrema (AP) em animais tratados com dieta rica em lipídeos e LPS em comparação com animais controle tratados com LPS. O mesmo grupo analisou a expressão de c-Fos em animais obesos *ob/ob* tratados com LPS e observaram que não houve diferença na expressão desta proteína entre o grupo obeso e controle, quando ambos são submetidos a endotoxemia. Os autores explicam que estas respostas são devido à diminuição da liberação de IL-1 β pelos macrófagos, uma vez que esta citocina estimula a expressão de c-Fos nas mesmas regiões estimuladas pelo LPS.

O bed núcleo da estria terminal (BNST) é uma pequena área localizada na porção basomedial do cérebro anterior que faz parte do sistema límbico e atua como centro de retransmissão de sinais neurais relacionados com modulação comportamental (AVERY et al., 2014; KLAMPFL et al., 2015). Os resultados encontrados em nosso trabalho demonstram que o desafio imunológico com LPS é capaz de aumentar a reatividade de neurônios no BNST e que essa reatividade é exacerbada pelo pré-

tratamento com frutose. Este núcleo é conhecido por ser responsivo a situações de estresse, dentre elas o estresse imunológico. Frenois et al. (2007), relatam um aumento no número de neurônios reativos para c-Fos no BNST em animais desafiados imunologicamente com 830µg/Kg de LPS (intraperitoneal). Uma maior imunoreatividade para c-Fos em áreas responsivas ao LPS, como é o caso do BNST, nos animais tratados com frutose, pode ser decorrente de um estado pró-inflamatório basal experimentado por estes animais, tal como relatado por Kovacevic et al. (2015).

A área pré-óptica mediana é um núcleo hipotalâmico onde existem neurônios termossensíveis que recebem aferências térmicas centrais e periféricas, importantes para o desenvolvimento da febre em situações de inflamação, sendo ela a principal área termorregulatória do cérebro (BOULANT, 1998; STEINER; BRANCO, 2003). Durante o estabelecimento da resposta de fase aguda, como por exemplo, a evocada após a injeção intraperitoneal de LPS, células imunológicas, principalmente macrófagos alveolares e hepáticos fazem aumentar os níveis de PGE₂ no sangue, esta alcançará os sistema nervoso central, por vias diretas e indiretas, levando a alterações comportamentais e térmicas (BLATTEIS, 2006; LI et al., 2006; STEINER et al., 2006). A presença de PGE₂ na MPOA; seja aquela produzida na periferia, que chega via órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) ou a produzida centralmente via ativação de COX-2, provocará um aumento do *set point* termorregulatório, levando, por exemplo, um aumento da produção de calor via desacoplamento da cadeia respiratória no tecido adiposo marrom, instalando assim um estado febril (BLATTEIS, 2006; JEZEK, 2002; SIMM, 2016).

Nossos resultados demonstraram que os animais pré-tratados com frutose, quando tratados com LPS, aumentam o número de neurônios que expressam a proteína c-Fos na MPOA quando comparados com aqueles desafiados imunologicamente com LPS, porém pré-tratados com água, resultados estes que estão em consonância com os dados e monitoramento da temperatura corporal, os quais mostram que os animais tratados com frutose desenvolveram uma febre mais acentuada em resposta ao lipopolissacarídeo. O efeito da administração de LPS sobre a febre e o aumento da expressão de c-Fos na MPOA, tal como encontrado em nosso trabalho, já foi relatado por Du Plessis et al. em 2006, contudo o efeito potenciador exercido pela dieta rica em frutose, visto em nosso estudo, é inédito na literatura.

PVN e SON são núcleos hipotalâmicos envolvidos em diversas funções neuroendócrinas e comportamentais, tais como resposta ao estresse e manutenção do comportamento materno (PEREIRA et al., 2015; VAN DE KAR; BLAIR, 1999). O núcleo paraventricular abriga duas grandes populações de neurônios; os magnocelulares, que sintetizam vasopressina e ocitocina, e os parvocelulares que sintetizam hormônio liberador de corticotrofina. Já o núcleo supraóptico é composto exclusivamente por neurônios magnocelulares produtores de ocitocina (PIRNIK et al., 2004; VAN DE KAR; BLAIR, 1999). É clássico o conhecimento de que a ocitocina desempenha papel crucial no trabalho de parto e lactação, contudo estudos recentes vêm associando este neurohormônio com funções autonômicas e comportamentais, bem como modulação do sistema imunológico, haja vista que células do sistema imune expressam receptores para este hormônio (YANG et al., 2013; WANG et al., 2015).

Administração intravenosa ou intraperitoneal de LPS é capaz de aumentar os níveis plasmáticos de ocitocina e vasopressina, bem como a imunoreatividade para c-Fos nos PVN e SON (KASTING, 1986; KASTING et al., 1985; MATSUNAGA et al., 2000). Em nossos resultados encontramos uma maior imunoreatividade para c-Fos no PVN e SON, nos animais tratados com o LPS tal como já reportado por Matsunaga et al. (2000). Adicionalmente, a expressão de c-Fos no SON foi acentuada pela dieta rica em frutose, dado ainda não reportado pela literatura. Diante do exposto é possível supor que a ocitocina e a vasopressina exerçam algum papel modulatório sobre as células imunes durante a endotoxemia. O papel destes neurohormônios durante a resposta de fase aguda não é muito claro, contudo é possível hipotetizar que o aumento da ocitocina periférica desempenhe um papel imunomodulatório que impede a exacerbação da resposta imune, tendo em vista que ela apresenta efeito antipirogênico (MURZENOK et al., 1989). Apesar de a vasopressina apresentar potencial efeito vasoconstritor e a vasoconstrição periférica dificultar a perda de calor para o ambiente o aumento dos níveis deste hormônio provoca hipotermia durante a endotoxemia (MATSUNAGA et al., 2000; PARROTT et al., 1997; ROMANOVSKY et al., 2005).

Esta diminuição na perda de calor pode ser também devido a ação de neurônios presentes na área septal lateral. A LS é uma região pertencente ao sistema límbico, associada a respostas cardiovasculares evocadas por situação de estresse, a citar o estresse por contenção (KANAYA et al., 2003; KUBO et al., 1996). É sabido que área septal lateral quando ativada promove aumento da pressão arterial e também que

animais tratados com dieta rica em frutose experimentam níveis de pressão arterial aumentado. Nossos dados demonstram que os animais tratados com frutose e desafiados imunologicamente com LPS apresentam reatividade aumentada para c-Fos na LS, esta maior atividade dos neurônios nesta área pode ser importante para promover aumento da pressão arterial, via vasoconstrição, com intuito de reduzir a perda de calor por parte destes animais. Pode-se associar o aumento da resposta febril nos animais tratados com frutose durante 5 semanas ao aumento das citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 em regiões hipotalâmicas como MPOA responsáveis pela termoregulação.

Nossos resultados demonstraram que a dieta rica em frutose provoca alterações metabólicas e aumento da adiposidade visceral e o comportamento doentio e febre são intensificados em resposta ao tratamento com LPS nessas condições.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se constatar alterações metabólicas nos animais tratados com dieta rica em frutose como, dislipidemias, aumento do tecido adiposo visceral e resistência à insulina após cinco semanas de tratamento. Esses fatores ocasionaram uma piora na resposta algésica diante do teste com estímulos inflamatórios e, ainda, intensificaram o comportamento doentio e febre em resposta a endotoxemia provocada pelo LPS em consequência do aumento de citocinas pró-inflamatórias no sistema nervoso central.

REFERÊNCIAS

- AHIMA, R.S.; ANTWI, D.A. Brain regulation of appetite and satiety. **Endocrinol Metab Clin North Am.** 37:811–823, 2008.
- AKRAM, M.; HAMID, A. Mini review on fructose metabolism. **Obes Res Clin Pract.** 7(2):e89-e94, 2013.
- ALEXANDER, C.M. et al. NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. **Diabetes.** 52(5):1210-4, 2003.
- ALLEN, R.J.L.; LEAHY, J.S. Some effects of dietary dextrose, fructose, liquid glucose and sucrose in the adult male rat. **Br. J. Nutr.** 20: 339-347, 1966.
- AMAR, S. et al. Diet-induced obesity in mice causes changes in immune responses and bone loss manifested by bacterial challenge. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 104: 20466-20471, 2007.
- AOYAMA, M. et al. Fructose induces tubulointerstitial injury in the kidney of mice. **Biochem Biophys Res Commun.** 9;419(2):244-9, 2012.
- ARCEGO, D.M. et al. Isolation during the prepubertal period associated with chronic access to palatable diets: Effects on plasma lipid profile and liver oxidative stress. **Physiol. Behav.** 124: 23–32, 2014.
- ASHCROFT, S. J. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. **Nature.** 312: 446–448, 1984.
- ASSY, N. et al. Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors. **Can. J. Gastroenterol.** 22:811–816, 2008.
- AVERY, S.N. et al. BNST neurocircuitry in humans. **Neuroimage.** 91:311-23, 2014.
- BAEUERLE, P.A.; BALTIMORE, D. NF-kappa B: ten years after. **Cell.** 87:13-20, 1996.

BALLAND, E.; COWLEY, M.A. New insights in leptin resistance mechanisms in mice. **Front Neuroendocrinol.** S0091-3022(15)30007-8, 2015.

BANKS, W.A.; ERICKSON, M.A. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. **Neurobiology of Disease.** 37:26–32, 2010.

BARBATO, J.E. et al. Nitric oxide modulates vascular inflammation and intimal hyperplasia in insulin resistance and the metabolic syndrome. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 289: H228–H236, 2005.

BARON, A. D. et al. Interactions between insulin and norepinephrine on blood pressure and insulin sensitivity. **J Clin Invest.** 93: 2453-2462, 1994.

BAR-ON, H.; STEIN, Y. Effect of glucose and fructose administration on lipid metabolism in the rat. **J. Nutr.** 94: 95–105, 1968.

BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience.** 211:39-50, 2012.

BASU, S. et al. The relationship of sugar to populationlevel diabetes prevalence: An econometric analysis of repeated crosssectional data. **PLoS One.** 8:e57873, 2013.

BAUMGARNER, K.M. et al. Diet-induced obesity attenuates cytokine production following an immune challenge. **Behavioural Brain Research.** 267: 33–41, 2014.

BEDINGER, D.H.; ADAMS, S.H. Metabolic, anabolic, and mitogenic insulin responses: A tissue-specific perspective for insulin receptor activators. **Mol Cell Endocrinol.** 415:143-56, 2015.

BELL, G. I.; POLONSKY, K. S. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in b-cell function. **Nature.** 414: 788-791, 2001.

BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behav Brain Res.** 125:141-9, 2001.

BENETTI, E. et al. High sugar intake and development of skeletal muscle insulin resistance and inflammation in mice: a protective role for PPAR- δ agonism. **Mediators Inflamm.** 2013:509502, 2013.

BERG, A.H.; SCHERER, P.E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. **Circ. Res.** 96:939–949, 2005.

BERNARDIS, L.L.; PATTERSON, B.D., Correlation between “Lee Index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J. Endocrinol.** 40:527-528, 1968.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Mol. Immunol.** 40:845–859, 2004.

BICEGO, K.C.; BARROS, R.C.H.; BRANCO, L.G.S. Physiology of temperature regulation: Comparative aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology.* 147(3): 616–39, 2007.

BLATTEIS, C.M. Body temperature. In: Blatteis, C.M. (Ed.) **Physiology and Pathophysiology of Temperature Regulation.** New Jersey, World Scientific, p.14-21, 1998.

BLATTEIS, C.M. Endotoxic fever: New concepts of its regulation suggest new approaches to its management. **Pharmacology & Therapeutics.** 111:194-223, 2006.

BLUTHÉ, R.M.; DANTZER, R.; KELLEY, K.W. Effects of interleukin-1 receptor antagonist on the behavioral effects of lipopolysaccharide in rat. **Brain Res.** 573: 318–320, 1992.

BLUTHÉ, R.M. et al. Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. **C R Acad Sci III.** 317(6):499-503, 1994.

BLUTHÉ, R.M. et al. Interleukin-6 is active only in presence of other proinflammatory cytokines to induce sickness behavior. **Neuroimmunomodulation.** 5:67, 1998.

BONADONNA, R.C. et al. Roles of glucose transport and glucose phosphorylation in muscle insulin resistance of NIDDM. **Diabetes.** 45:915–925, 1996.

BOULANT, J. A. Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 29 (856):108-15, 1998.

BOULANT, J. A. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. **Clinical Infectious Diseases**. 31:157-161, 2000.

BURSAC', B.N. et al. High-fructose diet leads to visceral adiposity and hypothalamic leptin resistance in male rats — do glucocorticoids play a role? **Journal of Nutritional Biochemistry**. 25:446–455, 2014.

CABALLERO, A.E. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. **Obes. Res**. 11:1278–1289, 2003.

CABALLERO, E. Endothelial dysfunction, inflammation, and insulin resistance: a focus on subjects at risks for type 2 diabetes. **Current Diabetes Report**. 4:237-246, 2004.

CABANAC, M.; MASSONNET, B. Pathology of thermoregulation. **Rev Neurol**. 136(4):285-302, 1980.

