

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Doutorado

**IMPACTO DO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO
HIPOCAMPAL SOBRE O SURGIMENTO DE DECLÍNIOS
COGNITIVO E MOTOR EM RATOS COM SÍNDROME
METABÓLICA INDUZIDA POR DIETA RICA EM SACAROSE**

BRUNO ARAÚJO SERRA PINTO

São Luís – MA
2017

BRUNO ARAÚJO SERRA PINTO

**IMPACTO DO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO
HIPOCAMPAL SOBRE O SURGIMENTO DE DECLÍNIOS
COGNITIVO E MOTOR EM RATOS COM SÍNDROME
METABÓLICA INDUZIDA POR DIETA RICA EM SACAROSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes

São Luís – MA

2017

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

ARAÚJO SERRA PINTO, BRUNO.

IMPACTO DO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO
HIPOCAMPAL SOBRE O SURGIMENTO DE DECLÍNIOS COGNITIVO E
MOTOR EM RATOS COM SÍNDROME METABÓLICA INDUZIDA POR DIETA
RICA EM SACAROSE / BRUNO ARAÚJO SERRA PINTO. - 2017.
135 f.

Orientador(a): ANTONIO MARCUS DE ANDRADE PAES.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
UFMA, 2017.

1. Dieta rica em sacarose. 2. Estresse do retículo
endoplasmático. 3. Prejuízos cognitivos e motores. 4.
Síndrome metabólica. I. MARCUS DE ANDRADE PAES, ANTONIO.
II. Título.

BRUNO ARAÚJO SERRA PINTO

**IMPACTO DO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO
HIPOCAMPAL SOBRE O SURGIMENTO DE DECLÍNIOS
COGNITIVO E MOTOR EM RATOS COM SÍNDROME
METABÓLICA INDUZIDA POR DIETA RICA EM SACAROSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Maria Lúcia Bonfleur
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Profa. Dra. Adriana Leandro Camara
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Silma Regina Ferreira Pereira
Universidade Federal do Maranhão

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Com certeza a parte mais difícil de escrever desta tese, talvez porque a vida não se analisa com estatística paramétrica e não é pelo “*p* valor” que descobrimos a significância das pessoas na nossa trajetória. Mas espero conseguir com poucas palavras agradecer todos que acreditaram e me acompanharam nesta longa e árdua jornada e retribuir todo o carinho ofertado. Reforço que este trabalho não é resultado apenas de esforço individual. Ele nasce de expressivas contribuições que recolhi durante toda minha trajetória profissional, acadêmica e pessoal;

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes**, por todas as orientações e ensinamentos, merecidos “puxões de orelha”, dedicação, trabalho, esforço e amizade. Foi sem dúvida uma grande inspiração para que eu trilhasse os caminhos da docência e pesquisa, e se um dia eu conseguir ser $\frac{1}{3}$ do grande professor/orientador/pesquisador que você é, já estarei realizado como pessoa e profissional. Obrigado pelos votos de confiança e por não ter infartado ou me trucidado ao longo desses quatro anos;

À minha família, **Elizabeth, George, Gustavo, Camila e Maria Eduarda**, pela base sólida e todo carinho fraternal que sempre me deram forças para superar todas as adversidades e percorrer com sucesso mais esta importante etapa. Devo a vocês todas as vitórias e conquistas de minha vida. Estendo a gratidão também para meus **avós, tio(a)s, primo(a)s e demais familiares**;

À minha amada, **Karla Frida Torres Flister**, pelo apoio constante, companheirismo, amizade, dedicação, por todo seu amor e por ter sido a maior responsável pela superação de todas as dificuldades passadas, presentes e futuras – “Você é minha inspiração, sem você nada disso teria se concretizado. Te amo muito, muito, muito. Essa vitória é nossa”;

