

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL

PAULA VIANA SENE DOS SANTOS

Análise eletroforética de proteínas do cérebro de camundongos  
tratados com dieta rica em carboidratos refinados

Ituiutaba - MG  
Novembro - 2023

PAULA VIANA SENE DOS SANTOS

Análise eletroforética de proteínas do cérebro de camundongos tratados com dieta rica em carboidratos refinados

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Karen Calábria

Ituiutaba - MG  
Novembro - 2023

PAULA VIANA SENE DOS SANTOS

Análise eletroforética de proteínas do cérebro de camundongos tratados com dieta rica em carboidratos refinados

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Ituiutaba, 10 de novembro de 2023

Banca Examinadora:

---

Dra. Luciana Karen Calábria (UFU)

---

Dr. Israel José Pereira Garcia (UFSJ)

---

Ms. Alessandra Oliveira Silva (UNIFAL)

*Dedico este trabalho à minha família, por  
acreditarem em mim.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, pelo apoio e suporte emocional durante minha graduação. A minha mãe Paloma, pelo amor e por me ensinar a enfrentar meus medos, me mostrando uma fé inabalável e linda. A minha mãe Aline, por acreditar no meu potencial, por sempre me dizer que está orgulhosa e nunca me deixar esquecer a importância de uma educação de qualidade. A minha irmã Eduarda, por me incentivar a continuar e ouvir meus anseios e preocupações, tendo sempre algo para dizer que abrandasse minhas angústias. Sou infinitamente grata a vocês, e espero trazer orgulho durante minha caminhada acadêmica.

Ao meu pai, por todo incentivo para buscar o que me faria feliz e por comemorar comigo toda conquista que tive em âmbito acadêmico. Agradeço o suporte financeiro e por me ajudar a enxergar, em mim, a capacidade e garra necessárias para seguir em frente.

Agradeço ao meu avô Domingos. Nada no mundo me faria mais feliz do que tê-lo por perto ainda, para que visse que tudo o que me ensinou não foi em vão. Em memória dele, faço meu melhor para que um dia eu possa lhe contar sobre tudo que conquistei.

À Rebeca, que acompanhou mais de perto cada passo desse percurso. Agradeço, de todo meu coração, por acreditar em mim sem nunca duvidar, por me ouvir chorar e rir, e por chorar e rir comigo. Obrigada pelo apoio, pelo amor e por me ajudar a enxergar as coisas boas pelo caminho.

Aos amigos que fiz nesses anos, agradeço a companhia, as risadas e incentivos. Obrigada por nunca me deixarem sentir sozinha, por surtarem comigo e me proporcionarem tanta alegria. Em especial, agradeço à Sttefany por ser minha dupla de laboratório, com quem fiz meus primeiros experimentos e quem passou por todo o sufoco e anseios comigo.

Agradeço a minha orientadora Prof. Dra. Luciana Karen Calábria, pela paciência e por ter me dado ensinamentos que vão além da vida acadêmica. Obrigada por me orientar quando me sentia perdida, por acreditar na minha capacidade de concluir essa etapa e por me apresentar essa área de estudo pela qual me apaixonei. Toda a minha admiração pela profissional excelente que você é.

Agradeço também ao Prof. Dr. Stêfany Bruno de Assis Cau por ter doado os cérebros dos camundongos que foram utilizados na realização deste trabalho.

Agradeço ao Programa de Educação Tutorial Bio Pontal, pelas inúmeras oportunidades que me ofereceu e por abrir meus olhos para as possibilidades da vida acadêmica. Sou grata ao PET pela iniciação científica que se tornou meu TCC, em uma área que não esperava me

interessar tanto. Agradeço à professora Gabriela Lícia Santos Ferreira pela dedicação ao grupo, e por todo cuidado, orientação e ensinamento.

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia, pela bolsa ao PET e pela oportunidade de cursar Ciências Biológicas com professores tão competentes.

## **APRESENTAÇÃO**

O formato deste Trabalho de Conclusão de Curso cumpre as normas aprovadas pelo Curso de Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da Universidade Federal de Uberlândia (Portaria COBIP Nº 18, de 13 de setembro de 2023).

Este trabalho foi redigido no formato de artigo científico, em português, respeitando as normas da Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento, as quais podem ser acessadas no endereço eletrônico: <http://www.rbone.com.br/index.php/rbone/about/submissions>. O manuscrito representa o estudo na íntegra e será submetido para publicação somente após as considerações dos membros da banca examinadora.

## RESUMO

A dieta rica em carboidratos refinados tem apontado impactos não somente em distúrbios metabólicos, como obesidade e diabetes *mellitus*, mas também em funções cognitivas (memória e aprendizado) e comportamentais. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão diferencial de proteínas no cérebro de camundongos Balb/c alimentados com dieta rica em carboidratos refinados. Os animais foram alimentados por oito semanas com dieta padrão para roedores ou dieta rica em carboidratos refinados, e posteriormente eutanasiados e dissecados. Os cérebros foram homogeneizados e o sobrenadante foi submetido à dosagem de proteína total. Aliquotas de 10 µg foram analisadas em SDS-PAGE 12,5% e as bandas no gel corado tiveram a medida de massa molecular relativa calculada. O perfil eletroforético das amostras revelou a expressão das proteínas de 91,6; 86,3; 74,3; 65,9; 56,8; 46,1; 40,9; 36,3; e 27,8 kDa em ambos os grupos, sem diferença significativa entre elas por meio da análise do índice de densidade óptica. Esse resultado diverge da literatura, que vem demonstrando alterações moleculares no cérebro provocadas pela dieta rica em açúcares. Contudo, foi possível predizer as proteínas e sugere-se que, em sua maioria, estão relacionadas com o metabolismo energético do cérebro para carboidratos, lipídeos e aminoácidos. O pouco tempo de exposição dos animais à dieta pode justificar a ausência de alterações proteicas e a utilização de metodologias mais acuradas se faz necessária para identificação da diferença de expressão no cérebro a partir da dieta rica em carboidratos refinados, de modo a esclarecer os mecanismos moleculares que podem ser alterados na condição estudada.

**Palavras-chaves:** Dieta isocalórica. Sistema Nervoso Central. SDS-PAGE.

## ABSTRACT

A diet rich in refined carbohydrates has been shown to impact not only metabolic disorders such as obesity and diabetes *mellitus*, but also behavioral and cognitive functions (memory and learning). The aim of this study was to evaluate the differential expression of proteins in the brains of Balb/c mice fed a high-refined carbohydrate diet. The animals were fed either a standard rodent diet or a diet rich in refined carbohydrates for eight weeks, then euthanized and dissected. The brains were homogenized and the supernatant was subjected to total protein assay. Aliquots of 10 µg were analyzed on 12.5% SDS-PAGE and the bands in stained gel had their relative molecular mass calculated. The electrophoretic profile of the samples revealed a protein expression of 91.6; 86.3; 74.3; 65.9; 56.8; 46.1; 40.9; 36.3; and 27.8 kDa in both groups, with no significant difference between them based on the optical density. This result differs from the literature, which has demonstrated molecular alterations in the brain caused by the sugar-rich diet. However, the proteins could be predicted and it is proposed that, in their majority, they are related to the brain's energy metabolism for carbohydrates, lipids and amino acids. The short amount of exposure time of the animals to the diet may justify the absence of protein alterations and the use of more accurate methodologies is necessary to identify the differential brain expression based on the high-refined carbohydrate diet, in order to clarify the molecular mechanisms that may be altered in the studied condition.