CANNIZZO, B. et al. Insulin resistance promotes early atherosclerosis via increased proinflammatory proteins and oxidative stress in fructose-fed ApoE-KO mice. **Exp Diabetes Res**. 2012:941304, 2012.

CAPUTTO, B.L.; CARDOZO GIZZI, A.M.; GIL, G.A. c-Fos: an AP-1 transcription factor with an additional cytoplasmic, non-genomic lipid synthesis activation capacity. **Biochim Biophys Acta**. 1841(9):1241-6, 2014.

CASTRO, M.C. et al. Fructose-induced inflammation, insulin resistance and oxidative stress: A liver pathological triad effectively disrupted by lipoic acid. **Life Sci**. 15;137:1-6, 2015.

CHAKRABORTI, C.K. Role of adiponectin and some other factors linking type 2 diabetes mellitus and obesity. **World J Diabetes**. 6(15):1296-308, 2015.

CHOI, H.K.; WILLETT, W.; CURHAN, G. Fructose-rich beverages and risk of gout in women. **JAMA**. 304:2270–8, 2010.

CLARKE, M.A.; STEFANIDIS, A.; SPENCER, S.J. Postnatal overfeeding leads to obesity and exacerbated febrile responses to lipopolysaccharide throughout life. **J. Neuroendocrinol.** 24:511–524, 2011.

COHN, D.W.H.; DE SÁ-ROCHA, L.C. Differential effects of lipopolysaccharide in the social behavior of dominant and submissive mice. **Physiology & Behavior.** 87:932–937, 2006.

COOK, D. L.; HALES, C. N. Intracellular ATP directly blocks K channels in pancreatic B-cells. **Nature.** 311:271–273, 1984.

CORNIER, M.A.; DABELEA, D.; HERNANDEZ, T.L.; et al. The metabolic syndrome. **Endocr Rev.** 29:777– 822, 2008.

CROCI, T.; ZARINI, E. Effect of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant on nociceptive responses and adjuvantinduced arthritis in obese and lean rats. **Br. J. Pharmacol.** 150:559–566, 2007.

CROSS, D.A. et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature.** 378:785–789, 1995.

CRUNFLI, F.; VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Cannabinoid CB1 receptors mediate the effects of dipyrone. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology.** v. 42, p. n/a-n/a, 2015.

CUNHA, T. M. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal Medical Biological Research.** 37(3):401-407, 2004.

CURRY, D. L. Effects of mannose and fructose on the synthesis and secretion of insulin. **Pancreas.** 4:2–9, 1989.

DALLAPORTA, M. et al. c-Fos immunoreactivity induced by intraperitoneal LPS administration is reduced in the brain of mice lacking the microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1). **Brain Behav Immun.** 21(8):1109-21, 2007.

DANTZER, R. et al. Molecular basis of sickness behavior. **Ann N Y Acad Sci.** 856:132-8, 1998.

DANTZER, R. et al. Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? **Auton. Neurosc. Basic Clin.** 85:60–65, 2000.

DANTZER, R. Cytokine, Sickness Behavior, and Depression. **Neurol Clin.** 24:441–460, 2006.

DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature Reviews Neuroscience.** 9:46–56, 2008.

DE ARAUJO, I.E. et al. Food reward in the absence of taste receptor signaling. **Neuron.** 57:930–941, 2008.

DE FRONZO, R.A.; FERRANNINI, E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. **Diabetes Care.** 14:173–194, 1991.

DE LA GARZA, R. 2nd. Endotoxin- or pro-inflammatory cytokine-induced sickness behavior as an animal model of depression: focus on anhedonia. **Neurosci Biobehav Rev.** 29:761–770, 2005.

DE LUCA, C.; OLEFSKY, J.M. Inflammation and insulin resistance. **FEBS Letters.** 582:97–105, 2008.

DE PAIVA, V.N. et al. Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice. **Behavioural Brain Research.** 215:146-151, 2010.

DHILLO, W.S. Appetite regulation: an overview. **Thyroid.** 17:433–445, 2007.

DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J Pathol.** 104(1):15-29, 1971.

DU PLESSIS, I. et al. c-Fos immunoreactivity in selected brain regions of rats after heat exposure and pyrogen administration. **Brain Research.** 1120:124–130, 2006.

DUPRE, J. et al. Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. **J Clin Endocrinol Metab.** 37(5):826-8, 1973.

ECKEL, R.H.; GRUNDY, S.M.; ZIMMET, P.Z. The metabolic syndrome. **Lancet.** 365:1415-28, 2005.

ENGSTRÖM, L. et al. Lipopolysaccharide-induced fever depends on prostaglandin E2 production specifically in brain endothelial cells. **Endocrinology.** 153(10):4849-61, 2012.

ESFAHANI, M. et al. Adiponectin: an adipokine with protective features against metabolic syndrome. **Iran J Basic Med Sci.** 18(5):430-42, 2015.

ESSER, N. et al. Obesity phenotype is related to NLRP3 inflammasome activity and immunological profile of visceral adipose tissue. **Diabetologia.** 56:2487–2497, 2013.

FILE, S. E.; HYDE, J. R. G. Can social interaction be used to measure anxiety? **Br J Pharmac.** 62:19-24, 1978.

FILE, S. E.; SETH, P. A review of 25 years of the social interaction test. **European Journal of Pharmacology.** 463:35-53, 2003.

FINKELSTEIN, E. A. et al. Obesity and severe obesity forecasts through 2030. **Am. J. Prev. Med.** 42:563–570, 2012.

FORD, E. S.; GILES, W. H.; DIETZ, W. H. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. **The Journal of the American Medical Association.** 287(3):356–359, 2002.

FORSHEE, R.A. et al. A critical examination of the evidence relating high fructose corn syrup and weight gain. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 47:561–582, 2007.

FORTINO, M.A.; LOMBARDO, Y.B.; CHICCO, A. The reduction of dietary sucrose improves dyslipidemia, adiposity, and insulin secretion in an insulin-resistant rat model. **Nutrition.** 23:489–497, 2007.

FRENOIS, F. et al.
Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within

the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. **Psychoneuroendocrinology**. 32(5):516-31, 2007.

FREUDENBERG, M.A. et al. Role of lipopolysaccharide susceptibility in the innate immune response to *Salmonella typhimurium* infection: LPS, a primary target for recognition of Gram-negative bacteria. **Microbes Infect.** 3(14-15):1213-22, 2001.

FRÜHBECK, G. et al. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 280(6):E827-47, 2001.

GALANOS C. et al. Biological activities of lipid A complexed with bovine-serum albumin, **Eur. J. Biochem.** 31:230–233, 1972.

GALLIN, J.I.; GOLDSTEIN, I.M.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. New York: Raven Press, 1992.

GANDA, O. P. et al. Metabolic effects of glucose, mannose, galactose, and fructose in man. **J Clin Endocrinol Metab.** 49:616–622, 1979.

GAO, Z. et al. Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. **J Biol Chem.** 278:24944-50, 2003.

GERSTBERGER, R. Nitric oxide and body temperature control. **News in Physiological Sciences.** 14: 30-36, 1999.

GIANI, J.F. et al. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 296(2):E262-71, 2009.

GIROIX, M. H. et al. Hexose metabolism in pancreatic islets. Inhibition of hexokinase. **Biochem. J.** 223:447–453, 1984.

GIUSTI-PAIVA, A. et al. Role of nitric oxide in thermoregulation during septic shock: involvement of vasopressin. **Eur J Physiol.** 447, 175–180, 2003.

GOEHLER, L.E. et al. Interleukin-1 β in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? **J. Neurosci.** 19:2799–2806, 1999.

GOFF, D. et al. Insulin resistance and adiposity influence lipoprotein size and subclass concentrations. Results from the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. **Metabolism.** 54:264-270, 2005.

GORAN, M.I.; ULJASZEK, S.J.; VENTURA, E.E. High fructose corn syrup and diabetes prevalence: A global perspective. **Global Public Health.** 8(1):55-64, 2013.

GRANT, E.C.; MACKINTOSH, J.H. A comparison of the social postures of some common laboratory rodents. **Behavior.** 21:247–59, 1963.

GREGOR, M.F.; HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. **Annu. Rev. Immunol.** 29:415–445, 2011.

GREISEN, J. et al. Acute pain induces insulin resistance in humans. **Anesthesiology.** 95:578-584, 2001.

GUERRERO-ROMERO, F. et al. The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. **J Clin Endocrinol Metab.** 95:3347–3351, 2010.

HABA, R. et al. Lipopolysaccharide affects exploratory behaviors toward novel objects by impairing cognition and/or motivation in mice: Possible role of activation of the central amygdala. **Behav Brain Res.** 228(2):423-31, 2012.

HALBERG, N.; WERNSTEDT-ASTERHOLM, I.; SCHERER, P.E. The adipocyte as an endocrine cell. **Endocrinol Metab Clin North Am.** 37(3):753–768, x–xi, 2008.

HANSEN, M.K. et al. The contribution of the vagus nerve in interleukin-1beta-induced fever is dependent on dose. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 280:R929–934, 2001.

HANSEN, M.K. et al. Vagotomy blocks the induction of interleukin-1beta (IL-1beta) mRNA in the brain of rats in response to systemic IL-1beta. **J Neurosci.** 18:2247–53, 1998.

- HARDEN, L.M. et al. Fever and sickness behavior: Friend or foe? **Brain, Behavior, and Immunity**. 50:322-33, 2015.
- HARMS, P. G.; OJEDA, S. R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. **J Appl Physiol**. 36:391-392, 1974.
- HARRELL, C.S. et al. High-fructose diet during periadolescent development increases depressive-like behavior and remodels the hypothalamic transcriptome in male rats. **Psychoneuroendocrinology**. 6;62:252-264, 2015.
- HART, B.L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 12: 123–137, 1988.
- HAVEL, P. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. **Nutr Rev**. 63:133–57, 2005.
- HENNESSY, M. B. et al. Sociality and sickness: have cytokines evolved to serve social functions beyond times of pathogen exposure? **Brain Behav Immun**. 0:15-20, 2014.
- HERNÁNDEZ-SALINAS, R. et al. Antioxidant and anti hyperglycemic role of wine grape powder in rats fed with a high fructose diet. **Biol Res**. 48(1):53, 2015.
- HIGA, T.S. et al. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. **Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol**. 6:47-54, 2014.
- HOTAMISLIGIL, G.S. et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **J Clin Invest**. 95:2409-15, 1995.
- HOTAMISLIGIL, G. S. et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- alpha- and obesity-induced insulin resistance. **Science**. 271:665–668, 1996.
- HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**. 444:860–867, 2006.
- HOU, M. et al. Neonatal Overfeeding Induced by Small Litter Rearing Causes Altered Glucocorticoid Metabolism in Rats. **PLoS ONE**. 6(11):e25726, 2011.

HSUEH, W. et al. Insulin resistance and the endothelium. **Am J Med.** 117:109-117, 2004.

HUANG, S.; CZECH, M.P. The GLUT4 glucose transporter. **Cell Metab.** (4):237-52, 2007.

HUNT, S.P.; PINI, A.; EVAN G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. **Nature.** 328(6131):632-4, 1987.

HURLEY, J.V. **Acute inflammation.** Edinburgh, London: Churchill Livingstone; 1972.

IANNITTI, T.; GRAHAM, A.; DOLAN, S. Increased central and peripheral inflammation and inflammatory hyperalgesia in Zucker rat model of leptin receptor deficiency and genetic obesity. **Exp. Physiol.** 97:1236–1245, 2012.

JEZEK, P. Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins-UCPn. **Int J Biochem Cell Biol.** 34(10):1190-206, 2002.

JOHNSON, A.R.; MAKOWSKI, L. Nutrition and metabolic correlates of obesity and inflammation: clinical considerations. **J Nutr.** 145(5):1131S-1136S, 2015.

JURGENS, H. et al. Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. **Obes Res.** 13:1146–56, 2005.

KAHN, B.B.; FLIER, J.S. Obesity and insulin resistance. **J Clin Invest.** 106:473–481, 2000.

KAHN, R. et al. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. **Diabetes Care.** 28:2289–2304, 2005.

KAHN, S. E. The importance of b-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 86:4047–4058, 2001.

KAMARI, Y. et al. Metabolic stress with a high carbohydrate diet increases adiponectin levels. **Horm Metab Res.** 39:384–388, 2007.

KANAREK, R.B.; ORTHEN-GAMBILL, N. Differential effects of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate-induced obesity in rats. **J Nutr.** 112:1546–54, 1982.

KANAYA, T. et al. Projections from the caudal part to the rostral part of the lateral septal area mediate blood pressure increase. **Brain Res Bull.** 61(5):505-10, 2003.

KANOSUE, K. et al. “Set point” revisited. In: **Thermal Physiology 1997** (Eds: Nielsen Johannsen B. & R. Nielsen), August Krogh Institute, Copenhagen, Denmark, p. 39-43, 1997.

KASTING, N.W. Characterization of body temperature, vasopressin, and oxytocin responses to endotoxin in the rat. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 64:1575–1578, 1986.

KASTING, N.W. et al. Endotoxin increases vasopressin release independently of known physiological stimuli. **Am. J. Physiol.** 248:E420–424, 1985.