À minha aluna de iniciação científica, **Thamys Marinho Melo**, por ter sido meu braço direito durante toda execução deste trabalho. Na verdade braço, mãos, pernas e cabeça. Não sei como conseguiria terminar este trabalho sem você e nem como consegui terminá-lo com você. Contrariando as leis da física, dois polos muito semelhantes se atraíram e daí nasceu uma grande parceria. Agradeço profundamente por todo auxílio e desejo profundamente muito sucesso em seu futuro;

Ao **Laboratório de Fisiologia Experimental (LeFisio)**, do qual me orgulho de fazer parte e ter realizado o presente tese. Obrigado pelos bons momentos, científicos ou não, que tivemos ao longo desta caminhada. Agradecimentos especiais a **Samira Abdalla**, companheira de turma e docência e que por pouco não me fez ser indiciado na Lei Maria da Penha ao longo desses 4 anos; e aos colegas/irmãos **Lucas França, Nathalee Liberal, Rosângela Sousa, Jonas Sanches, Caio Fernando, Caroline Vale, Pâmela Santos, Danylo Noletto e Thamyres Cristhina**, que contribuíram experimentalmente em algum momento na execução deste trabalho. **Aos demais amigos pesquisadores**, sintam-se abraçados. Considero todos minha segunda família;

Ao **Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo e Laboratório de Biologia Vascular do INCOR-SP**, por terem me recebido de braços abertos e fornecido toda infraestrutura para a realização e sucesso deste trabalho. Agradecimentos especiais a **Daniela Kajihara, Leonardo Tanaka e Vitor Debbas**, por todos humildes ensinamentos e auxílio técnico;

Ao **Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LabGEM/UFMA)**, em especial a **Profa. Dra. Silma Regina Ferreira Pereira e Vanessa Ribeiro**. Espero que a parceria científica firmada possa se estender para muitos outros trabalhos;

À meus eternos amigos do **Farmáquina***, DAFAR, FA082, curso de Farmácia e Dom Bosco**, sempre presentes e responsáveis pela maioria dos momentos de descontração essenciais para a vida;

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Maranhão – FAPEMA**, pelos recursos concedidos por meio dos editais PAEDT-00380/14, PAEDT-02085/15, ESTAGIO-05258/15, UNIVERSAL-00523/14 e UNIVERSAL-00792/14 PPGCS e ao **Programa de Pós-Graduação em ciências da Saúde**, pela concessão de diárias;

E finalmente, a todos que por falta de espaço não pude citar e que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