**Keywords:** Isocaloric Diet. Central Nervous System. SDS-PAGE.

## SUMÁRIO

|                                                    |            |
|----------------------------------------------------|------------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                          | <b>111</b> |
| <b>2 METODOLOGIA .....</b>                         | <b>155</b> |
| Animais e delineamento experimental.....           | 15         |
| Homogeneização dos cérebros .....                  | 15         |
| Dosagem de proteína total.....                     | 16         |
| Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE 12,5%) ..... | 16         |
| Aquisição e análise da imagem .....                | 16         |
| Investigação <i>in silico</i> .....                | 16         |
| Análise estatística.....                           | 17         |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>              | <b>18</b>  |
| <b>4 CONCLUSÃO .....</b>                           | <b>25</b>  |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                           | <b>26</b>  |

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo dados do VIGITEL, cerca de 22% da população brasileira é considerada obesa, enquanto mais de 57% está acima do peso (BRASIL, 2022). A obesidade foi caracterizada como uma das principais causas de óbito no Brasil em 2019, com estimativa de 12,6% do total de mortes no país. Juntamente com as mudanças climáticas e a desnutrição, a obesidade é considerada uma pandemia constituinte de uma Sindemia Global, e os estigmas acerca da doença são impeditivos para que a questão seja considerada suficientemente urgente (Swinburn *et al.*, 2019).

Sendo uma condição com crescente prevalência no mundo nas últimas décadas (BRASIL, 2022), cerca de 11 milhões de mortes prematuras poderiam ter sido evitadas no planeta a partir da melhoria na qualidade dietética (Dong *et al.*, 2019). Assim, a dieta desbalanceada pode ser uma das causas dos distúrbios metabólicos, como a obesidade, mas também do diabetes *mellitus* tipo 2 e da inflamação crônica de baixo grau (Vasiljević *et al.*, 2014).

O consumo de carboidratos no Brasil é superior a 50% (Louzada *et al.*, 2015), dentre alimentos *in natura* e com diferentes tipos de etapas de processamento. A composição da dieta influencia diretamente a saúde humana, e o aumento do consumo de alimentos *in natura* ou minimamente processados pode ter um alto impacto na longevidade do indivíduo. Os alimentos *in natura* são obtidos diretamente de plantas ou animais, e não são submetidos a qualquer alteração prévia ao seu consumo, a exemplo as frutas, ovos, carnes e legumes (BRASIL, 2014; Rossato *et al.*, 2023).

Por outro lado, alimentos minimamente processados são os *in natura* que, antes de serem consumidos, requerem processamento mínimo sem que haja adição de ingredientes ou substâncias, como o congelamento de carnes, pasteurização do leite, moagem de grãos (BRASIL, 2014; Rossato *et al.*, 2023). Estes processos aumentam a durabilidade do alimento ou facilitam sua digestão sem alterar sua composição, o que os tornam a base nutricional ideal indicada pelo Ministério da Saúde para uma alimentação adequada e balanceada. Os benefícios do consumo de alimentos *in natura* se dão desde a ausência de aditivos à riqueza de proteínas, vitaminas, minerais, fibras, dentre os de origem animal e vegetal (BRASIL, 2014).

Os alimentos processados, isto é, submetidos à alteração de sua composição nutricional através de adição de sal, conservantes ou açúcar são ainda derivados dos alimentos naturais, porém com maior densidade calórica (BRASIL, 2014). De acordo com a classificação NOVA (que não é uma sigla; Kelly; Jacoby, 2018), os alimentos ultraprocessados, por sua vez, são

produzidos a partir de substâncias derivadas de alimentos, contendo pouco ou nenhum alimento inteiro, tratados com aromatizantes, corantes e aditivos para aprimorar seu aspecto e durabilidade (Costa *et al.*, 2021), como biscoitos recheados, chocolates, refrigerantes, sendo carregados em açúcares e gorduras (Louzada *et al.*, 2023). Essa categoria de alimentos representou, entre 2017 e 2018, aproximadamente 20% do total de calorias ingeridas por adultos e adolescentes no Brasil (Costa *et al.*, 2021).

A participação de alimentos ultraprocessados na dieta resulta não somente em ganho de peso (Hall *et al.*, 2019), como também na redução do consumo de fibras, para valores menores do que o recomendado pela Organização Mundial da Saúde (Cruz *et al.*, 2021), e assim evidencia seu risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), que inclui diabetes, obesidade, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e depressão (Costa *et al.*, 2021). A tendência no consumo de alimentos ultraprocessados é de quantidades maiores de calorias do que o necessário, uma vez que não promovem saciedade ou promovem tardiamente (BRASIL, 2014).

Os padrões nutricionais globais de crescente consumo de alimentos ultraprocessados por crianças e adolescentes devido à facilidade de acesso e exposição a esses alimentos (Louzada *et al.*, 2023) é preocupante, porque a fase de maturação do córtex pré-frontal é sensível aos hábitos dietéticos que podem resultar em deficiências cognitivas duradouras (Reichelt, 2016). A infância também é um período de desenvolvimento vulnerável para déficits na cognição relacionados à ingestão de açúcar, por exemplo, pelo consumo de bebidas açucaradas (Noble *et al.*, 2019). Cerca de 85% da população brasileira utiliza a adição de açúcar nos alimentos como hábito alimentar (BRASIL, 2020). Bebidas adoçadas com açúcar, como refrigerantes, são grandes contribuintes da quantidade de açúcar ingerido mundialmente, sendo o consumo em cinco dias ou mais da semana reportado por 14% da população adulta brasileira nas 27 capitais do país (BRASIL, 2022).

Além dos prejuízos diretos relacionados ao consumo excessivo de açúcares já mencionados, há também o acúmulo de gordura em órgãos internos e periféricos devido à energia remanescente proveniente de uma dieta rica em açúcares refinados (Witek; Wydra; Filip, 2022). Esta dieta nem sempre resulta em ganho de peso, todavia o aumento da adiposidade visceral é observado com frequência, bem como o aumento da expressão de proteínas pró-inflamatórias no tecido adiposo (Oliveira *et al.*, 2013).

Estudos demonstram a participação desta dieta na indução de respostas inflamatórias, não somente localizada no adipócito, mas também de forma sistêmica (Oliveira *et al.*, 2013). Indivíduos obesos com estado de inflamação sistêmica apresentam maior glicemia pós-

prandial e concentrações elevadas de marcadores inflamatórios, como a IL-6, em comparação aos de inflamação baixa, devido a interferência de citocinas na sinalização intracelular de receptores de insulina, provocando menor sensibilidade a este hormônio (Schönknecht *et al.*, 2022). Especula-se que o acúmulo de IL-6 ao longo do dia pela ingestão de refeições está associado à progressão do diabetes tipo 2 (Schönknecht *et al.*, 2022).