KATAKAM, P.V. et al. EDHF-mediated relaxation is impaired in fructose-fed rats. **J Cardiovasc Pharmacol.** 34:461–467, 1999.

KEANE, K.N. et al. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. **Oxid Med Cell Longev.** 2015:181643, 2015.

KELLEY, K.W. et al. Cytokine-induced sickness behavior. **Brain Behav Immun.** 17 Suppl 1:S112-8, 2003.

KELLEY, G.L.; ALLAN, G.; AZHAR, S. High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation. **Endocrinology.** 145:548–555, 2004.

KELMER, G. Update on treatments for endotoxemia. **Vet Clin North Am Equine Pract.** 25(2):259-70, 2009.

- KENNEDY, A.J. et al. Mouse models of the metabolic syndrome. **Dis Model Mech.** 3(3–4):156–66, 2010.
- KENT, S. et al. Sickness behavior as a new target for drug development. **Trends Pharmacol Sci.** 13(1):24–8, 1992.
- KERSHAW, E. E.; FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **J Clin Endocrinol Metab.** 89(6): 2548–2556, 2004.
- KITAGAWA, S. et al. Effect of intracerebroventricular injections of prolactin-releasing peptide on prolactin release and stress-related responses in steers. **Animal Science Journal.** 82:314–319, 2011.
- KLAMPFL, S.M. et al. CRF-R1 activation in the anterior-dorsal BNST induces maternal neglect in lactating rats via an HPA axis-independent central mechanism. **Psychoneuroendocrinology.** 26;64:89–98, 2015.
- KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiol Rev.** 71:93–127, 1991.
- KONSMAN, J.P.; PARNET, P.; DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. **Trends Neurosci.** 25(3):154–9, 2002.
- KOVACEVIC, S. et al. Fructose-enriched diet induces inflammation and reduces antioxidative defense in visceral adipose tissue of young female rats. **Eur J Nutr.** 1–10, 2015.
- KUBO, T. et al. Central nicotinic receptor blockade inhibits emotionally conditioned pressor responses in rats. **Experientia.** 52:348–352, 1996.
- KUHT, J.; FARMERY, A.D. Body temperature and its Regulation. **Anaesthesia and intensive care medicine.** 15(6):273–278, 2014.
- KWON, H.; PESSIN, J. E. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. **Experimental Endocrinology.** 4:1–12, 2013.
- LAFLAMME, N.; RIVEST, S. Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating Gramnegative bacterial cell wall components. **FASEB J.** 15:155–163, 2001.

LARSEN, G. L.; HENSON, P. M. Mediators of inflammation. **Annu. Rev. Immunol.** 1:335–359, 1983.

LAWRENCE, C.B.; BROUGH, D.; KNIGHT, E.M. Obese mice exhibit an altered behavioural and inflammatory response to lipopolysaccharide. **Dis. Model Mech.** 5:649–659, 2012.

LAYE, S. et al. Subdiaphragmatic vagotomy blocks induction of IL-1 beta mRNA in mice brain in response to peripheral LPS. **Am J Physiol.** 268:R1327–1331, 1995.

LAZARUS, M. et al. EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. **Nat Neurosci.** 10:1131–1133, 2007.

LE, K. A.; TAPPY, L. Metabolic effects of fructose. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.* 9:469–475, 2006.

LE, K.A. et al. Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. **Am. J. Clin. Nutr.** 89:1760-1765, 2009.

LENZEN, S.; PANTEN, U. Signal recognition by pancreatic B-cells. **Biochem. Pharmacol.** 37:371–378, 1988.

LENZEN, S. A fresh view of glycolysis and glucokinase regulation: history and current status. **J Biol Chem.** 289(18):12189-94, 2015.

LI, Z. et al. Kupffer cell-generated PGE₂ triggers the febrile response of guinea pigs to intravenously injected LP S. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 290(5):R1262-70, 2006.

LUND, P.K. The discovery of glucagon-like peptide 1. **Regul Pept.** 128(2):93-6, 2005.

NADEAU, S.; RIVEST, S. Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and nuclear factor kappa B activity in the brain during endotoxemia. **J Neurosci.** 20:3456–68, 2000.

NAKAMURA, K. Central circuitries for body temperature regulation and fever. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 301:R1207–R1228, 2011.

MA, Y. et al. Differential roles of cyclooxygenase-2-related signaling in regulating hypothalamic neuronal activity under various acute stresses. **J Vet Med Sci.** 76(2):219-27, 2014.

MALIK, V.S.; HU, F.B. Fructose and Cardiometabolic Health : What the Evidence From Sugar-Sweetened Beverages Tells Us. **Journal Of The American College Of Cardiology.** 66(14):1615-24, 2015.

MARISSAL-ARVY, N. et al. Effect of a high-fat–high-fructose diet, stress and cinnamon on central expression of genes related to immune system, hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis function and cerebral plasticity in rats. **British Journal of Nutrition.** 111:1190–1201, 2014.

MARTIN, S. A. et al. Effects of voluntary Wheel running on LPS-induced sickness behavior in aged mice. **Brain, Behavior, and Immunity.** 29:113-123, 2013.

MATSUNAGA, W. et al. LPS induced Fos expression in oxytocin and vasopressin neurons of the rat hypothalamus. **Brain Res.** 858(1):9-18, 2000.

MAYES, P.A. Intermediary metabolism of fructose. **Am. J. Clin. Nutr.** 58:754S-765S, 1993.

McCUSKER, R.H.; KELLEY, K.W. Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior. **Journal of Experimental Biology.** 216:84-98, 2013.

MILLER, A. W. et al. Mechanisms of impaired endothelial function associated with insulin resistance. **J Cardiovasc Pharmacol Ther.** 3:125–134, 1998.

MOLLER, D.E.; KAUFMAN, K.D. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. **Annual Review of Medicine.** 56:45–62, 2005.

MONTEIRO, C.A. Nutrition and health. The issue is not food, nor nutrients, so much as processing. **Public Health Nutr.** 12(5):729-31, 2009.

MORRISON, S.F.; NAKAMURA, K.; MADDEN, C.J. Central control of thermogenesis in mammals. **Exp Physiol.** 93:773–797, 2008.

MURZENOK, P.P. et al. Antipyrogenic properties of oxytocin. **Bull. Exp. Biol. Med.** 108:1410–1412, 1989.

NAKAMURA, K.; MORRISON, S.F. Central efferent pathways for cold-defensive and febrile shivering. **J Physiol.** 589:3641–58, 2011.

NING, B. et al. High-fructose and high-fat diet-induced insulin resistance enhances atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. **Nutr Metab (Lond).** 12;12:30, 2015.

NISHIO, K. et al. Attenuation of lipopolysaccharide (LPS)-induced cytotoxicity by tocopherols and tocotrienols. **Redox Biology.** 1: 97–103, 2013.

NOLAN, C.J. et al. Insulin resistance as a physiological defense against metabolic stress: implications for the management of subsets of type 2 diabetes. **Diabetes.** 64(3):673–86, 2015.

ORLANDI, L. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the stem bark of *Byrsonima intermedia* A. Juss. **J Ethnopharmacol.** 137(3):1469–76, 2011.

OTTERNESS, I.G. et al. The effects of continuous administration of murine interleukin-1 α in the rat. **Physiol Behav.** 43:797–804, 1988.

OUYANG, X. et al. Fructose consumption as a risk factor for nonalcoholic fatty liver disease. **J. Hepatol.** 48:993–999, 2008.

OVERSTREET, D.H.; KNAPP, D.J.; BREESE, G.R. Accentuated decrease in social interaction in rats subjected to repeated ethanol withdrawals. **Alcohol Clin Exp Res.** 26:1259–1268, 2002.

PARROTT, R.F. et al. Interrelated adrenocortical and neurohypophysial responses associated with fever in endotoxin treated pigs. **Am. J. Physiol.** 273:1046–1052, 1997.

- PAULI, S.; LINTHORST, A.C.; REUL, J.M. Tumour necrosis factor-alpha and interleukin-2 differentially affect hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioural activity, body temperature and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity in the rat. **Eur J Neurosci.** 10(3):868-78, 1998.
- PAXINOS, G., WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic, San Diego. 2007.
- PEARSON, C.A.; PLACZEK, M. Development of the medial hypothalamus: forming a functional hypothalamic-neurohypophyseal interface. **Curr Top Dev Biol.** 106:49-88, 2013.
- PEREIRA, A.S.; GIUSTI-PAIVA, A.; VILELA, F.C.
Central corticosterone disrupts behavioral and neuroendocrine responses during lactation. **Neurosci Lett.** 606:88-93, 2015.
- PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J. Clin. Invest.** 106:165-169, 2000.
- PIRNIK, Z.; MRAVEC, B.; KISS, A.
Fos protein expression in mouse hypothalamic paraventricular (PVN) and supraoptic (SON) nuclei upon osmotic stimulus: colocalization with vasopressin, oxytocin, and tyrosine hydroxylase. **Neurochem Int.** 45(5):597-607, 2004.
- PIZZAGALLI, D.A. et al. Reduced Caudate and Nucleus Accumbens Response to Rewards in Unmedicated Individuals With Major Depressive Disorder. **Am J Psychiatry.** 166(6):702-10, 2009.
- POHL, J. et al. Diet-induced weight gain produces a graded increase in behavioral responses to an acute immune challenge. **Brain Behav Immun.** 35:43-50, 2014.
- POHL, J.; WOODSIDE, B.; LUHESHI, G.N. Changes in hypothalamically mediated acute-phase inflammatory responses to lipopolysaccharide in diet-induced obese rats. **Endocrinology.** 150:4901-4910, 2009.
- POHL, J.; WOODSIDE, B.; LUHESHI, G.N. Leptin modulates the late fever response to LPS in diet-induced obese animals. **Brain, Behavior, and Immunity.** 42:41-47, 2014.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol.** 463: 3–33, 2003.

PUNCHARD, N.A.; WHELAN, C.J.; ADCOCK, I. The Journal of Inflammation. **Journal of Inflammation.** 1(1):1, 2004.

RAYNER, C. K. et al. Effects of intraduodenal glucose and fructose on antropyloric motility and appetite in healthy humans. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 278:R360–R366, 2000.

RAYSSIGUIER, Y. et al. High fructose consumption combined with low dietary magnesium intake may increase the incidence of the metabolic syndrome by inducing inflammation. **Magnes Res.** 19(4):237-43, 2006.

REAVEN, G. et al. Insulin resistance and hyperinsulinemia in individuals with small, dense, low density lipoprotein particles. **J Clin Invest.** 92:141-146, 1993.

REAVEN, G.M. Role of Insulin Resistance in Human Disease. **Diabetes.** 37(12):1595-1607, 1988.

REGAZZI, R.; RODRIGUEZ-TREJO, A.; JACOVETTI, C. Insulin secretion in health and disease: nutrients dictate the pace. **Proc Nutr Soc.** 16:1-11, 2015.

RIBEIRO, D. E. et al. Inhibition of nitric oxide synthase accentuates endotoxin-induced sickness behavior in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.** 103:535-540, 2013.

RICHARD, J.; ROBERT, M. Fructose, exercise, and health. **Curr Sports Med Rep.** 9:253-8, 2010.

RIVEST, S. Molecular insights on the cerebral innate immune system. **Brain, Behavior, and Immunity.** 17:13–19, 2003.

ROANE, D.S.; PORTER, J.R. Nociception and opioid-induced analgesia in lean (Fa/-) and obese (fa/fa) Zucker rats. **Physiol. Behav.** 38:215-218, 1986.

RODRIGUES, A. L. et al. Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. **The Journal of nutritional biochemistry**. 22:109-117, 2011.

RODRIGUES, D.F. et al. Acute intake of a high-fructose diet alters the balance of adipokine concentrations and induces neutrophil influx in the liver. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 25:388–394, 2014.

ROGLANS, N. et al. Impairment of Hepatic Stat-3 Activation and Reduction of PPAR α Activity in Fructose-Fed Rats. **Hepatology**. 45:778-788, 2007.

ROMANOVSKY, A.A. Signaling the brain in the early sickness syndrome: are sensory nerves involved? **Frontiers in Bioscience**. 9:494-504, 2004.

ROMANOVSKY, A. A. et al. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. **Front. Biosci**. 10:2193–2216, 2005.

ROMANOVSKY, A.A. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 292(1):R37-46, 2007.

RORATO, R. et al. Cannabinoid CB1 receptor restrains accentuated activity of hypothalamic corticotropin-releasing factor and brainstem tyrosine hydroxylase neurons in endotoxemia-induced hypophagia in rats. **Neuropharmacology**. 63:154-160, 2012.

ROSENSPIRE, A.J.; KINDZELSKII, A.L.; PETTY, H.R. Cutting edge: fever-associated temperatures enhance neutrophil responses to lipopolysaccharide: a potential mechanism involving cell metabolism. **J Immunol**. 169(10):5396-400, 2002.

ROSSI, H.L. et al. Abnormal trigeminal sensory processing in obese mice. **Pain**. 157(1):235-46, 2016.