RESUMO

Introdução: O crescimento epidemiológico da síndrome metabólica (SM) está diretamente relacionado ao exponencial aumento do consumo de açúcares de adição. Estudos descrevem que as desordens metabólicas que compõem a SM, principalmente a resistência insulínica e obesidade, estão relacionadas ao desenvolvimento de estresse oxidativo, declínios cognitivos, demências e aceleração da senescência neuronal. Mesmo com diversas evidências correlacionando a SM a danos neuronais, os mecanismos moleculares envolvidos ainda não são totalmente conhecidos. Neste contexto, o estresse do retículo endoplasmático (ERE) pode ser apontado como uma condição intermediária que interconecta estas morbidades. **Objetivo:** Investigar os efeitos deletérios do ERE hipocampal sobre a instalação de declínios cognitivos, comportamentais e motores em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta rica em sacarose em diferentes faixas etárias. **Métodos:** Ratos Wistar com 21 dias de vida (desmame) foram divididos em 4 grupos: dois grupos controle (CTR, n = 7-9), alimentados com uma dieta padrão e acompanhados até os 3 e 6 meses de idade, respectivamente; e dois grupos obeso (HSD, n = 7), alimentados com dieta rica em sacarose (sacarose a 25%) acompanhados pelos mesmos períodos. Foi avaliado nos grupos: desenvolvimento de SM; perfil redox; funções cognitivas, comportamentais e motoras; e expressão gênica/proteica hipocampal de sensores da UPR (Ire1 α , Perk e Atf6), chaperonas (Grp78, Grp94, Pdi, Calnexina e Calreticulina), plasticidade neuronal (Bdnf), defesa antioxidante (Nrf2), apoptose (Bcl2, Chop e Parp-1) e senescência (p53 e p21). Como um controle de envelhecimento, ratos com 20 meses de idade (OLD, n = 7) alimentados com dieta padrão foram incluídos aos experimentos de expressões gênica/proteica e avaliações neurológicas. **Resultados:** A dieta rica em sacarose teve sucesso em estabelecer o fenótipo de SM. Com 3 meses, o grupo HSD desenvolveu obesidade central mesmo com menor ingestão energética, disglucemia em estados de jejum e alimentado, hipertrigliceridemia, acúmulo de gordura ectópica hepática, diminuição da taxa de lipólise, intolerância à glicose e resistência hepática à insulina. Em dados não publicados, observamos discreta peroxidação lipídica sem expressiva atividade de enzimas antioxidantes e sem resistência insulínica periférica. Nos animais com 6 meses, observamos um aprofundamento das disfunções metabólicas dos animais de 3 meses. Adicionalmente, observamos ganho de peso, ácidos graxos livres, hiperinsulinemia, resistência insulínica periférica, maior peroxidação lipídica, maior atividade das enzimas SOD, CAT e redução da GPx. No que se refere à avaliação neurofuncional, aos 3 meses de idade, o grupo HSD apresentou déficit motor e comportamento ansiogênico, no entanto sem disfunções cognitivas. Contudo, nos animais de 6 meses observamos comportamento ansiogênico e importantes prejuízos motores e cognitivos (aprendizado e memória), semelhantes ao grupo OLD. A análise molecular hipocampal evidenciou uma sinalização diferente entre os grupos HSD de 3 e 6 meses. No HSD com 3 meses, observamos uma transição da sinalização adaptativa da UPR para a pró-apoptótica, marcada pelo aumento das expressões gênicas de Perk, Atf6 e Pdi A2 (adaptativa), redução da Grp78 e aumento da Chop e Caspase 3 (apoptótica). No HSD de 6 meses, observamos uma falência total da sinalização

adaptativa da UPR (sensores da UPR e chaperonas), e aumento da sinalização apoptótica, caracterizada pela redução do Bcl2 e aumento da expressão gênica/proteica de Chop. Adicionalmente, observamos também redução da expressão gênica do Bdnf, redução da expressão proteica de Grp94 e clivagem proteica do Parp-1 compatível com a presença de Calpaína (marcador de necrose/apoptose). As expressões encontradas no HSD de 6 meses foram semelhante as alterações observadas no grupo OLD, mas os fatores de morte celular (Chop e Calpaína) foram encontrados apenas no HSD. Como esperado, os marcadores de senescência (p53 e p21) estavam aumentados no grupo OLD e apenas o p21 se mostrou aumentado no HSD. **Conclusões:** Nosso conjunto de dados apoia que a exposição prolongada à dieta rica em sacarose promove SM e estresse oxidativo, que perturba a homeostase do RE hipocampal, acarretando aceleração da senescência e morte celular, e subsequentes prejuízos cognitivos, comportamentais e motores.

Palavras-chave: Dieta rica em sacarose; Síndrome metabólica; Prejuízos cognitivos e motores; Estresse do retículo endoplasmático; Hipocampo.