No tecido nervoso, a dieta rica em carboidratos pode induzir o comportamento compulsivo através do aumento das citocinas pró-inflamatórias, as quais regulam a liberação da enzima óxido nítrico sintase, cuja ação é sobre o óxido nítrico, importante sinalizador celular atuante no sistema de recompensa no cérebro (Gomes *et al.*, 2018). Além disso, o aumento nos níveis de citocinas séricas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) também foi revelado em ratos submetidos a essa dieta (Kagal; Hogade, 2019).

Além disso, esses tipos de alimentos estão associados a responsividade ao estresse, o que pode estar relacionada diretamente com maior massa de tecido adiposo, visto que pessoas obesas ou com peso adequado, porém com maior adiposidade, apresentam alteração no nível de cortisol, logo estão mais vulneráveis aos estímulos estressantes (Santos *et al.*, 2018). Ainda, animais expostos a essa dieta apresentaram comportamentos depressivos e ansiosos, após a exposição a agentes estressores, o que pode estar ligado a alterações no metabolismo da dopamina e do sistema dopaminérgico, responsável pela resposta de saciedade e recompensa alimentar (Apriyatin *et al.*, 2019).

A dieta isocalórica, porém rica em sacarose e frutose, é um importante fator estimulante para lipogênese, estresse oxidativo e inflamação hepática (Zhang *et al.*, 2023). Já nos cardiomiócitos, ocorreu a ativação da inflamassoma NLRP3, um complexo proteico intracelular de resposta imune, em camundongos da linhagem albina Balb/c, alimentados com uma dieta rica em carboidratos refinados (Castor, 2019).

A dinâmica de mecanismos moleculares tem papel imprescindível no estudo de distúrbios metabólicos, como a obesidade, e as proteínas estão presentes em basicamente todos os processos moleculares. A proteômica se mostra crucial no diagnóstico precoce de doenças e seu monitoramento (Aslam *et al.*, 2017), e parte do princípio de estudo do conjunto de proteínas expressas em determinada célula, tecido ou órgão, ou seja, seu proteoma, sob condições fisiológicas específicas. As metodologias para análise proteômica permitem também estudo de processos patológicos, identificação de biomarcadores e efeitos de drogas, e o aprimoramento dessas técnicas proporciona informações mais completas acerca de proteínas, suas funções e interações moleculares (Ferrer, 2018).

Dentre as tecnologias proteômicas atuais, existem as consideradas convencionais, como as cromatografias, ELISA (ensaio imunoenzimático) e *Western blotting*; as avançadas, como *microarray*, análise por gel, espectrometria de massas e sequenciamento Edman; as quantitativas, como ICAT (isótopo-codificado marcador de afinidade), SILAC (marcação de isótopos estáveis com aminoácidos em cultura celular) e iTRAQ (marcação isobárica para quantificação absoluta e relativa); as de alta resolução, como cristalografia de raio-X e espectroscopia-NMR (ressonância magnética nuclear); e as de análises de bioinformática (Aslam *et al.*, 2017).

A técnica de eletroforese, contida no grupo das técnicas avançadas com abordagem em gel, está muito ligada à análise proteômica, com diferentes modalidades aplicáveis a diversos objetivos (Lee; Saraygord-Afshari; Low, 2020). A eletroforese é um método de separação de proteínas em graus distintos, por meio do qual há a migração das macromoléculas em um gel composto, principalmente, de poliacrilamida (Nelson; Cox; Hoskins, 2022), por isso também conhecida como SDS-PAGE, do inglês *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*.

O gel utilizado na eletroforese atua como uma malha, dificultando a migração de proteínas em função da relação massa-carga e de sua forma, com o detergente SDS (dodecil-sulfato de sódio) responsável por desnaturar as proteínas e pela adição de carga negativa (Nelson; Cox; Hoskins, 2022). Sendo assim, a eletroforese 1D considera apenas a massa molecular de proteínas na separação, enquanto a eletroforese 2D combina-se a massa e a focalização isoeletrica, permitindo a separação também pelo ponto isoeletrico das proteínas (Nelson; Cox; Hoskins, 2022), podendo ser utilizada para estimar expressão proteica (Lee; Saraygord-Afshari; Low, 2020) pela comparação de bandas (1D) ou *spots* (2D) proteicos, técnica também utilizada na clínica para detecção de proteínas séricas e análise de líquido cefalorraquidiano (Murphy; Srivastava; Deans, 2019).

Por esse motivo a eletroforese foi a técnica escolhida para realização deste trabalho, com intuito de avaliar a expressão de proteínas no cérebro de camundongos submetidos ou não à dieta rica em carboidratos refinados, de modo a fornecer informações de base para investigação dos mecanismos moleculares envolvidos nas alterações provocadas por essa dieta.

## 2 METODOLOGIA

### *Animais e delineamento experimental*

Os ensaios com camundongos machos da linhagem Balb/c com seis semanas de idade foram realizados no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em 2017. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia com temperatura ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) controladas, com livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG sob o número de protocolo 389/2016.

Os camundongos foram agrupados em dois grupos: controle e dieta, os quais foram alimentados pelo período de oito semanas, respectivamente, com dieta padrão para roedores e dieta rica em carboidratos refinados, composta de 45% de ração padrão para roedores moída, 45% de leite condensado Nestlé e 10% de açúcar refinado União, isocalórica em relação à dieta padrão, porém com adicional de 30% de sacarose (Castor, 2019). Os animais foram eutanasiados por decapitação sob anestesia geral com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), e o cérebro foi dissecado e congelado em nitrogênio líquido, sendo armazenado em freezer a  $-30^\circ\text{C}$  até o momento do processamento.

### *Homogeneização dos cérebros*

Os quatro cérebros dos camundongos de cada grupo foram homogeneizados individualmente, em gelo, utilizando mini pistilo, em tampão contendo 25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA, 2 mM DTT e 0,5 mM PMSF, com volume final de 750  $\mu\text{L}$  por cérebro, por 3 vezes, 1 minuto/cada, seguida por centrifugação a 4500 rpm por 10 minutos, não refrigerada.

Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  de sobrenadante foi retirada e o precipitado foi descartado. Uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  de sobrenadante também foi retirada para a dosagem de proteína total. O sobrenadante foi diluído em água e acrescentado tampão da amostra (TA) [10X] (SDS 75%, sacarose 20%, tampão de equilíbrio 31 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 19%, 11 mM EGTA-K e bromofenol blue 0,25%) na proporção de 20  $\mu\text{L}$  TA para 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante, sendo posteriormente aquecida à  $100^\circ\text{C}$  por 2 minutos.