ROTH, J.; SOUZA, G. E. P. Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. **Braz J Med Res**. 34(3):301-314, 2001.

ROTH, J.; BLATTEIS, C.M. Mechanisms of fever production and lysis: lessons from experimental LPS fever. **Compr. Physiol**. 4:1563–1604, 2014.

RUIZ-NÚÑEZ, B. et al. Lifestyle and nutritional imbalances associated with Western diseases: causes and consequences of chronic systemic low-grade inflammation in an evolutionary context. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. 24(7):1183–1201, 2013.

RUTH, M.R. et al. Abnormal immune responses in fa/fa Zucker rats and effects of feeding conjugated linoleic acid. **Obesity** (Silver Spring). 16:1770–1779, 2008.

SAKR, H.F. Modulation of metabolic and cardiac dysfunctions by swimming in overweight rats on a high cholesterol and fructose diet: possible role of adiponectin. **J Physiol Pharmacol**. 64(2):231-40, 2013.

SALTIEL, A. The molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular disease. **J. Clin Invest**. 106:163-164, 2000.

SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**. 414(6865):799-806, 2001.

SAMPEY, B.P. et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity**. (Silver Spring) 19: 1109–17, 2011.

SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. **Cell**. 148:852–871, 2012.

SAPER, C.B.; ROMANOVSKY, A.A.; SCAMMELL, T.E. Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. **Nat. Neurosci**. 15:1088-1095, 2012.

SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**. 404:661-671, 2000.

SEINO, S. Cell signalling in insulin secretion: the molecular targets of ATP, cAMP and sulfonylurea. **Diabetologia**. 55:2096–2108, 2012.

SHARAWY, M.H. et al. Attenuation of insulin resistance in rats by agmatine: role of SREBP-1c, mTOR and GLUT-2. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. 89(1):45-56, 2015.

SHI, H. et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **J. Clin. Invest.** 116:3015–3025, 2006.

SHIRAZI, S.N. et al. Glucocorticoids and the Brain: Neural Mechanisms Regulating the Stress Response. **Adv Exp Med Biol.** 872:235-52, 2015.

SHOELSON, S.E.; LEE, J.; GOLDFINE, A.B. Inflammation and insulin resistance. **J Clin Invest.** 116(7):1793-801, 2006.

SIL, R.; RAY, D.; CHAKRABORTI, A.S. Glycyrrhizin ameliorates metabolic syndrome-induced liver damage in experimental rat model. **Mol Cell Biochem.** 409(1-2):177-89, 2015.

SILVA, V.C.; GIUSTI-PAIVA, A., Sickness behavior is delayed in hypothyroid mice. **Brain, Behavior, and Immunity.** 45:109-17, 2015.

SIMM, B. et al. Effects of prostaglandin E2 on cells cultured from the rat organum vasculosum laminae terminalis and medianpreoptic nucleus. **Neuroscience.** 313:23-35, 2016.

SIMPSON, B.W. et al. Lipopolysaccharide transport to the cell surface: biosynthesis and extraction from the inner membrane. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** . 5;370(1679), 2015.

SJÖHOLM, A.; NÝSTROM, T. Endothelial inflammation in insulin resistance. **Lancet.** 365:610-613, 2005.

SMITH, A. G. et al. Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus. **J. Nutr.** 137:1236-1243, 2007.

SOARES, A.C. et al. Activation of ATP-sensitive K (+) channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. **Eur J Pharmacol.** 400(1):67-71, 2000.

SONCINI, R. et al. Dipyrone attenuates acute sickness response to lipopolysaccharide in mice. **Neuroscience Letters.** (Print) 516:114-118, 2012.

- SONG, M. J. et al. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 346:739–745, 2006.
- STANHOPE, K.L. Role of fructose-containing sugars in the epidemics of obesity and metabolic syndrome. **Annu Rev Med.** 63:329–43, 2012.
- STANHOPE, K.L.; HAVEL, P.J. Fructose consumption: potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance. **J. Nutr.**139:1236S-1241S, 2009.
- STANHOPE, K.L. et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. **J. Clin. Invest.** 119:1322–1334, 2009.
- STANIŠIĆ, J. et al. Low intensity exercise prevents disturbances in rat cardiac insulin signaling and endothelial nitric oxide synthase induced by high fructose diet. **Mol Cell Endocrinol.** pii: S0303-7207(15):30155-6, 2015.
- STEINER, A.A.; COLOMBARI, E.; BRANCO, L.G.S. Carbon monoxide as a novel mediator of the febrile response in the central nervous system. **American Journal of Physiology.** 277: R499-R507, 1999.
- STEINER, A.A. et al. Endogenous vasopressin does not mediate hypoxia-induced anapnoea in rats. **J. Appl. Physiol.** 86:469–473, 1999.
- STEINER, A.A.; BRANCO, L.G. Fever and anapnoea in systemic inflammation: intracellular signaling by cyclic nucleotides. **Front Biosci.** 8:s1398-408, 2003.
- STEINER, A.A. et al. Cellular and molecular bases of the initiation of fever. **PLoS Biol.** 4(9):e284, 2006.
- STEINER, A.A.; ROMANOVSKY, A.A. Leptin: at the crossroads of energy balance and systemic inflammation. **Prog. Lipid Res.** 46:89-107, 2007.
- SUGIMOTO, K. et al. Time course of pain sensation in rat models of insulin resistance, type 2 diabetes, and exogenous hyperinsulinaemia. **Diabetes Metab. Res. Rev.** 24:642-650, 2008.

SWIERGIEL, A.H.; DUNN, A.J. Effects of interleukin-1 β and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 86:651–659, 2007.

TAKAHASHI, Y. et al. Circumventricular organs and fever. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 273:R1690-R1695, 1997.

TANIGUCHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**. 7:85-96, 2006).

TAPPY, L.; LE, K.A. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. **Physiol. Rev**. 90:23-46, 2010.

TEFF, K. L. et al. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. **J Clin Endocrinol Metab**. 89:2963–2972, 2004.

THE COMMISSION FOR THERMAL PHYSIOLOGY OF THE INTERNATIONAL UNION OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES (IUPS THERMAL COMMISSION): Glossary of terms for thermal physiology: third edition. **Jpn J Physiol**. 51, i-xxxvi, 2001.

THORP, A.A.; SCHLAICH, M.P. Relevance of Sympathetic Nervous System Activation in Obesity and Metabolic Syndrome. **Journal of Diabetes Research**. 2015:341583, 2015.

TILG, H.; MOSCHEN, A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nat. Rev. Immunol**. 6:772–783, 2006.

TORNHEIM, K.; LOWENSTEIN, J.M. Control of phosphofructokinase from rat skeletal muscle. Effects of fructose diphosphate, AMP, ATP, and citrate. **J BiolChem**. 251: 7322–7328, 1976.

TRAN, L.T.; YUEN, V.G.; MCNEIL, J.H. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. **Mol Cell Biochem**. 332:145–159, 2009.

VACHHARAJANI, V.; GRANGER, D.N. Adipose tissue: a motor for the inflammation associated with obesity. **IUBMB. Life** 61:424–430, 2009.

VACHHARAJANI, V. et al. Obesity exacerbates sepsis-induced inflammation and microvascular dysfunction in mouse brain. **Microcirculation**. 12:183–194, 2005.

VAN DE KAR, L.D.; BLAIR, M.L. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. **Front Neuroendocrinol**. 20(1):1-48, 1999.

VAN DE SANDE-LEE, S.; VELLOSO, L.A. Hypothalamic dysfunction in obesity. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. 56(6):341-50, 2012

VELOSO, C.C. et al. *Pyrostegia venusta* attenuate the sickness behavior induced by lipopolysaccharide in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. 132:355-358, 2010.

VILELA, F.C.; GIUSTI-PAIVA, A. Cannabinoid receptor agonist disrupts behavioral and neuroendocrine responses during lactation. **Behavioural Brain Research**. 263:190–197, 2014.

VINOLO, M.A.R. et al. Tributyrin attenuates obesity-associated inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 303(2):E272-82, 2012.

VIVANCOS, G.G. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Braz J Med Biol Res**. 37(3):391-9, 2004.

VOS, M.B.; LAVINE, J.E. Dietary fructose in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**. 57:2525–31, 2013.

WAJCHENBERG, B. L. et al. Syndrome X: a syndrome of insulin resistance. Epidemiological and clinical evidence. **Diabetes Metab Rev**. 10:19–29, 1994.

WANG, J. et al. Down-regulation of PPAR α in the spinal cord contributes to augmented peripheral inflammation and inflammatory hyperalgesia in diet-induced obese rats. **Neuroscience**. 278:165-78, 2014.

WANG, P. et al. Oxytocin-secreting system: A major part of the neuroendocrine center regulating immunologic activity. **J Neuroimmunol**. 289:152-61, 2015.

WEIL, Z.M. et al. Social interactions alter proinflammatory cytokine gene expression and behavior following endotoxin administration. **Brain Behav Immun.** 20:72–79, 2006.

WEISBERG, S.P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J. Clin. Invest.** 112:1796–1808, 2003.

WHITE, M.F. Insulin signaling in health and disease. **Science.** 302:1710–1711, 2003.

WISSE, B.E. et al. Evidence that lipopolysaccharide-induced anorexia depends upon central, rather than peripheral, inflammatory signals. **Endocrinology.** 148:5230–7, 2007.

YAMAMOTO, M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. **Mol Immunol.** 40(12):861-8, 2004.

YANG, H.P. et al. Nonsocial functions of hypothalamic oxytocin. **Neurosci.** 2013:179272, 2013.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature.** 372:425–432, 1994.

ZHUANG, H.X. et al. Insulin-like growth factor (IGF) gene expression is reduced in neural tissues and liver from rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus, and IGF treatment ameliorates diabetic neuropathy, **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 283:366–374, 1997.

ANEXOS

ANEXO A- APROVAÇÃO CEUA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 16 de outubro de 2013.

Prof. Alexandre Giusti Paiva

Prezado Professor;

O projeto sob sua coordenação, registro nº 530/2013, intitulado “Processo inflamatório em ratos com síndrome metabólica induzida por frutose” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.


Prof Dr Carlos Giovanni de Oliveira Nascimento
Presidente da CEUA – Unifal-MG

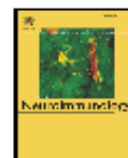
ANEXO B- ARTIGO

Journal of Neuroimmunology 280 (2015) 75–83



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroimmunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneuroim

Sickness behavior is accentuated in rats with metabolic disorders induced by a fructose diet



Lidiane Orlandi ^a, Wesley F. Fonseca ^a, Sílvia Enes-Marques ^a, Valdemar A. Paffaro Jr ^{a,b}, Fabiana C. Vilela ^a, Alexandre Giusti-Paiva ^{a,b,*}

^a Programa Multidisciplinar de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFi), Brazil
^b Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas—MG, 37130-000 Alfenas, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 March 2015
 Received in revised form 19 October 2015
 Accepted 21 October 2015
 Available online xxx

Keywords:

Anorexia
 Fever
 Hypothalamus
 Obesity
 Social interaction

ABSTRACT

This study investigated behavioral responses to an immune challenge among animals with fructose-induced metabolic disorders. Adult male Wistar rats were provided either water or a fructose solution (10%) for 5 weeks. Sickness behaviors were assessed 2 h following the injection of either a lipopolysaccharide (LPS) or vehicle. The rats were subjected to an open field test, a social interaction test, a food intake test and a fever evaluation. Cytokine expression was assessed in both adipose tissue and hypothalamus samples. The neural response was assessed in the forebrain immunohistochemistry for c-Fos. Compared with the control group, the fructose diet induced dyslipidemia and significantly higher plasma total cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride, and glucose levels as well as both epididymal and retroperitoneal adiposity. Furthermore, in response to LPS (1 mg/kg), the rats subjected to a fructose diet exhibited exacerbated sickness behaviors and accentuated febrile responses. LPS induced Fos protein expression in several areas of the brains of the control rats; however, higher numbers of Fos-positive cells were observed in the brains of the rats that were fed a fructose diet. Moreover, larger increases in cytokine expression were observed in both the hypothalamus and the adipose tissue of the obese rats compared with the control rats in response to LPS. In this study, fructose diets played an important role in both the induction of metabolic disorders and the modulation of sickness behaviors in response to an immunological challenge, most likely through the induction of cytokines in the hypothalamus.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Obesity has become one of the most serious public health problems worldwide (WHO, 2000), primarily as a result of sedentary lifestyles and the increased consumption of high-calorie foods. Subcutaneous and abdominal adipose tissues are active tissues in the regulation of both physiological and pathological processes, including immunity and inflammation (Sun and Karin, 2012; Toubal et al., 2013; Lee et al., 2013).

Substantial increases in dietary refined sugars including sucrose, glucose and fructose have contributed to the rise in obesity rates (Dhingra et al., 2007; Sheludjakova et al., 2012). Emerging evidence suggests that the increased dietary consumption of fructose in Western society may be contributing to the growing rates of both obesity and metabolic syndrome. The pathologies of these disorders include insulin resistance, dyslipidemia, central obesity, hypertension and diabetes mellitus (Ferdner et al., 2010). These factors are closely associated with

both abnormal cytokine production and the activation of a network of inflammatory signaling pathways (Fortino et al., 2007). The consequences of these changes are unclear but may be linked to increases in susceptibility to and morbidity associated with infections reported among obese individuals (Falagas and Kompoti, 2006). In the present study, we investigated the effects of dietary fructose on behavioral responses during immunological challenge.