ABSTRACT

Background: The epidemiological rise of metabolic syndrome (MS) is directly related to the exponential increase of added sugar consumption. Studies describes that MS-metabolic disorders, mainly insulin resistance and obesity, are related to development of oxidative stress, cognitive declines and dementias, and neuronal senescence acceleration. Even with several evidences correlating MS to neuronal damage, the molecular mechanisms involved are still unclear, and the endoplasmic reticulum stress (ER stress), in this context, could be placed like an intermediary condition that interconnects those morbidities. **Objective:** To investigate the deleterious effects of hippocampal ER stress about progression of cognitive, behavioral and motor declines in rats with metabolic syndrome-induced by sucrose-rich diet in different ages. **Methods:** Weaned Wistar rats were divided into 4 groups: two control groups (CTR, n = 7-9), fed a standard diet and followed up to 3 and 6-months-old, respectively; and two obese groups (HSD, n = 7), fed a sucrose-rich diet (25% sucrose) followed by the same periods. Was assessed in these groups: MS development; redox profile; Cognitive, behavioral and motor functions; And the hippocampal gene/protein expression of UPR sensors (Ire1 α , Perk and Atf6), chaperones (Grp78, Grp94, Pdi, Calnexin and Calreticulin), neuronal plasticity (Bdnf), antioxidant defense (Nrf2), apoptosis (Bcl2, Chop and Parp-1) and senescence (p53 and p21). For aging control, rats at 20 months of age (OLD, n = 7) fed standard chow were included as aging control for gene/protein expression and neurological assessments. **Results:** The sucrose-rich diet was successful in establish the SM-phenotype. At 3 months, we observed central obesity even with lower energy intake, fasting and fed dysglycemia, hypertriglyceridemia, hepatic ectopic fat deposit, decreased lipolysis rates, glucose intolerance and hepatic insulin resistance. In unpublished data, we observed mild lipid peroxidation without exepressive antioxidant enzymes activity, and absence of peripheral insulin resistance. In animals with 6 months, we observed a deepening of metabolic dysfunctions encountered in 3-months-old. In addition we observed weight gain, free fatty acids, hyperinsulinemia, peripheral insulin resistance, increased lipid peroxidation, higher SOD, CAT and GPx reduction activity in 6-months-old rats. The lipolysis rate wasn't performed. Regarding the neurofunctional assessment at 3-months-old, the animals presented motor deficit and anxiogenic behavior, however without cognitive dysfunctions. In 6-months-animals, we observed anxiogenic behavior and important motor and cognitive impairments (learning and memory), similar to OLD group. Hippocampal molecular analysis revealed a different signaling between HSD groups of 3 and 6-months. In HSD at 3 months, we observed a switch-over from UPR-adaptive to pro-apoptotic signaling, marked by increased gene expression of Perk, Atf6 and Pdi A2 (adaptive), reduction of Grp78 and Bcl2, and increases of Chop and Caspase 3 (Apoptotic). In 6-months-HSD, we observed a complete failure of UPR adaptive signaling (UPR sensors and chaperones) and increased apoptotic signaling, featured by Bcl2 reduction and increased gene/protein expression of Chop. Additionally, we observed a reduction in the Bdnf gene expression and protein cleavage of Parp-1 compatible to calpain presence (necrosis/apoptosis marker). The expressions found in

the 6-month-HSD were similar to OLD group, but the cell death markers (Chop and Calpain) were found only in HSD. As expected, senescence markers (p53 and p21) were increased in the OLD group and only p21 shown increased in HSD. **Conclusions:** Our data set supports that prolonged exposure to sucrose-rich diet promotes SM and oxidative stress, which disrupt hippocampal ER homeostasis, leading to senescence acceleration and cell death, and subsequently leads to severe cognitive, behavioral and motor impairments.

Keywords: High-sucrose diet; Metabolic syndrome; Cognitive and motor impairments; ER stress; Hippocampus.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AKT	Proteína quinase B
ApoE	Apolipoproteína E
ARE	Elemento responsivo antioxidante
ASK1	Quinase 1 reguladora de sinal de apoptose
Atf4	Fator 4 de ativação transcricional
Atf6	Fator 6 de ativação transcricional
Atf6f	Fator 6 de ativação transcricional fosforilado
ATP13-A2	13-A2 tipo atpase
Aβ	Proteína β -amilóide
Bak	Assassina/antagonista do Bcl2
Bax	Proteína X associada ao Bcl2
Bcl2	Célula B de linfoma 2
Bcl2-L2	Célula B de linfoma 2 como proteína 2
Bcl-xl	Célula B de linfoma extra larga
Bdnf	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BI-1	Inibidor 1 do Bax
Bim	Proteína 11 como o Bcl2
BIP	Proteína ligante de imunoglobulina (ver Grp78)
C/EBP	Proteínas ligantes ao amplificador CCAAT
Ca²⁺	Íons cálcio
CAT	Enzima catalase
Chop	Proteína homóloga da C/EBP
CNX	Calnexina
COPII	Proteína casaco tipo II
CREB	Ligante do elemento de resposta ao AMP-cíclico
CRT	Calreticulina
DA	Doença de Alzheimer
DH	Doença de Huntington

DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
DPR	Doença priônica
EAL	Esclerose amiotrófica lateral
EDEM	Proteína de aumento da degradação do RE como 1,2 manosidase
eIF2α	Fator eucariótico iniciador de tradução 2, subunidade alfa
ERAD	Mecanismo de degradação associado ao retículo endoplasmático
ERE	Estresse do retículo endoplasmático
ERGIC-53	Lectina ligante de manose 1
ERGL	Lectina como ligante de manose 1
Erp57	Proteína dissulfeto isomerase, família A, membro 3
FOXO1	Caixa O1 de Forkhead
FUS	Proteína de ligação ao RNA fundido no sarcoma
Gadd34	Indutor 34 de dano ao DNA
GCN2	Controlador geral não pressionável 2
GI	Enzima glicosidase I
GII	Enzima glicosidase II
GPx	Enzima glutationala peroxidase
Grp78	Proteína regulada por glicose 78 (ver BiP)
Grp94	Proteína regulada por glicose 94
GTI	Enzima uridina difosfato glicuronil transferase
HSP	Proteína de choque térmico
HTT	Proteína huntingtina
IL-6	Interleucina 6
Ire1	Enzima 1 dependente de inositol
IRS-1	Substrato do receptor 1 de insulina
IRS-2	Substrato do receptor 2 de insulina
Jnk	Quinase c-jun n-terminal
MDA	Malondialdeídos

mTORC1	Complexo 1 da proteína alvo da rapamicina em mamíferos
NF-κB	Fator nuclear kappa B
Noxa	Oxidase do fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
OST	Enzima oligosacariltransferase
p21	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A
p53	Gene supressor tumoral p53
p75	Receptor p75
Parp-1	Enzima poli (ADP-ribose) polimerase-1
Pdi	Proteína dissulfeto isomerase
Pdi A2	Proteína dissulfeto isomerase A2
Perk	Proteína quinase do retículo endoplasmático <i>PKR-like</i>
PI3K	Enzima fosfatidil inositol 3 quinase
PKR	Fator eucariótico iniciador de tradução 2 quinase alfa 2
PP2A	Proteína fosfatase 2A
Ppi	Enzima peptidil-prolil cis-trans isomerase
PTP	Poros de transição de permeabilidade
Puma	Modulador de apoptose regulado pelo p53
RAB1	Membro RAS da família de oncogenes
RACK1	Receptor da proteína quinase C 1 ativada
RE	Retículo endoplasmático
RI	Resistência à insulina
RIDD	Mecanismo de decaimento regulado de RNAm Ire1 dependente
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
S1P	Protease sítio 1
S2P	Protease sítio 2
SERCA2	Canal do retículo sarcoplasmático Ca ²⁺ /ATPase 2
SM	Síndrome metabólica

SNARE	Receptor da proteína de anexo a proteína de fusão NSF solúvel
SNC	Sistema nervoso central
SOCE	Canal de cálcio operador de armazenamento
SOD	Enzima superóxido dismutase
SOD-1	Enzima superóxido dismutase-1
SPC	Enzimas peptidases do peptídeo sinal
TDP-43	Proteína TAR 43 de ligação ao DNA
TRAF2	Fator-2 associado ao receptor do fator de necrose tumoral
TRKB	Receptor neurotrófico tirosina quinase, tipo 2
UPR	Resposta a proteínas mal enoveladas (<i>Unfolded protein response</i>)
VAPB	Proteína B associada à proteína de membrana associada a vesículas
VIP36	Lectina como ligante de manose 2
Xbp1	Proteína 1 de ligação à caixa X
YIF1A	Fator homólogo A de interação ao Y1p1