### ***Dosagem de proteína total***

A concentração de proteína total de cada amostra foi determinada utilizando-se como padrão a concentração de albumina, seguindo o método de Bradford (1979). As determinações foram feitas em duplicatas e a absorbância medida a 595 nm. Uma curva padrão de albumina em concentrações crescentes foi feita variando de 0 a 20 µg. A concentração final de proteína total em µg/µl foi determinada a partir de cálculo de regressão linear baseado nos valores obtidos a partir da curva-padrão, utilizando-se o programa Microsoft Excel.

### ***Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE 12,5%)***

A eletroforese foi realizada utilizando o sistema de tampão descontínuo. Os géis com gradiente de acrilamida de 12,5% foram utilizados no gel de separação e 3% no gel de empilhamento. Os géis de separação foram preparados com tampão de separação 1,5M Tris, pH 8,8, SDS 10%, acrilamida/bisacrilamida (30:0,8), H<sub>2</sub>O, TEMED 100% e PSA 10%. O gel de empilhamento foi preparado com tampão de empilhamento 0,5M Tris, pH 6,8, SDS 10%, acrilamida/bisacrilamida 3% (30:1,6), TEMED 100% e PSA 10% (Laemmli; Teaff; D'Ambrosia, 1976).

A eletroforese foi realizada com tampão eletrodo (100 mM Tris, 7,8 mM EDTA, 770 mM glicina, SDS 3% pH 8,3) e corrente constante de 24 mA. Amostras de 10 µg/µL foram aplicadas em cada *gel lane* e, após a corrida, o gel foi corado em solução corante (Coomassie Brilliant Blue R 0,125%, metanol 50% e ácido acético 9%) por 1 hora e descorado em solução descorante (metanol 5% e ácido acético 9%). Os géis foram armazenados em ácido acético 4%. A medida de Rf das bandas de cada *gel lane* foi feita usando padrão de massa molecular relativa (MW).

### ***Aquisição e análise da imagem***

Os géis foram acondicionados em películas de transparência (3 mm). As imagens digitalizadas dos géis foram processadas no formato “BMP” (Bitmap) e a intensidade das bandas foi analisada e comparada por meio do *software* Scion Image, versão Alpha 4.0.3.2, sendo os resultados expressos em IOD (índice de densidade óptica).

### ***Investigação in silico***

A partir de revisão na literatura, usando como referência Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003), Taga (2015) e Medvedev *et al.* (2015), as bandas destacadas tiveram suas proteínas preditas. Utilizou-se como critério de inclusão a variação de  $\pm 1$  kDa, por isso para

algumas bandas são preditas 2 ou mais proteínas. Para identificação da função, realizou-se acesso ao banco de dados UniProtKB (<https://www.uniprot.org>), restringindo a busca para o organismo *Mus musculus* e depósitos revisados, quando possível.

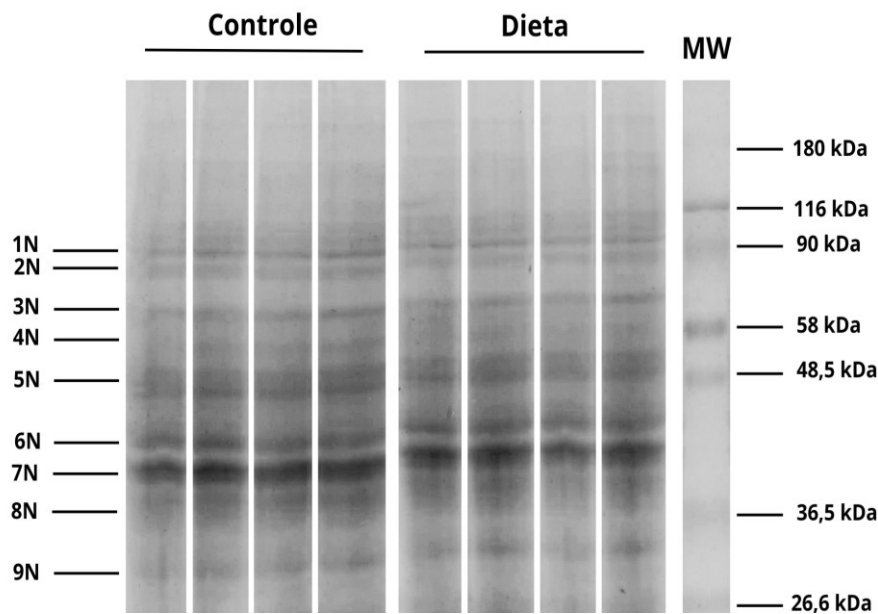
### ***Análise estatística***

A análise estatística foi realizada com o teste *t* Student de amostras relacionadas, utilizando o *software* BioEstat 5.0 e um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Além disso, análise estatística descritiva foi realizada utilizando média e erro padrão.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil eletroforético das amostras revelou a expressão intensa das proteínas com massa molecular estimada em 91,6; 86,3; 74,3; 65,9; 56,8; 46,1; 40,9; 36,3; e 27,8 kDa nos animais submetidos ou não à dieta rica em carboidratos refinados e identificadas de 1N a 9N (Figura 1).

**Figura 1.** Perfil eletroforético das amostras de cérebro de camundongos controle e alimentados com dieta rica em carboidratos refinados



Bandas estão indicadas por setas e números à direita. (MW) padrão de peso molecular SDS-7B2.

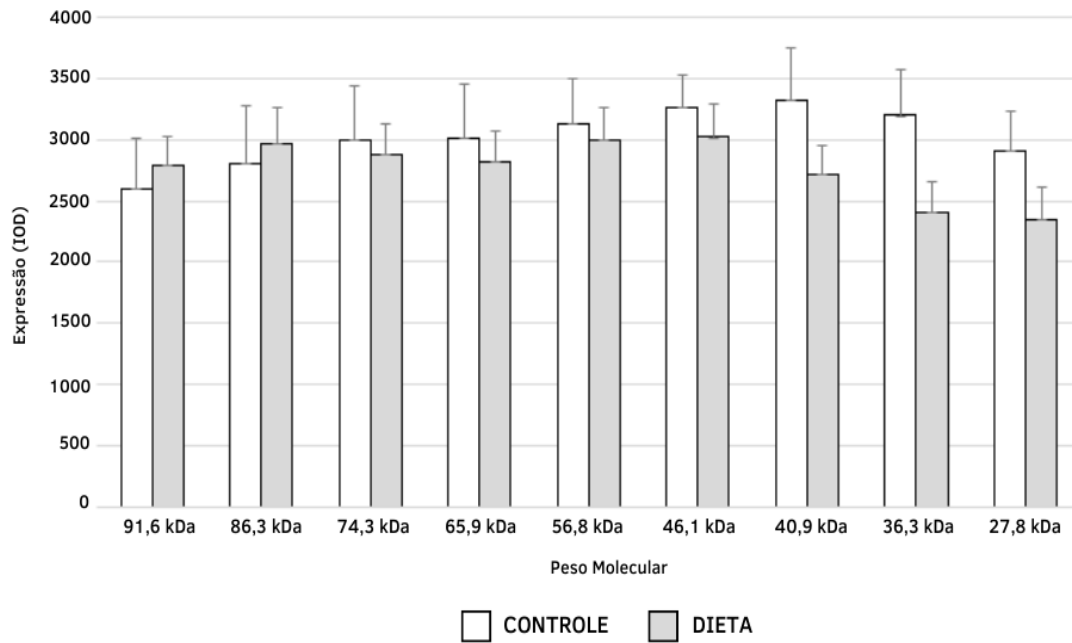
Fonte: Autoria própria.