Sickness behavior is an expression of a motivational state triggered by the activation of the peripheral innate immune system, whereby an organism reorganizes the necessity of fighting infection. This process is mediated by a series of highly coordinated physiological and behavioral changes including fever, fatigue, cognitive loss, anorexia, ahedonia, and social withdrawal. Sickness behavior is also triggered by soluble mediators produced at the site of infection by activated accessory immune cells. These mediators include proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and interleukin-6 (IL-6) as well as prostaglandins (Dantzer, 2009; Dantzer et al., 2008; de Paiva et al., 2010).

Diet-induced obesity exacerbates the anorexic, temperature and inflammatory responses to acute immune challenges; similar results have been reported for rats that developed obesity secondary to neonatal overfeeding; as adults, these rats exhibited exacerbated febrile

* Corresponding author at: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Av. José de Góes Monteiro, 21600, Alfenas, 37130-000, MG, Brazil.
 E-mail addresses: a.giustipaiva@gmail.com, alexandre.paiva@unifal-mg.edu.br (A. Giusti-Paiva).

responses to immune challenges with LPS (Pohl et al., 2009; Clarke et al., 2011; Lawrence et al., 2012).

Therefore, we hypothesize that changes in behavioral responses occur following LPS administration in animals with metabolic disorders induced by fructose ingestion. To identify the possible mechanisms underlying the effects of a fructose diet on sickness behavior, we analyzed cytokine expression in both peripheral tissues and the hypothalamus, as well as neuronal activity in key regions of the brain in response to LPS administration.

2. Material and methods

2.1. Animals and diets

Male Wistar rats weighing 200–230 g (7 weeks old) were obtained from the Central Facility of the Federal University of Alfenas and housed in a temperature-controlled room at 23 ± 1 °C, 40–60% humidity and a 12:12 h light:dark cycle (lights on at 7:00 am). The rats were randomly divided into two groups that were both fed standard rat chow but different water solutions: either normal tap water (control) or 10% fructose in tap water, for five weeks (Rogians et al., 2007). The animals had access to chow and either water or fructose solution ad libitum. The rats were group housed (four rats per cage) during the induction of the diet-induced metabolic disorders but were subsequently housed individually for the remainder of the experiment. All procedures were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki regarding the welfare of experimental animals and were approved by the Ethics Committee of the Federal University of Alfenas (protocol number: 530/2013).

2.2. Biochemical analysis and tissue collection

After 5 weeks, 16 animals (8 control and 8 fructose treated) were weighed to determine weight gain. The animals were subsequently killed by decapitation, and a blood sample was collected in a heparinized tube. The plasma was immediately isolated by centrifugation, and duplicate aliquots were stored at -80 °C before biochemical analyses. After the rats were sacrificed, epididymal and retroperitoneal adipose tissue samples were harvested and weighed (Higa et al., 2014). Commercial kits from InVivo Diagnostica Ltda (Itaboraí-MG, Brazil) were used to measure plasma total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c), triglycerides and glucose by the absorbance method. Non-high-density lipoprotein cholesterol (non-HDL-c) was measured by subtracting HDL-c from total plasma cholesterol.

2.3. Behavioral experimental procedures

In the animal room, both groups received an injection of either lipopolysaccharide (LPS), 1 mg/kg i.p. (extracted from *Escherichia coli*, serotype O26:B6, 18274, Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), or sterile isotonic saline (0.9% NaCl; 1 ml/kg; i.p.). To evaluate sickness behaviors, behavioral tests were performed 2 h following the LPS or saline treatments. All injections were administered between 08:00 and 11:00 am. These time points were chosen on the basis of previous behavioral, endocrine and neurochemical studies (Breese et al., 2008).

Table 1
Sequences of the primers used.

Gene	5' primer (5'–3')	3' primer (5'–3')
Gapdh	TCTCTGCTCTGCTGTTCT	TAAGGCCAATCCGTCACA
Rpl19	CCAAATGCAACTCTGTCAC	ANGGTCTCTCCGGCATCG
Actb	GTGAGTCCGGTCCAC	TCATCCAAGCGAAGCTGGTC
Il1b	TGCAACTCTCCCTCAACTC	AGGCGCTTGAAACAATCTTA
Il6	CAATCTCTCCAGCCCAAC	GCTGGAAGTCTCTCCGAC
Tnf	GGGCTCCCTCATCAGTC	TCCGCTTGCTGGTTTGCTAC

Gapdh (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), Rpl19 (ribosomal protein L19), Actb (β -actin), Tnf (tumor necrosis factor- α), Il1b (interleukin-1 β), and Il6 (interleukin-6).

Table 2
Body weight and adipose depot masses of rats pretreated with 10% fructose in tap water or normal tap water (control) for 5 weeks.

Parameter	Groups	
	Control	Fructose
Initial body weight (g)	212 \pm 12.3	220 \pm 8.4
Final body weight (g)	408 \pm 8.9	385 \pm 8.2
Adipose tissue (g/100 g bw.)		
Epididymal	3.66 \pm 0.23	4.6 \pm 0.25*
Retroperitoneal	2.83 \pm 0.21	6.02 \pm 0.39***

Values are the mean \pm S.E.M. The table footnotes denote the significance levels.

* $p < 0.05$.

*** $p < 0.001$ compared with the Control group.

2.3.1. Open field test

Locomotor activity was quantified for 5 min in an open field: a cylindrical box with a floor divided into 12 squares. Four squares were defined as the center, and the 8 squares along the walls were considered the periphery. Each rat ($n = 9$ –12 per group) was gently placed in the exact center of the box, and activity was scored as a line-crossing when a rat removed all four paws from one square and entered another. The behaviors of the animals were recorded, and the scores were manually marked by blinded observers (Swiergiel and Dunn, 2007).

2.3.2. Social interaction test

Three days before testing, another set of animals was pretreated with either tap water or a fructose solution ($n = 9$ animals/group); the animals were allowed to explore the apparatus individually for 15 min/day to familiarize themselves with the apparatus, but not with their partner. Each experimental rat treated with either saline or LPS was randomly assigned to an unfamiliar partner (juvenile visitor rat) of the same strain and sex. The pair of unfamiliar rats was placed in the apparatus for 5 min, and the total amount of time spent engaged in active social interaction was recorded, including sniffing, grooming, following and mounting as well as crawling over or under the visitor mouse while in direct contact (Overstre et al., 2002).

2.3.3. Food intake test

To verify food and water or fructose solution consumption, the rats were housed singly in hanging cages with free access to chow in a metal container. They were habituated for 4 days before the experiments ($n = 9$ animals/group). The day before the experiment, the animals were deprived of food for 12 h but were not deprived of fluid. Two hours following the injection of either LPS or saline, food was given to the food-deprived rats; both food and volume intake were measured by subtracting the weight and volume remaining following 2, 4, 6, 8 and 24 h from the initial amount of food placed in the container (Rorato et al., 2012).

Table 3
Serum determination in the rats pretreated with either 10% fructose in tap water or normal tap water (control) for 5 weeks.

Biochemical determinations	Groups	
	Control	Fructose
Glucose (mg/dL)	122.4 \pm 1.68	138.1 \pm 3.59**
Triglycerides (mg/dL)	96.45 \pm 6.72	151.4 \pm 12.73***
Total cholesterol (mg/dL)	50.78 \pm 2.02	61.39 \pm 1.63**
HDL-c (mg/dL)	36.78 \pm 1.62	43.95 \pm 2.19*
nonHDL-c (mg/dL)	15.20 \pm 1.079	23.06 \pm 2.15**

Values are the mean \pm standard error of the mean.

Means with different superscripts differ significantly, $p < 0.05$.

Table 4
Effects of fructose solution or water on the absolute number of c-Fos labeled neurons in the BNST, SON, PCx, MPOA, LS, and PVN after injection of sterile saline or LPS (1000 µg/kg).

c-Fos	Experimental groups			
	Control + Sal	Control + LPS	Fructose + Sal	Fructose + LPS
BNST	33.00 ± 1.91	61.75 ± 0.63*	37.00 ± 2.34	71.75 ± 1.10**
PCx	118.0 ± 4.07	147.6 ± 20.34	119.8 ± 11.34	232.0 ± 12.5*
MPOA	80.20 ± 6.38	153.0 ± 4.25*	95.25 ± 1.88*	207.8 ± 10.9**
LS	115.0 ± 13.45	118.5 ± 10.73	99.50 ± 0.53	188.3 ± 9.86**
PVN	70.40 ± 5.71	155.7 ± 33.7	68.00 ± 0.13	166.7 ± 15.6
SON	14.20 ± 1.74	53.00 ± 6.40*	12.00 ± 1.22	87.60 ± 7.49**

BNST (bed nucleus of stria terminalis), MPOA (medial preoptic area), LS (lateral septal area), PCx (piriform cortex), PVN (paraventricular nucleus), SON (supraoptic nucleus). Values are the mean ± S.E.M. The table footnotes denote the significance levels.

* $p < 0.05$ compared with the Control + Saline group.

** $p < 0.05$ compared with the Control + LPS group.

2.4. Body temperature measurement

The rats were anesthetized using 2,2,2-tribromoethanol (Aldrich, Milwaukee, Wis., USA, 250 mg/kg i.p.). A paramedian laparotomy was performed for the insertion of a biotelemetry probe capsule (model PDT-4000 E-Mitter®, Bend, Oregon, USA) into the abdominal cavity. The wound was then sutured, and the implanted capsule was used for measurements of core body temperature. Following surgery, the animals were treated with benzylpenicillin (100,000 U i.m.). These procedures have been used previously (Steiner et al., 1999; Giusti-Paiva et al., 2003). Fully conscious rats with previously implanted biotelemetry probes were housed individually in cages for at least 24 h prior to the experiments ($n = 7–12$ animals/group). Body temperatures were recorded at 10-min intervals for 8 h following either saline or LPS injection (100 or 1000 µg/kg). The cages were placed on a telemetry receiver (model ER-4000 Energizer/Receiver Mini-Mitter®, Bend, Oregon, USA) connected to a PC. Data were collected using appropriate software (Vital View, Mini-Mitter, USA). Thermal indexes (TI, Celsius × minutes) were used to improve the data analysis and were calculated as the area under the curve of the body temperature measurements as previously described (Silva and Giusti-Paiva, 2015).

2.5. RNA extraction and quantitative RT-PCR

Following five weeks of treatment with either water or fructose, the animals were treated with either LPS or saline. Tissue collection was performed 2 h following treatment. The animals were killed by decapitation, and hypothalamus, epididymal and retroperitoneal adipose tissue samples ($n = 4–5$ animals/group) were subsequently harvested for RNA extraction and quantitative RT-PCR. Total RNA was extracted using a TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies) and an RNeasy Kit (Qiagen). For cDNA synthesis, an expanded reverse transcriptase

(Invitrogen) was used in accordance with the manufacturer's instructions, and the cDNA was diluted in DNase-free water (1:25) before quantification by real-time PCR. The mRNA transcript levels were measured in duplicate using a Rotor Gene 3000 system (Montreal Biotech, Montreal, QC, Canada). Gene expression was evaluated via real-time PCR using a Rotor Gene (Qiagen), with SYBR Green serving as the fluorescent dye (Vinolo et al., 2012). The primer sequences are included in Table 1. The results are expressed as the ratio between the expression of the target gene and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), ribosomal protein L19 (RPL19), and β -actin for the hypothalamus, the retroperitoneal adipose tissue and the epididymal adipose tissue samples, respectively. These control genes were selected because no significant variations in their expression were observed between treatments.

2.5. Perfusion, tissue preparation and immunohistochemistry

In this set of experiments, the rats pretreated with either water or fructose for 5 weeks were treated with either LPS (1 mg/kg, i.p.) or saline ($n = 4–6$ animals/group). The animals were deeply anesthetized with tribromoethanol (250 mg/kg) 2 h following treatment. They were subsequently perfused with cold 0.9% NaCl solution containing heparin (50 U/l) followed by 4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.2. Their brains were removed, post-fixed for 4 h in perfusion solution and stored at 4 °C in PB containing 30% sucrose. A cryostat was used to collect coronal sections with a thickness of 30 µm in 0.01 M PB. Briefly, the sections were incubated with 0.03% H₂O₂ for 30 min and washed with 0.01 M PB before being incubated in 5% bovine albumin in 0.1 M PB for 1 h to block non-specific binding sites. The sections were subsequently incubated overnight at room temperature with a rabbit anti-c-Fos antibody (Ab-5, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA) diluted 1:10,000 in 0.1 M PB containing 2% normal goat serum and 0.3% Triton X-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Following washing, the free-floating sections were incubated with a biotin-labeled goat anti-rabbit immunoglobulin (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA, 1:200 in 0.1 M PB containing 1.5% normal goat serum) followed by incubation with an avidin-biotin-peroxidase complex (Vector Elite, 1:200 in 0.1 M PB). Each incubation lasted for 1 h at room temperature. The blue-black labeling of the cell nuclei was detected using diaminobenzidine hydrochloride (DAB, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) intensified with 1% cobalt chloride and 1% nickel ammonium sulfate. Finally, the sections were mounted on gelatinized slides, air-dried overnight, dehydrated, cleared in xylene and coverslipped with mounting medium. The sections chosen for quantification were selected using a rat brain atlas to confirm the similarities of the neuroanatomical areas between the experimental and the control groups. The immunoreactive neurons for c-Fos were counted in the medial preoptic area (MPOA, 0.30 mm anterior to bregma), the bed nucleus of stria terminalis (BNST, 0.20 mm anterior to bregma), the lateral septal area (LS, 0.72 mm anterior to bregma), the piriform cortex (PCx,



Fig. 1. The effects of pretreatment with either 10% fructose in tap water or normal tap water (control) on the open field test results, which were evaluated 2 h following the administration of either lipopolysaccharide (LPS) or saline. Each column represents the mean ± S.E.M. The symbols denote the significance levels: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with the Control + Saline group; * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ compared with the Control + LPS group.