A análise estatística da média da densitometria óptica (Figura 2) não revelou diferença significativa entre os dois grupos. Esperava-se encontrar diferença na expressão de proteínas cerebrais, uma vez que a dieta hipercalórica induz a superprodução de citocinas pró-inflamatórias, incluindo adipocinas elevadas no cérebro, gerando resposta neuroinflamatória (Gomes *et al.*, 2020). Além disso, o consumo excessivo de açúcares leva a doenças e distúrbios no cérebro, como ansiedade, depressão, neurogênese, medo e mudanças na expressão molecular e neuroquímica (Jacques *et al.*, 2019).

A ausência de diferença entre os grupos controle e dieta sugere a necessidade de novos estudos, utilizando metodologias mais precisas na proteômica, como a eletroforese bidimensional, para identificação das proteínas diferencialmente expressas. Nesta eletroforese considera-se, além do tamanho da proteína, o seu ponto isoelétrico. Isso é, as moléculas migram em gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado ou gerado por tampões anfotéricos

até atingirem um ponto de pH no qual sua carga é igual a zero, também chamado de ponto isoeletrico. Assim, é possível identificar mais de uma proteína em uma mesma banda, mas agora como *spots*, melhorando a precisão na predição (Barbosa *et al.*, 2012).

**Figura 2.** Índice de densitometria óptica média de cada banda com seu erro padrão (eixo y) e sua massa molecular estimada (eixo x) identificadas em amostras de cérebro de camundongos controle e alimentados com dieta rica em carboidratos refinados



Fonte: Autoria própria.

Outra hipótese que justifica a ausência de expressão diferencial entre os grupos é o tempo de exposição à dieta rica em carboidratos refinados, apesar dos mesmos animais terem dano morfofuncional no coração, não observou-se alteração na pressão arterial, na glicemia de jejum e no aumento da gordura visceral (Castor, 2019), apesar do reconhecido o papel do açúcar na gênese da hipertensão arterial (Hwang *et al.*, 1987), e da associação da obesidade e o desenvolvimento de cardiomiopatia. Isso é, os animais não ficaram intolerantes à glicose, não apresentaram alterações clássicas observadas nos modelos experimentais de diabetes e também sem relação com o prejuízo cardíaco. Além disso, a associação entre a dieta com a disfunção cardíaca não parece envolver a maior adiposidade ou obesidade (Castor, 2019).

Ademais, é possível que a expressão diferencial de proteínas não seja evidenciada, mas alterações morfológicas possam ser reveladas no cérebro de animais tratados com uma dieta rica em carboidratos. Isso porque a sacarose é um potente modulador da morfologia dos neurônios após uso intenso e prolongado, pois seu consumo aumenta a força sináptica excitatória nos neurônios dopaminérgicos do núcleo *accumbens* com redução significativa no

comprimento dendrítico e aumento da densidade da coluna dendrítica distal (Stuber *et al.*, 2011). O consumo excessivo de açúcar também facilita a liberação de dopamina no núcleo *accumbens* de modo similar ao abuso de drogas (Rada; Avena; Hoebel, 2005). Esse dado prospecta ensaios de comportamento com animais submetidos a mesma dieta ensaiada aqui.

A partir de revisão na literatura, as bandas destacadas tiveram suas proteínas preditas conforme apresentado na Tabela 1. Pela predição, há indicativo de que o cérebro de camundongos alimentados ou não com a dieta rica em carboidratos refinados apresenta proteínas que expressam funções diversas, incluindo o metabolismo energético para todas as macromoléculas, como carboidratos, destacando a piruvato quinase (P52480), enolase (P17182), frutose bifosfato aldolase (Q91Y97), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (P16858), UTP-glicose-1-fosfato-uridil transferase (Q91ZJ5) e lactato desidrogenase (P06151); os lipídeos, através da hidroximetilglutaril-CoA sintetase (P54869), acil-CoA hidrolase (Q91V12) e 2,4-dienoil-CoA redutase (Q9CQ62); e aminoácidos, com a metil-malonato desidrogenase (Q9EQ20), aspartato aminotransferase (P05201), arginino succinato sintase (P16460), ornitina transcarbamilase (P11725). Ainda, temos proteínas associadas com as reações mitocondriais que envolvem o ciclo do ácido cítrico e a síntese de ATP pela cadeia transportadora de elétrons, como a succinato desidrogenase (Q8K2B3), ATP sintase (P56480), NADH desidrogenase (Q99LC3), malato desidrogenase (P14152) e flavoproteína de transferência de elétrons (Q9DCW4). É possível que muitas outras proteínas pudessem estar presentes e diferencialmente expressas nos cérebros dos dois grupos analisados, porém optou-se por analisar somente o sobrenadante a partir de uma única centrifugação. Talvez proteínas de membranas subcelulares e de organelas, além do núcleo, podem ter sido perdidas no descarte do precipitado.

Nos neurônios e astrócitos, a glicose é a fonte de substrato para o ciclo do ácido cítrico e obtenção de energia química (Witek; Wydra; Filip, 2022), justificando que a maioria das proteínas preditas está relacionada com a função energética cerebral.

Dentre as proteínas com função de regulação e estrutural, podemos citar a endoplasmina (P08113), proteína de densidade pré-sináptica 95 (E9Q9R9), proteína de choque térmico 75 (Q9CQN1), queratina tipo II citoesquelética (P04104; Q3TTY5), aldeído desidrogenase (P47739), complexo sinalossoma (O88544), fator de iniciação eucariótica 4A-II (P10630), sinaptotagmina-1 (P46096), actina citoplasmática 1 (P60710), arfatina-1 (G5E8V9), anexina IV (P97429), proteína de ligação NSF (P28663), alfa espectrina (P16546), subunidades da proteína 14-3-3 (P61982; Q9CQV8; P63101; P68510; P68254) e peróxido redutase (P20108),

com diferentes papéis desempenhados nas células que compõem o cérebro, como pode ser visto detalhadamente na tabela 1.

É importante destacar que a maioria das vias metabólicas em um indivíduo é regulada pela insulina e é dependente do nível plasmático de glicose, incluindo vias de síntese e degradação de carboidratos e lipídeos (Nelson; Cox; Hoskins, 2022). A insulina modula a atividade dos neurônios do núcleo arqueado, uma vez que sua liberação estimula os neurônios glutamatérgicos do hipotálamo e a secreção de outros hormônios, provocando a redução da ingestão de alimentos (Marcos *et al.*, 2023).