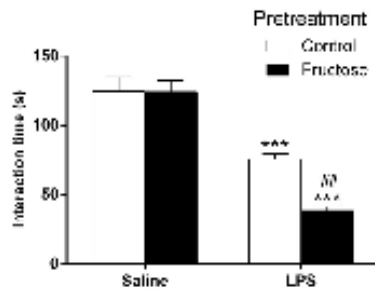


Fig. 2. The effects of pretreatment with either 10% fructose in tap water or normal tap water (control) on the social interaction test results, which were evaluated 2 h following the administration of either lipopolysaccharide (LPS) or saline. Each column represents the mean \pm SEM. The symbols denote the significance levels: *** p < 0.001 compared with the Control + Saline group; ** p < 0.01 compared with the Control + LPS group.

0.12 mm anterior to bregma), the paraventricular nucleus (PVN, 1.30 mm posterior to bregma) and the supraoptic nucleus (SON, 1.30 mm posterior to bregma) (Paxinos and Watson, 2007). A dotted area for each area to be counted was produced according to the rat brain atlas and was projected over each tissue section image to provide the necessary delimitation for counting. The cells were subsequently counted manually at higher magnifications under a microscope with the aid of a computerized system that included a Nikon Eclipse 80i microscope equipped with a DS-R11 Nikon digital camera attached to a contrast-enhancement device. The counting was performed unilaterally in one section per animal, and the threshold for positive staining was individually established by two different participants blinded to the experimental conditions. As previously reported, the final results represented the mean findings of two independent evaluations (Vilela and Giusti-Paiva, 2014).

2.7. Statistical analysis

The data were analyzed using GraphPad Prism version 6.0, and the results are expressed as the mean \pm SEM. The biometric and hormonal parameters were compared using a t test. In the other experiments, the pretreatment (water tap or fructose solution) and immunological challenge (saline or LPS) factors were analyzed using a two-way analysis of

variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test. The significance level was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Biometrical analysis, adipose tissue and biochemical analysis

Following 5 weeks of treatment with either water or fructose, there was no significant difference in body weight between the rats treated with the fructose solution and the control subjects. Fructose treatment induced a significant increase in epididymal adiposity ($P < 0.05$), as well as retroperitoneal adiposity ($P < 0.001$), compared with the control group (Table 2). Additionally, the animals treated with fructose exhibited elevated glucose ($P < 0.01$), triglyceride ($P < 0.001$), total cholesterol ($P < 0.01$), high-density lipoprotein cholesterol ($P < 0.05$) and non-high-density lipoprotein cholesterol ($P < 0.01$) levels compared with the control group. See Table 3.

3.2. Activity in the open field test

Fig. 1 depicts the effects of either the vehicle or LPS on the numbers of line-crossings in the open fields among the animals treated with either water or fructose. At 2 h following either LPS or saline treatment, LPS decreased the activity in the open field test with the exception of the number of central crossings (Fig. 1); and this effect of the immunological challenge was more accentuated in the rats pretreated with fructose. The effects of LPS were accentuated in the number of peripheral crossings, the total number of crossings and the total number of rearings (statistical data: Supplementary material, Table 1).

3.3. Social interaction test

After 5 weeks, we evaluated the social interaction time, as shown in Fig. 2. In the social interaction test, a two-way ANOVA demonstrated that LPS reduced social interaction time, and the effect was accentuated among the animals pretreated with fructose (statistical data: Supplementary material, Table 1).

3.4. Food intake test

The post hoc test indicated that, in the control group, the injection of LPS reduced food intake, solution intake and total calorie intake. These effects were observed 2 h following LPS injection. A similar

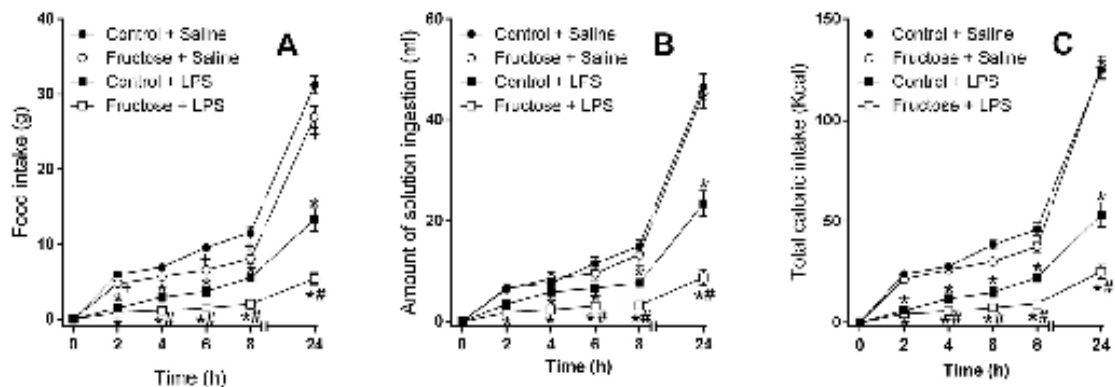


Fig. 3. The time course of the effect of pretreatment with either 10% fructose in tap water or normal tap water (control) on food intake (A), the amount of solution ingested (B) and the total caloric intake (C) following either lipopolysaccharide (LPS) or saline injection. Data are expressed as the mean \pm SEM. The symbols denote the significance levels: * p < 0.05 compared with the Control + Saline group; # p < 0.05 compared with the Control + LPS group.

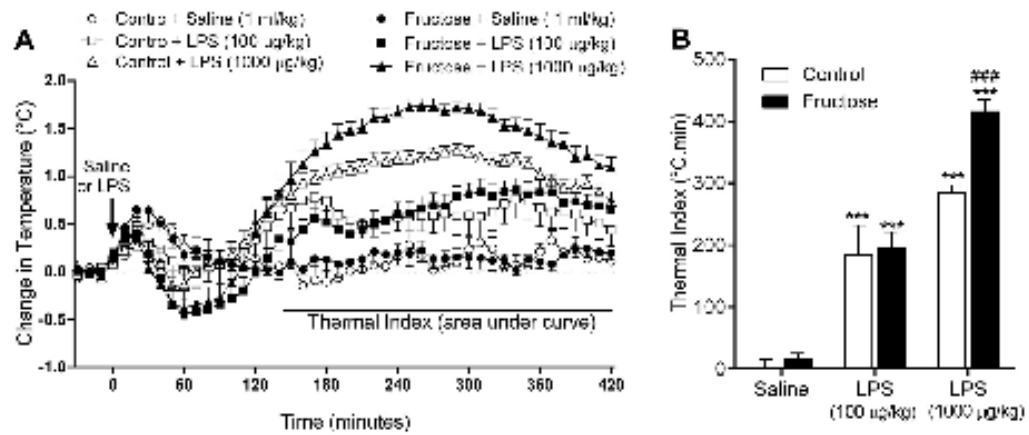


Fig. 4. The time course of the effect of pretreatment with either 10% fructose in tap water or normal tap water (control) on temperature changes (A) and thermal index (B) following either lipopolysaccharide (LPS) or saline injection. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. The symbols denote the significance levels: *** p < 0.001 compared with the Control + Saline group; ** p < 0.001 compared with the Control + LPS group.

effect was observed for the animals pretreated with fructose. Additionally, the animals pretreated with fructose exhibited reduced food intake; however, their total caloric intake was the same, indicating that supplementary caloric intake was provided by the fructose solution. Therefore, at 24 h following either saline or LPS administration, we observed a decreased food intake in the groups treated with LPS (Fig. 3A), as well as reduced solution intake (Fig. 3B), compared with the groups treated with sterile saline. However,

the reduction in total caloric intake was accentuated in the fructose group compared with the control group following LPS administration (Fig. 3C; statistical data: Supplementary material, Table 1).

3.5. Body temperature measurement

Fig. 4 shows the time-course of body temperature following either saline or LPS treatment in the animals pretreated with either water or

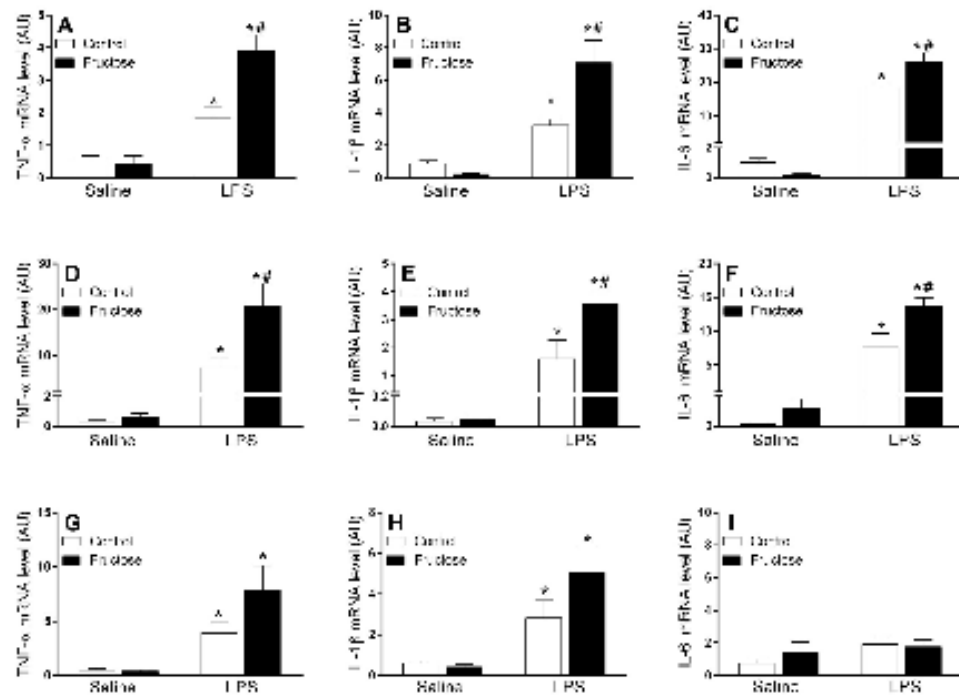


Fig. 5. The effects of pretreatment with either 10% fructose in tap water or normal tap water (control), on TNF- α , IL-1 β and IL-6 mRNA levels in the hypothalamus (A, B and C), the retroperitoneal adipose tissue (D, E and F), and epididymal adipose tissue (G, H and I), which were evaluated 2 h following the administration of either lipopolysaccharide (LPS) or saline. Each column represents the mean \pm S.E.M. The symbols denote the significance levels: * p < 0.05 compared with the Control + Saline group; * p < 0.05 compared with the Control + LPS group.

fructose. The injection of LPS into the control animals induced an increase in body temperature (fever, Fig. 4A), as evidenced by an increase in thermal index. The thermal index increased between 150 and

420 min following either LPS or saline administration (Fig. 4B), and increased body temperature was noted in both the water and the fructose pretreatment groups; however, the change was greater in the fructose