Além disso, Beecher *et al.* (2021) revelaram que o consumo irrestrito de sacarose provavelmente afeta a neurogênese, reduzindo a proliferação celular, geração de células-tronco e a sobrevivência/maturação de novos neurônios, sugerindo que a longo prazo o consumo excessivo de açúcar pode contribuir para um risco aumentado de desenvolvimento da hiperatividade e problemas de déficit neurocognitivos na vida adulta.

Hormônios periféricos, como a insulina, também regulam o controle hedônico do sistema de recompensa, uma vez que promove a fosforilação e ativação de receptores de dopamina na área tegmentar ventral, aumentando a recaptação de dopamina (Marcos *et al.*, 2023), o que diminui o “impulso” de se alimentar em estado de saciedade (Mebel *et al.*, 2012).

**Tabela 1.** Predição das proteínas destaque no perfil eletroforético de cérebro de camundongos controle e alimentados com dieta rica em carboidratos refinados

| UniProt ID | Nome da proteína                                        | Função                                                                                                                | MW (em kDa) |                  | Referência                                                                |
|------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------|
|            |                                                         |                                                                                                                       | Estimada    | Referência       |                                                                           |
| P08113     | Endoplasmina                                            | Chaperona atuante no processamento e transporte de proteínas secretadas.                                              | 91,6        | 92,713           | Medvedev <i>et al.</i> (2014)                                             |
| E9Q9R9     | Proteína de densidade pré-sináptica 95                  | Agrupamento pós-sináptico de proteínas.                                                                               | 86,3        | 85,605           | Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)                                  |
| Q8K2B3     | Succinato desidrogenase (ubiquinona)                    | Transferência de elétrons do succinato para ubiquinona no do complexo II mitocondrial.                                | 74,3        | 73,671           | Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)                                  |
| Q9CQN1     | Proteína de choque térmico 75                           | Manutenção da função e polarização mitocondrial.                                                                      |             | 74,199           | Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)                                  |
| P04104     | Queratina tipo II citoesquelética 1 (citoqueratina 1)   | Regulação de proteínas quinases.                                                                                      | 65,9        | 66,018           | Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)                                  |
| Q3TTY5     | Queratina tipo II citoesquelética 2 epidérmica          | Ativação, proliferação e queratinização de queratinócitos.                                                            |             | 66,11            | Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)                                  |
| P47739     | Aldeído desidrogenase 6                                 | Oxidação dependente de NAD <sup>+</sup> de substratos de aldeído.                                                     | 56,8        | 56,772<br>56,453 | Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)<br>Medvedev <i>et al.</i> (2014) |
| Q91ZJ5     | UTP-glicose-1-fosfato uridililtransferase               | Conversão de glicose-1-fosfato em UDP-glicose.                                                                        |             | 56,953           | Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)                                  |
| P62814     | Subunidade B de próton ATPase tipo V, isoforma cerebral | Subunidade não catalítica da V-ATPase, responsável por manter o pH intracelular e acidificar o ambiente extracelular. | 56,8        | 56,823           | Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)                                  |
| P52480     | Piruvato quinase                                        | Transferência de grupo fosforil do fosfoenolpiruvato para o ADP.                                                      |             | 57,781           | Medvedev <i>et al.</i> (2014)                                             |
| P56480     | Subunidade beta da ATP sintase mitocondrial             | Forma o núcleo catalítico F <sub>1</sub> da ATP sintase.                                                              | 56,9        | 56,318           | Medvedev <i>et al.</i> (2014)                                             |
| Q9EQ20     | Metil-malonato-semialdeído desidrogenase                | Liga-se ao acil-CoA graxo e atua no metabolismo da valina e da pirimidina.                                            |             | 57,771           | Medvedev <i>et al.</i> (2014)                                             |
| P54869     | Hidroximetilglutaril-CoA sintase                        | Catalisa a primeira etapa irreversível da cetogênese.                                                                 | 46,1        | 56,9             | Medvedev <i>et al.</i> (2014)                                             |
| P05201     | Aspartato aminotransferase                              | Regula os níveis de glutamato a partir de L-aspartato ou L-cisteína.                                                  |             | 46,334<br>46,400 | Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)                                  |

|        |                                                                                |                                                                                                                                      |      |               |                                                         |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|---------------|---------------------------------------------------------|
|        |                                                                                |                                                                                                                                      |      |               | Medvedev <i>et al.</i> (2014)                           |
| O88544 | Subunidade 4 do complexo sinalossoma COP9                                      | Forma o complexo sinalossoma, envolvido em diversos processos celulares e de desenvolvimento.                                        |      | 46,453        | Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)                |
| P10630 | Fator de iniciação eucariótica 4A-II                                           | Helicase de RNA dependente de ATP.                                                                                                   | 46,1 | 46,4          | Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)                |
| P17182 | $\alpha$ -Enolase                                                              | Converge 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato, ativa o plasminogênio em superfície celular e estimula a síntese de imunoglobulinas. |      | 47,098        | Medvedev <i>et al.</i> (2014)                           |
| P16460 | Arginino succinato sintase                                                     | Envolvida no ciclo da ureia e na catálise de aspartato para arginino succinato.                                                      |      | 46,467        | Medvedev <i>et al.</i> (2014)                           |
| P46096 | Sinaptotagmina-1                                                               | Sensor de cálcio na liberação de neurotransmissores na sinapse e regula o tráfego de vesículas sinápticas.                           |      | 47,369        | Medvedev <i>et al.</i> (2014)                           |
| Q91V12 | Acil coenzima-A tioéster hidrolase citosólica                                  | Hidrolisa acil-CoA em ácidos graxos livres e coenzima A.                                                                             |      | 41,149        | Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)                |
| Q99LC3 | NADH desidrogenase (ubiquinona) 1 subcomplexo alfa subunidade 10, mitocondrial | Subunidade do complexo I mitocondrial.                                                                                               |      | 40,5          | Taga (2015)                                             |
| P60710 | Actina citoplasmática 1                                                        | Produce filamentos na formação de redes reticuladas no citoplasma e desempenha função de motilidade e contração celular.             | 40,9 | 41,710        | Medvedev <i>et al.</i> (2014)                           |
| Q91Y97 | Frutose bifosfato aldolase B                                                   | Catalisa reações na glicólise, gliconeogênese e frutólise.                                                                           |      | 39,593        | Medvedev <i>et al.</i> (2014)                           |
| P11725 | Ornitina transcarbamilase                                                      | Catalisa a segunda etapa do ciclo da ureia.                                                                                          |      | 39,861        | Medvedev <i>et al.</i> (2014)                           |
| G5E8V9 | Arfatina-1                                                                     | Participa do controle da biogênese dos grânulos secretores do complexo golgiense.                                                    |      | 40,754        | Medvedev <i>et al.</i> (2014)                           |
| P45376 | Aldose redutase                                                                | Catalisa a redução de carbonila em álcoois e de diversos aldeídos fosfolipídicos.                                                    |      | 36,098        | Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)                |
| P16858 | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase                                          | Atua na desidrogenação e nitrosilação na glicólise e em funções nucleares.                                                           | 36,3 | 36,07<br>35,9 | Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)<br>Taga (2015) |