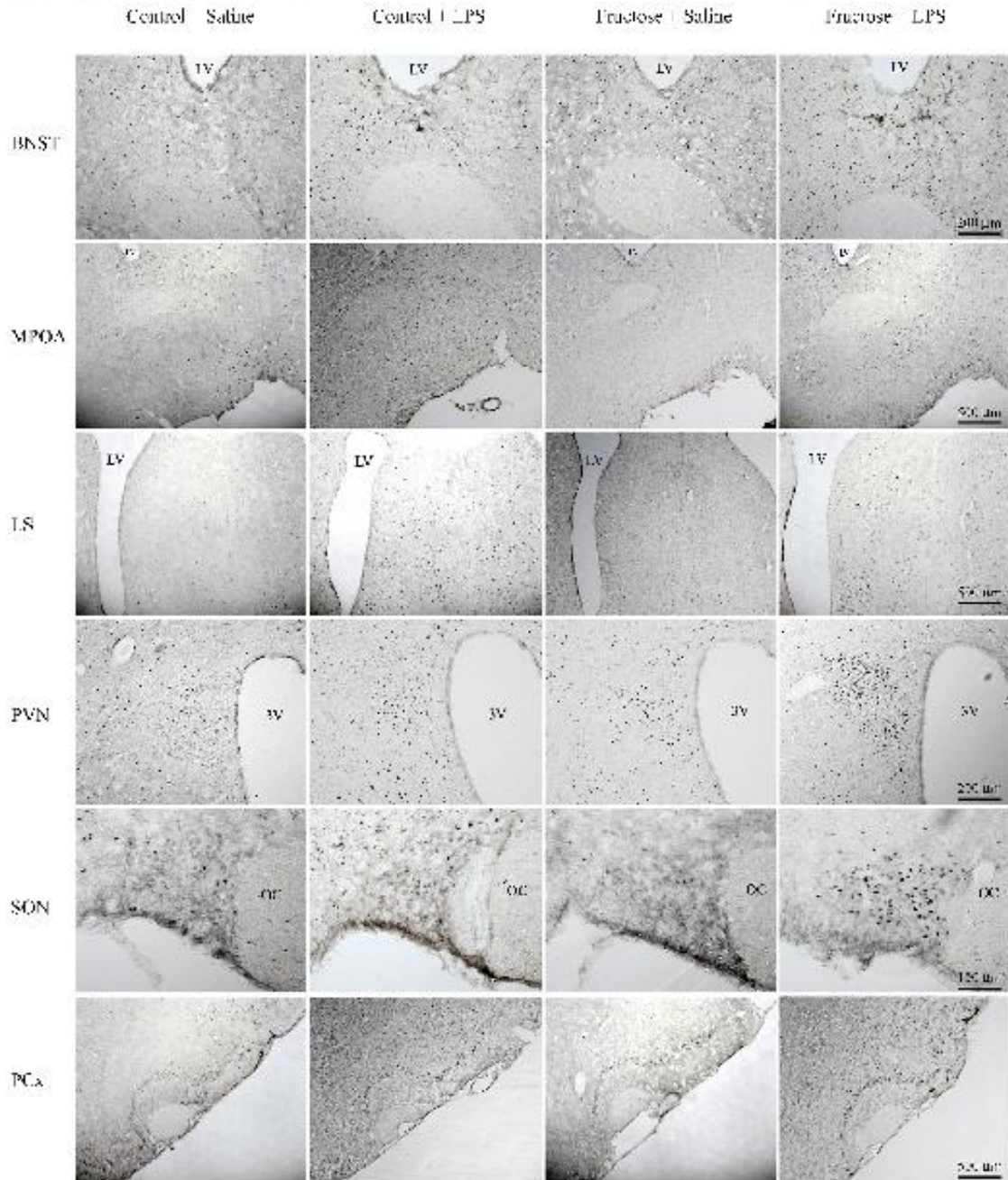


Fig. 6. Representative photomicrographs showing the immunoreactivity of c-Fos (black nuclei) in the BNST (bed nucleus of stria terminalis), MPOA (medial preoptic area), LS (lateral septal area), PCx (piriform cortex), PVN (paraventricular nucleus), and SON (supraoptic nucleus) of rat pretreated with either 10% fructose in tap water or normal tap water (control), evaluated 2 h following the administration of either lipopolysaccharide (LPS) or saline. 3V: third ventricular, and OC: optic chiasm. Bar: scale (μm).

group treated with LPS (statistical data: Supplementary material, Table 1).

3.6. Cytokine expression in the hypothalamus and adipose tissue

LPS treatment increased $Tnf-\alpha$, IL-1 β and IL-6 gene expression in the hypothalamus compared with saline treatment. Fructose solution pretreatment exacerbated the increases in $Tnf-\alpha$, IL-1 β and IL-6 (Fig. 5A, 5B and 5C, respectively) induced by LPS compared with the control group. Similarly, LPS administration increased $Tnf-\alpha$, IL-1 β and IL-6 gene expression in the retroperitoneal adipose tissue; this response was higher in the animals pretreated with fructose (Fig. 5D, 5E and 5F, respectively). Furthermore, in the epididymal adipose tissue, LPS administration increased $Tnf-\alpha$ (Fig. 5G) and IL-1 β (Fig. 5H) expression but not IL6 (Fig. 5I) expression. The level of cytokine expression in the epididymal tissue was not changed by pretreatment with fructose solution (statistical data: Supplementary material, Table 2).

3.7. Immunohistochemistry for c-Fos

LPS treatment increased the number of c-Fos-labeled neurons in several areas of the forebrain compared with saline treatment (Table 4, statistical data: Supplementary material, Table 3). Fructose solution pretreatment exacerbated the increases in the numbers of c-Fos-labeled neurons in the BNST, SON, PCx, MPOA and LS induced by LPS compared with the control group. See Fig. 6.

4. Discussion

In this study, the development of metabolic disorders such as dyslipidemia, increased blood glucose levels, and increased adipose tissue was observed in fructose-pretreated rats. Our primary findings were that metabolic disorders induced by fructose strengthened the sickness behaviors induced by LPS. This effect may be related to the increased expression of $Tnf-\alpha$, IL-1 β and IL-6, as well as increased numbers of c-Fos-labeled neurons in the forebrain.

Fructose supplementation increased plasma glucose, triglyceride, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol and non-high-density lipoprotein cholesterol levels. In both humans and laboratory animals, fructose-rich diets induce a stress response in the liver and other tissues that compromises both glucose and lipid metabolism (Kelley et al., 2004). The mechanisms underlying fructose-induced dyslipidemia have been partially elucidated. Fructose enters cells via the insulin-independent Glut-5 transporter. Once inside the cell, fructose is phosphorylated to form fructose-1-phosphate (Mayes, 1993). In this configuration, fructose is readily cleaved by aldolase to form trioses that are the backbone for phospholipid and triacylglycerol synthesis.

Fructose is primarily metabolized in the liver (50–75%), where it forms lipogenic substrates such as glyceraldehyde 3-phosphate, acetyl CoA and diacylglycerol. Enhanced lipid synthesis contributes to dyslipidemia and ectopic lipid deposition in the liver and muscle tissue and promotes hepatic and whole-body insulin resistance (Tappy and Le, 2010). Fructose consumption in human subjects has been linked to each of the identifying features of metabolic syndrome, including dyslipidemia, visceral adiposity, insulin resistance and high blood pressure (Le et al., 2009; Stanhope et al., 2009).

Fortino et al. (2007) reported increased visceral fat in conjunction with carbohydrate overload, which was verified in this study. Other diets such as a high-fat diet or a sucrose-enriched high-carbohydrate diet result in increased abdominal adiposity (both gonadal and retroperitoneal fat) (Arcego et al., 2014). Lipogenesis stimulates the deposition of triglycerides in adipose and ectopic tissues such as the liver and muscle, eventually resulting in impaired insulin signaling, dyslipidemia and hepatic steatosis (Stanhope and Havel, 2009). Fructose feeding has therefore been historically utilized as a model for studying various aspects of hepatic dyslipidemia and insulin resistance (Allen

and Lealy, 1966; Bar-On and Stein, 1968). Fructose consumption may specifically promote lipid deposition in visceral adipose tissue, particularly in men, whereas glucose consumption appears to support lipid deposition in the subcutaneous adipose tissue (Stanhope et al., 2009).

The metabolic activity of adipose tissue contributes to elevated levels of inflammatory factors similar to those observed in infection and autoimmune disease (Berg and Scherer, 2005; Forshee et al., 2007; Assy et al., 2008; Ouyang et al., 2008). Accumulating evidence indicates that obesity is associated with a state of chronic low-grade inflammation (Hotamisligil, 2006; Schenk et al., 2008). Visceral adipose tissue is a crucial site in the generation of inflammatory responses and inflammatory mediators (Wellen and Hotamisligil, 2005; Shoelson et al., 2006). However, exacerbated inflammatory responses to immune challenges, including fever and sickness symptoms, as well as the mechanisms associated with these exacerbations, have not yet been investigated in animals with fructose-induced obesity. Ruth et al. (2008) demonstrated that obese Zucker (*fa/fa*) rats have altered immune function and produce more pro-inflammatory cytokines than lean rats. We demonstrated that fructose-induced obese rats exhibited altered sickness behaviors in terms of locomotion, social interaction, food intake, and fever responses to bacterial endotoxin (LPS) compared with control rats. An analysis of the potential mechanisms underlying these findings led us to conclude that the exacerbation of sickness is associated with higher cytokine expression levels ($Tnf-\alpha$, IL-1 β , IL-6) in the hypothalamus and increased activation of the cerebral nuclei associated with sickness. As described by Pohl et al. (2014a, 2014b), animals that were fed a hypercaloric diet demonstrated increased responses to immune challenges. This result suggests that, as opposed to the diet of the organism, the energy state of the organism plays a role in this response. In mice that were fed a high-fructose diet, Rodrigues et al. (2014) demonstrated intensified neutrophil influx in the liver, as well as elevated tissue cytokine concentrations. These events may play a role in initiating the inflammatory cascade induced by acute nutrient overload.

Commonly used to stimulate the innate immune system in a similar manner of response to bacterial infection, LPS is short-lived and non-replicating, which makes it an excellent and widely used model for assessing cytokine-induced sickness behavior (Beutler, 2004). LPS induces pronounced peripheral metabolic and hematological changes. It also induces several brain-controlled illness responses including fever, neuroendocrine changes, anorexia, adipisia and reduced locomotor activity, which are collectively termed sickness behavior (Dantzer et al., 2008; Saper et al., 2012). In terms of locomotor activity, LPS decreased mobility, primarily as a result of the effects mediated by proinflammatory cytokines such as IL-1 β (Swiergiel et al., 1999). In contrast to our findings, Baumgarner et al. (2014) observed attenuated inflammatory responses in mice with diet-induced obesity (the responses were not sufficient to alter the LPS-induced reductions in locomotor behavior); however, our study demonstrated a decrease in locomotor activity most likely related to an increase in cytokine expression in the hypothalamuses of rats that were fed a fructose-diet.

During the social interaction test, an adult male is exposed to a juvenile for a brief period of time. Social interaction is assessed based on anogenital sniffing, close following and head and neck grooming. Sickness-inducing agents such as LPS and IL-1 β disrupt these behaviors (Bluthé et al., 1992; Bluthé et al., 1998). According to Pohl et al. (2014a, 2014b), high-carbohydrate diets enhance the suppression of social interaction, and this same response was observed in our experiments that used a fructose diet to induce metabolic disorders.

Our results were characterized by a greater reduction in food intake following the injection of LPS in the fructose group. Lawrence et al. (2012) described two models of obesity: genetically obese leptin-deficient *ob/ob* mice and mice fed a high-fat diet, which exhibited an anorexic response and a rise in core body temperature in response to the peripheral administration of LPS. However, Clarke et al. (2011) observed no difference in the reduction of food intake following LPS

administration in postnatal rats with overfeeding-induced obesity; however, they did observe an exacerbated febrile response to LPS in this obesity model, as well as in a high-fat diet model, as was observed in our study.

As reported by Koenig et al. (2014), prolonged febrile responses in combination with aggravated anorexia, adiposia and decreased locomotor activity have been observed in aged animals following LPS-stimulation compared with younger rats. Pohl et al. (2014a, 2014b) also observed increased febrile responses in obese groups of rats. These authors believe that the cytokine-like hormone leptin plays a significant role in the febrile response acting on the modulation of cytokines such as TNF- α and IL-6. In our study, increased levels of these cytokines, both in the adipose tissue and the hypothalamus, may modulate both sickness behavior and fever. Leptin may be involved in the control of these mediators and any subsequent responses; however, more studies elucidating this mechanism are necessary (Steiner and Romanovsky, 2007).

It is important to determine the mechanisms involved in these behavioral effects following obesity induction and LPS administration, as such knowledge may explain more clearly the different peripheral and cerebral mechanisms underlying these results. Elevated pro-inflammatory mediators such as TNF- α , IL-1 β and IL-6 were observed in both the peripheral adipose tissue and the hypothalamus.

Therefore, we assessed the effects of metabolic disorders on the expression of Fos, an immediate-early gene whose expression has been commonly used as a marker of neuronal activation, in response to LPS. This bacterial endotoxin induced Fos expression in several brain nuclei, including the MPOA, PVN, SON, PCx, and LS.

The release of peripheral cytokines mediates behavioral responses to LPS by either directly or indirectly activating several key brain regions (Dantzer, 2004; Dantzer and Kelley, 2007). The intraperitoneal injection of LPS results in increased c-Fos immunopositive neurons in the nucleus tractus solitarius and the parabrachial nuclei, the PVN and the SON of the hypothalamus, and the BNST and the amygdala (Wan et al., 1994; Sagar et al., 1995; Dantzer, 2001; Dantzer et al., 2008). In our study, LPS induced increases in Fos expression in the SON, MPOA, LS and PCx; this response was greater among the animals pretreated with fructose. By contrast, Lawrence et al. (2012) observed either fewer Fos-positive cells or no significant activation of said cells in the SON or BNST of obese mice treated with LPS; the PVN exhibited a significant increase in the number of Fos-positive cells, however. Regarding the downregulation, increased Fos expression was observed in the MPOA of rats treated with fructose, and several studies have described increased Fos expression in both the PVN and the MPOA of rats following LPS stimulation (Elmqvist et al., 1996, 1997; du Plessis et al., 2006).