|        |                                                                                     |                                                                                  |      |                  |                                                                           |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|------|------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| P14152 | Malato desidrogenase, citoplasmática                                                | Atua na redução de alfa-cetoácidos aromáticos na presença de NADH.               |      | 36,5             | Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)<br>Taga (2015)                   |
| P63330 | Isoforma $\alpha$ da subunidade catalítica da serina/treonina-proteína fosfatase 2A | Principal fosfatase para proteínas associadas aos microtúbulos.                  |      | 36,141           | Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)                                  |
| P97429 | Anexina IV                                                                          | Atua na fusão de membrana e está envolvida na exocitose.                         |      | 35,957           | Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)                                  |
| P06151 | Lactato desidrogenase cadeia A                                                      | Interconversão piruvato em lactato.                                              | 36,3 | 36,4             | Taga (2015)                                                               |
| P00329 | Álcool desidrogenase 1                                                              | Conversão de álcoois primários não ramificados em seus aldeídos correspondentes. |      | 36,8             | Taga (2015)                                                               |
| Q9CQ62 | 2,4-dienoil-CoA redutase                                                            | Auxilia na beta-oxidação.                                                        |      | 36,110           | Medvedev <i>et al.</i> (2014)                                             |
| Q9DCW4 | Subunidade beta da flavoproteína de transferência de elétrons                       | Aceita elétrons de várias desidrogenases mitocondriais.                          |      | 28,054<br>27,670 | Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)<br>Medvedev <i>et al.</i> (2014) |
| P28663 | Proteína de ligação NSF beta-solúvel                                                | Atua no transporte vesicular entre retículo endoplasmático e complexo golgiense. |      | 28,122           | Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)                                  |
| P16546 | Cadeia alfa da espectrina, não eritrocítica 1                                       | Movimento dependente de cálcio na membrana e no citoesqueleto.                   |      | 28,5             | Taga (2015)                                                               |
| P61982 | 14-3-3 proteína gama                                                                |                                                                                  |      | 28,324           | Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)                                  |
| Q9CQV8 | 14-3-3 proteína beta/alfa                                                           |                                                                                  | 27,8 | 28,047<br>28     | Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)<br>Taga (2015)                   |
| P63101 | 14-3-3 proteína zeta/delta                                                          | Regula vias de sinalização gerais e especializadas.                              |      | 27,898           | Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)                                  |
| P68510 | 14-3-3 proteína eta                                                                 |                                                                                  |      | 28,2             | Taga (2015)                                                               |
| P68254 | 14-3-3 proteína theta                                                               |                                                                                  |      | 27,8             | Taga (2015)                                                               |
| P20108 | Peróxido redutase dependente de tioredoxina                                         | Catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e dos hidroperóxidos orgânicos.     |      | 28,277           | Medvedev <i>et al.</i> (2014)                                             |

Fonte: Autoria própria.

## 4 CONCLUSÃO

Os resultados eletroforéticos revelaram a massa molecular das proteínas expressas no cérebro dos camundongos submetidos ou não à dieta rica em carboidratos refinados, porém não indicaram diferenças estatísticas entre os grupos ao analisar o índice de densidade óptica, o que não era esperado considerando as alterações moleculares no cérebro provocadas pela dieta rica em açúcares, como a produção elevada de adipocinas e sua relação com transtornos, como ansiedade e depressão já descritas na literatura. Apesar disso, o pouco tempo de exposição dos animais à dieta pode justificar a ausência de alterações proteicas, visto que esses animais não apresentaram aumento de adiposidade visceral e glicemia de jejum, embora haja relação dessas condições com a dieta testada.

Ademais, a utilização de metodologias mais precisas, como a eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massas, se faz necessária para identificação da diferença de expressão de proteínas no cérebro a partir da dieta rica em carboidratos refinados, de modo a fornecer mais clareza sobre os mecanismos moleculares que podem ser alterados na condição estudada.

Embora não tenha sido encontrada diferença significativa entre os grupos, foi possível prever as proteínas do perfil eletroforético e sugere-se que, em sua maioria, sejam proteínas relacionadas com o metabolismo energético do cérebro para carboidratos, lipídeos e aminoácidos, bem como relacionadas às reações do ciclo do ácido cítrico e da síntese de ATP na mitocôndria, sendo a glicose a principal fonte de substrato para obtenção de energia química em neurônios e astrócitos.

É relevante ampliar as pesquisas acerca da dieta rica em açúcares, especialmente sobre seu consumo a longo prazo, para investigação dos efeitos da resistência à glicose e alterações do nível de insulina provocados pela dieta nos mecanismos moleculares do tecido nervoso, a fim de identificar as vias moduladas e macromoléculas de interesse nos distúrbios metabólicos descritos.

## REFERÊNCIAS

APRYATIN, S. A. *et al.* Comparative analysis of the influence of a high-fat/high-carbohydrate diet on the level of anxiety and neuromotor and cognitive functions in Wistar and DAT-KO rats. **Physiological Reports**, v. 7, n. 4, p. 1-14, 2019. DOI: <https://doi.org/10.14814/phy2.13987>.

ASLAM, B. *et al.* Proteomics: technologies and their applications. **Journal of Chromatographic Science**, v. 55, n. 2, p. 182-196, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>.

BARBOSA, E. B. *et al.* Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366-375, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-42302012000300019>.

BEECHER, K. *et al.* Long-term overconsumption of sugar starting at adolescence produces persistent hyperactivity and neurocognitive deficits in adulthood. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, p. 1-15, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.670430>.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

BRASIL. **Vigitel Brasil 2021: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. 128 p. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/vigitel/vigitel-brasil-2021-estimativas-sobre-frequencia-e-distribuicao-sociodemografica-de-fatores-de-risco-e-protecao-para-doencas-cronicas>. Acesso em: 17 out. 2023.

BRASIL. **Guia alimentar para a população brasileira**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 156 p. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_alimentar\\_populacao\\_brasileira\\_2ed.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_alimentar_populacao_brasileira_2ed.pdf). Acesso em: 17 out. 2023.

BRASIL. **Pesquisa de orçamentos familiares 2017-2018: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, 2020. 120p. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101742.pdf>. Acesso em: 20 out. 2023.

CASTOR, R. G. M. **Efeitos da glibenclamida sobre a ativação cardíaca de inflamassoma NRLP3 induzida por dieta rica em carboidratos refinados**. 2019. 64f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Farmacologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

COSTA, C. S. *et al.* Consumption of ultra-processed foods and its association with sociodemographic factors in the adult population of the 27 Brazilian state capitals (2019). **Revista de Saúde Pública**, v. 55, n. 47, p. 1-9, 2021. DOI: <https://doi.org/10.11606/s1518-8787.2021055002833>.

CRUZ, G. L. *et al.* Alimentos ultraprocessados e o consumo de fibras alimentares no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 26, n. 9, p. 4153-4161, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/1413-81232021269.15462020>.