In summary, the results of the present study strongly demonstrate that fructose supplementation induces metabolic disorders such as dyslipidemia and the enhanced accumulation of visceral adipose tissue. Moreover, fructose feeding exacerbates behavioral and febrile responses to immune challenges, and these changes are accompanied by increases in both the expression of cytokines and c-Fos immunoreactivity, particularly in the hypothalamus.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

We would like to thank José Reis for his technical assistance; we would also like to acknowledge the financial support from CNPq (300977/2013-1), CAPES (Pr6-equipamentos) and FAPEMIG (APQ-01483-13).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.10.014>.

References

- Allen, R.L., Leahy, J.S., 1966. Some effects of dietary dextrose, fructose, liquid glucose and sucrose in the adult male rat. *Br. J. Nutr.* 20, 339–347.
- Azeiteiro, D.M., Krolow, R., Lampert, C., Noschang, C., Ferreira, A.G.K., Scherer, E., Wyse, A.T.S., Dalmaiz, C., 2014. Isolation during the prepubertal period associated with chronic access to palatable diets: effects on plasma lipid profile and liver oxidative stress. *Physiol. Behav.* 124, 23–32.
- Ayy, N., Nasser, G., Kamayse, I., Nseir, W., Nebiashvili, Z., Djibre, A., Grosved, M., 2008. Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors. *Can. J. Gastroenterol.* 22, 811–816.
- Bar-On, H., Stein, Y., 1968. Effect of glucose and fructose administration on lipid metabolism in the rat. *J. Nutr.* 94, 95–105.
- Baumgartner, K.M., Serr, S., Diaz, C., Littlefield, A., Jones, A., Kahman, R.A., 2014. Diet-induced obesity attenuates cytokine production following an immune challenge. *Behav. Brain Res.* 267, 33–41.
- Berg, A.H., Scheer, P.E., 2005. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ. Res.* 96, 939–949.
- Beutler, B., 2004. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* 40, 845–859.
- Bluthé, R.M., Dantzer, R., Kelley, K.W., 1992. Effects of interleukin-1 receptor antagonist on the behavioral effects of lipopolysaccharide in rat. *Brain Res.* 573, 318–320.
- Bluthé, R.M., Michaud, B., Pelli, V., Bernay, F., Pamer, P., Dantzer, R., 1998. Interleukin-6 is active only in presence of other proinflammatory cytokines to induce sickness behavior. *Neuroimmunomodulation* 5, 67.
- Breese, G.R., Knapp, D.J., Overstreet, D.H., Navarro, M., Willis, T.A., Angel, R.A., 2008. Repeated lipopolysaccharide (LPS) or cytokine treatments sensitize ethanol withdrawal-induced anxiety-like behavior. *Neuropsychopharmacology* 33, 867–876.
- Clafie, M.A., Stefanidis, A., Spencer, S.J., 2011. Postnatal overfeeding leads to obesity and exacerbated febrile responses to lipopolysaccharide throughout life. *J. Neuroendocrinol.* 24, 511–524.
- Dantzer, R., 2001. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav. Immun.* 15, 7–24.
- Dantzer, R., 2004. Cytokine-induced sickness behavior: a neuroimmune response to activation of innate immunity. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 399–411.
- Dantzer, R., 2009. Cytokine, sickness behavior, and depression. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 29, 247–264.
- Dantzer, R., Kelley, K.W., 2007. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav. Immun.* 21, 153–160.
- Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., Kelley, K.W., 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 46–56.
- Dhingra, R., Sullivan, L., Jacques, P.F., Wang, T.J., Fox, C.S., Meigs, J.B., D'Agostino, R.B., Gaziano, J.M., Vasan, R.S., 2007. Soft drink consumption and risk of developing cardiovascular risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community. *Circulation* 116, 480–488.
- Elmqvist, J.K., Scammell, T.E., Jacobson, C.D., Saper, C.B., 1996. Distribution of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration. *J. Comp. Neurol.* 371, 85–103.
- Elmqvist, J.K., Scammell, T.E., Saper, C.B., 1997. Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. *Trends Neurosci.* 20, 565–570.
- Falga, M.F., Komposi, M., 2006. Obesity and infection. *Lancet Infect. Dis.* 6, 438–446.
- Fester, I., Ferde, M.D., Inzema, F., 2010. The role of high-fructose corn syrup in metabolic syndrome and hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* 12, 105–112.
- Fonhef, R.A., Storey, M.L., Allison, D.B., Glimmann, W.H., Heib, G.J., Lineback, D.R., Miller, S.A., Nicklas, T.A., Weaver, G.A., White, J.S., 2007. A critical examination of the evidence relating high fructose corn syrup and weight gain. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47, 561–582.
- Fortino, M.A., Lombardo, Y.B., Chicco, A., 2007. The reduction of dietary sucrose improves dyslipidemia, adiposity, and insulin secretion in an insulin-resistant rat model. *Nutrition* 23, 489–497.
- Glass-Palva, A., Branco, L.G.S., de Castro, M., Antunes-Rodrigues, J., Camiá, E.C., 2003. Role of nitric oxide in the downregulation during septic shock: involvement of vasopressin. *Eur. J. Physiol.* 447, 175–180.
- Higo, T.S., Spinko, A.V., Fonseca-Alaniz, M.H., Evangelista, F.S., 2014. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 6, 47–54.
- Hosaini, G.S., 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860–867.
- Kelley, G.L., Allan, G., Azhar, S., 2004. High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation. *Endocrinology* 145, 548–555.
- Koenig, S., Labeshi, G.N., Wenz, T., Gerstberger, R., Roth, J., Rummel, C., 2014. Leptin is involved in age-dependent changes in response to systemic inflammation in the rat. *Brain Behav. Immun.* 36, 128–138.
- Lawrence, C.B., Brough, D., Knight, E.M., 2012. Obese mice exhibit an altered behavioral and inflammatory response to lipopolysaccharide. *Diab. Metab. Res. Rev.* 5, 640–650.
- Le, K.A., Ith, M., Kiek, R., Faeh, D., Borsicordi, M., Tran, C., Boesch, C., Tappy, L., 2009. Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* 89, 1760–1765.

- Lee, H., Lee, I.S., Choue, R., 2013. Obesity, inflammation and diet. *Pediatr. Gastroenterol. Hepatol. Nutr.* 16, 143–152.
- Mayes, P.A., 1993. Intermittent metabolism of fructose. *Am. J. Clin. Nutr.* 58, 754S–765S.
- Ouyang, X., Cirillo, P., Sautin, Y., McCall, S., Bruchez, J.L., Diehl, A.M., Johnson, R.J., Abdelmalek, M.F., 2008. Fructose consumption as a risk factor for nonalcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 48, 998–999.
- Overstreet, D.H., Knapp, D.J., Breese, G.R., 2002. Accentuated decrease in social interaction in rats subjected to repeated ethanol withdrawals. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 26, 1259–1268.
- de Paiva, V.N., Lima, S.N., Fernandes, M.M., Sonchi, R., Andrade, C.A., Giusti-Paiva, A., 2010. Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice. *Behav. Brain Res.* 215, 146–151.
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic, San Diego.
- du Plessis, I., Mitchell, D., Mesler, C., Laburn, H.P., 2005. c-Fos immunoreactivity in selected brain regions of rats after heat exposure and pyrogen administration. *Brain Res.* 1120, 124–130.
- Pohl, J., Sheppard, M., Luheshi, G.N., Woodside, B., 2014a. Diet-induced weight gain produces a graded increase in behavioral responses to an acute immune challenge. *Biol. Behav. Immun.* 35, 43–50.
- Pohl, J., Woodside, B., Luheshi, G.N., 2009. Changes in hypothalamically mediated a satiety phase inflammatory responses to lipopolysaccharide in diet-induced obese rats. *Endocrinology* 150, 4901–4910.
- Pohl, J., Woodside, B., Luheshi, G.N., 2014b. Leptin modulates the late fever response to LPS in diet-induced obese animals. *Brain Behav. Immun.* 42, 41–47.
- Rodrigues, D.F., Henriques, M.C., Oliveira, M.C., Menezes-Garcia, Z., Marques, P.E., Souza, D.d.G., Menezes, G.B., Teixeira, M.M., Ferreira, A.V., 2014. Acute intake of a high-fructose diet alters the balance of adipokine concentrations and induces neutrophil influx in the liver. *J. Nutr. Biochem.* 25, 388–394.
- Roglans, N., Vila, I., Farré, M., Alegret, M., Sánchez, R.M., Vázquez-Carrera, M., Laguna, J.C., 2007. Impairment of hepatic stat-3 activation and reduction of PPAR α activity in fructose-fed rats. *Hepatology* 45, 778–788.
- Rozzo, R., Reis, W.L., Borges, B.C., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L.J.K., 2012. Cannabinoid CB1 receptor restrains accumbens activity of hypothalamic corticotropin-releasing factor and brainstem tyrosine hydroxylase neurons in endotoxemia-induced hypophagia in rats. *Neuropharmacology* 63, 154–160.
- Ruth, M.R., Taylor, C.G., Zahradka, P., Field, C.J., 2008. Abnormal immune responses in D β Zucker rats and effects of feeding conjugated linoleic acid. *Obesity (Silver Spring)* 16, 1770–1779.
- Sagar, S.M., Price, K.J., Kasting, N.W., Sharp, F.R., 1995. Anatomic patterns of Fos immunostaining in rat brain following systemic endotoxin administration. *Biol. Res. Bull.* 36, 381–392.
- Saper, C.B., Romanovsky, A.A., Sarmell, T.E., 2012. Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. *Nat. Neurosci.* 15, 1088–1095.
- Schenk, S., Saberi, M., Olefsky, J.M., 2008. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Invest.* 118, 2992–3002.
- Sheladnikova, A., Rooney, K., Roakes, R.A., 2012. Metabolic and behavioural effects of sucrose and fructose/glucose drinks in the rat. *Eur. J. Nutr.* 51, 445–454.
- Shoelson, S.E., Lee, J., Goldfine, A.B., 2006. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116, 1799–1801.
- Silva, V.C., Giusti-Paiva, A., 2015. Sickness behavior is delayed in hypothyroid mice. *Biol. Behav. Immun.* 45, 109–117.
- Stanhope, K.L., Havel, P.J., 2009. Fructose consumption: potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance. *J. Nutr.* 139, 1236S–1241S.
- Stanhope, K.L., Schwarz, J.M., Klem, N.J., Griffen, S.C., Bremer, A.A., Graham, J.L., Hatcher, B., Cox, C.L., Dyachenko, A., Zhang, W., McCalan, J.P., Seibert, A., Krauss, R.M., Chiu, S., Schaefer, E.J., Ai, M., Otsuzawa, S., Nakajima, K., Nakano, T., Beynen, C., Hellestein, M.K., Berglund, L., Havel, P.J., 2009. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J. Clin. Invest.* 119, 1322–1334.
- Steiner, A.A., Romanovsky, A.A., 2007. Leptin at the crossroads of energy balance and systemic inflammation. *Prog. Lipid Res.* 46, 89–107.
- Steiner, A.A., Carnib, E.C., Antunes-Rodrigues, J., Bianco, L.G.S., 1999. Endogenous vasopressin does not mediate hypotension-induced anorexia in rats. *J. Appl. Physiol.* 86, 469–473.
- Sun, B., Kafin, M., 2012. Obesity, inflammation, and liver cancer. *J. Hepatol.* 56, 704–713.
- Swiegiel, A.H., Dunn, A.J., 2007. Effects of interleukin-1 β and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 86, 651–659.
- Swiegiel, A.H., Burunda, T., Patterson, B., Dunn, A.J., 1999. Endotoxin- and interleukin-1-induced hypophagia are not affected by noradrenergic, dopaminergic, histaminergic and muscarinic antagonists. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 63, 629–637.
- Tappy, L., Le, K.A., 2010. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol. Rev.* 90, 23–46.
- Toubal, A., Tremier, E., Clément, K., Venticelli, N., 2013. Genomic and epigenomic regulation of adipose tissue inflammation in obesity. *Trends Endocrinol. Metab.* 24, 625–634.
- Vilela, F.C., Giusti-Paiva, A., 2014. Cannabinoid receptor agonist disrupts behavioral and neuroendocrine responses during lactation. *Behav. Brain Res.* 263, 190–197.
- Vinolo, M.A.R., Rodrigues, H.G., Fomacchia, W.T., Crisma, A.R., Alves, V.S., Martins, A.R., Amari, C.I., Fiamoncini, J., Hirabayashi, S.M., Sam, F.T., Fock, R.A., Malheiro, G., dos Santos, M.F., Curi, R., 2012. Tributyrin attenuates obesity-associated inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 303, E272–E282.
- Wan, W., Wetmore, L., Sommers, C.M., Greenberg, A.H., Nance, D.M., 1994. Neural and biochemical mediators of endotoxin and stress-induced c-Fos expression in the rat brain. *Brain Res. Bull.* 34, 7–14.
- Wellen, K.E., Hotamisligil, G.S., 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* 115, 1111–1119.
- WHO, 2000. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. Technical Report Series, p. 894.