DONG, D. W. *et al.* Global improvement in dietary quality could lead to substantial reduction in premature death. **Journal of Nutrition**, v. 149, n. 6, p. 1065-1074, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/nxz010>.

FERRER, I. **Proteomics and lipidomics in the human brain**. In: AMINOFF, M. J., BOLLER, F., SWAAB, D. F. (org). Handbook of clinical neurology. [S.l]: Elsevier, 2018, p. 285-302.

GOMES, J. A. S. *et al.* A high-refined carbohydrate diet facilitates compulsive-like behavior in mice through the nitric oxide pathway. **Nitric Oxide**, v. 80, p. 61-69, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.08.008>.

GOMES, J. A. S. *et al.* High-refined carbohydrate diet consumption induces neuroinflammation and anxiety-like behavior in mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 77, p. 1-7, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108317>.

HALL, K. D. *et al.* Ultra-processed diets cause excess calorie intake and weight gain: an inpatient randomized controlled trial of *ad libitum* food intake. **Cell Metabolism**, v. 30, n. 1, p. 67-77, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.05.008>.

HWANG, I. S. *et al.* Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. **Hypertension**, v. 10, n. 5, p. 512-516, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.HYP.10.5.512>.

JACQUES, A. *et al.* The impact of sugar consumption on stress driven, emotional and addictive behaviors. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 103, p. 178-199, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.05.021>.

KAGAL, U. A.; HOGADE, A. P. Effect of high carbohydrate diet on complete Freund's adjuvant induced inflammation in rats. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 12, n. 3, p. 1457-1462, 2019. DOI: <https://dx.doi.org/10.13005/bpj/1775>.

KELLY, B.; JACOBY, E. Public Health Nutrition special issue on ultra-processed foods, **Public Health Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 1-4, 2018. DOI: [10.1017/S1368980017002853](https://doi.org/10.1017/S1368980017002853).

LAEMMLI, U. K.; TEAFF, N.; D'AMBROSIA, J. Maturation of the head of bacteriophage T4. III. DNA packaging into preformed heads. **Journal of Molecular Biology**, v. 88, n. 4, p. 749-765, 1974. DOI: [10.1016/0022-2836\(74\)90397-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90397-0).

LEE, P. Y.; SARAYGORD-AFSHARI, N.; LOW, T. Y. The evolution of two-dimensional gel electrophoresis - from proteomics to emerging alternative applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1615, p. 1-9, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460763>.

LOUZADA, M. L. C. *et al.* Consumption of ultra-processed foods in Brazil: distribution and temporal evolution 2008–2018. **Revista de Saúde Pública**, v. 57, n. 12, p. 1-13, 2023. DOI: <https://doi.org/10.11606/s1518-8787.2023057004744>.

LOUZADA, M. L. C. *et al.* Ultra-processed foods and the nutritional dietary profile in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, n. 38, p. 1-11, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2015049006132>.

LUBEC, G.; KRAPPENBAUER, K.; FOUNTOULAKIS, M. Proteomics in brain research: potentials and limitations. **Progress in Neurobiology**, v. 69, n. 3, p. 193-211, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(03\)00036-4](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(03)00036-4).

MARCOS, J. L. *et al.* Obesogenic diet-induced neuroinflammation: a pathological link between hedonic and homeostatic control of food intake. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 1-13, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24021468>.

MEBEL, D. M. *et al.* Insulin in the ventral tegmental area reduces hedonic feeding and suppresses dopamine concentration via increased reuptake. **European Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 3, p. 2336-2346, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08168.x>.

MEDVEDEV, A. E. *et al.* The effects of endogenous non-peptide molecule isatin and hydrogen peroxide on proteomic profiling of rat brain amyloid- $\beta$  binding proteins: relevance to Alzheimer's Disease? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, p. 476-495, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms16010476>.

MURPHY, M; SRIVASTAVA, R.; DEANS, K. **Bioquímica clínica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019. 179p.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; HOSKINS, A. A. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2022. 1156p.

NOBLE, E. E. *et al.* Early-life sugar consumption has long-term negative effects on memory function in male rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 22, n. 4, p. 273-283, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1378851>.

OLIVEIRA, M. C. *et al.* Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Obesity**, v. 21, n. 9, p. E396-E406, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/oby.20230>.

RADA, P.; AVENA, N. M.; HOEBEL, B. G. Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell. **Neuroscience**, v. 134, n. 3, p. 737-744, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.04.043>.

REICHELT, A. C. Adolescent maturational transitions in the prefrontal cortex and dopamine signaling as a risk factor for the development of obesity and high fat/high sugar diet induced cognitive deficits. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 10, n. 189, p. 1-17, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00189>.

ROSSATO, S. L. *et al.* Intakes of Unprocessed and Minimally Processed and Ultraprocessed Food Are Associated with Diet Quality in Female and Male Health Professionals in the United States: A Prospective Analysis. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 123, n. 8, p. 1140-1151, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jand.2023.03.011>.

SANTOS, C. J. *et al.* Carbohydrate-enriched diet predispose to anxiety and depression-like behavior after stress in mice. **Nutritional Neuroscience**, v. 21, n. 1, p. 33-39, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/1028415X.2016.1213529>.

SCHÖNKNECHT, Y. B. *et al.* Influence of a proinflammatory state on postprandial outcomes in elderly subjects with a risk phenotype for cardiometabolic diseases. **European Journal of Nutrition**, v. 61, p. 3077-3083, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00394-022-02870-7>.

STUBER, G. D. *et al.* Excitatory transmission from the amygdala to nucleus accumbens facilitates reward seeking. **Nature**, v. 475, p. 377-380, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature10194>.

SWINBURN, B. A. *et al.* The global syndemic of obesity, undernutrition, and climate change: *The Lancet* Commission report. **The Lancet**, v. 393, n. 10173, p. 717-846, 2019. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32822-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32822-8).

TAGA, M. L. L. **Análise proteômica em cérebro de ratos submetidos a tratamento subcrônico com chumbo: influência da suplementação com ferro.** 2015. 119f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, Universidade de São Paulo, Bauru, 2015. DOI: <https://doi.org/10.11606/T.25.2016.tde-26042016-105747>.

VASILJEVIĆ, A. *et al.* Hepatic inflammation induced by high-fructose diet is associated with altered 11 $\beta$ HSD1 expression in the liver of Wistar rats. **European Journal of Nutrition**, v. 53, n. 6, p. 1393-1402, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00394-013-0641-4>.

WITEK, K.; WYDRA, K.; FILIP, M. A high-sugar diet consumption, metabolism and health impacts with a focus on the development of substance use disorder: a narrative review. **Nutrients**, v. 14, n. 14, p. 1-23, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu14142940>.

ZHANG, Q. *et al.* A high-trans fat, high-carbohydrate, high-cholesterol, high-cholesterol diet-induced nonalcoholic steatohepatitis mouse model and its hepatic immune response. **Nutrition & Metabolism**, v. 20, n. 28, p. 1-12, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12986-023-00749-w>.