LISTA DE FIGURAS

	p.
Figura 1 - Caracterização do retículo endoplasmático	22
Figura 2 - Processo de translocação e proteínas de suporte do lúmen do retículo endoplasmático	23
Figura 3. Enovelamento proteico	27
Figura 4. Processo de ubiquitinação proteica e degradação proteossomal .	28
Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de ativação das proteínas sensores	30
Figura 6. Cascata de sinalização adaptativa da UPR	31
Figura 7. Ordem cronológica das respostas adaptativas da UPR	33
Figura 8. Destino celular em situações de manutenção do ERE	34
Figura 9. Sinalizadores apoptóticos no ERE	37
Figura 10. Cinética da UPR e apoptose celular	37
Figura 11. Necrose mediada por calpaína	38
Figura 12. Atuação da UPR na expressão de genes relacionados à plasticidade neuronal e consolidação de memórias	42
Figura 13. UPR em processos de neurogênese e diferenciação neuronal ...	43
Figura 14. Atuação da Xbp1 na supressão da resistência à leptina no hipotálamo	44
Figura 15. Interferência de proteínas mutantes sobre a atividade de chaperonas	48
Figura 16. Interferência de proteínas mutantes sobre o mecanismo de ERAD	49
Figura 17. Interferência de proteínas mutantes sobre o tráfego para o aparelho de Golgi	49
Figura 18. Interferência de proteínas mutantes sobre a ativação da UPR	50
Figura 19. Interferência de proteínas mutantes sobre a homeostase dos níveis de cálcio	51

LISTA DE TABELAS

	p.
Tabela 1. Proteínas relevantes para o controle de qualidade do RE e suas funções	25
Tabela 2. Estresse do retículo endoplasmático e seu papel no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas	47

SUMÁRIO

	p.
1. INTRODUÇÃO	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1. Retículo endoplasmático (RE) e controle de qualidade do enovelamento proteico	21
2.2. Mecanismo de degradação associado ao RE (ERAD)	26
2.3. Estresse do retículo endoplasmático (ERE) e resposta a proteínas não enoveladas (UPR)	28
2.4. Apoptose celular regulada pelo RE	34
2.5. UPR na regulação fisiológica de atividades celulares	39
2.6. UPR na regulação fisiológica do sistema nervoso central	41
2.7. Contribuições do ERE para o desenvolvimento de patologias	44
2.7.1. Doenças neurodegenerativas	44
2.7.2. Síndrome metabólica	51
2.8. ERE e o envelhecimento celular	53
3. OBJETIVOS	56
3.1. Objetivo geral	56
3.2. Objetivos específicos	56
4. RESULTADOS	57
4.1. Capítulo I	57
4.2. Capítulo II	68
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
REFERÊNCIAS	107
ANEXOS	121

1. INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica (SM) pode ser definida como um conjunto de disfunções metabólicas interconectadas que aumentam os riscos para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2). Obesidade central, resistência à insulina (RI), hiperglicemia com intolerância à glicose, dislipidemia aterogênica, esteatohepatite não-alcoólica, hipertensão e distúrbios trombóticos são alguns dos fatores de risco que constituem esta síndrome (Kaur, 2014). A SM é considerada um alarmante problema de saúde pública afetando aproximadamente 25% da população mundial independente de gênero, etnia e desenvolvimento social. A patogênese da SM ainda não é totalmente conhecida, mas sabe-se que fatores como a genética, sobrepeso, idade, consumo energético excessivo e sedentarismo são encontrados na maioria dos pacientes com a morbidade (Alberti *et al.*, 2005).

Dentre outros fatores, o expressivo crescimento da SM está relacionado ao aumento exponencial no consumo de açúcares de adição como edulcorantes em alimentos processados e refrigerantes (Tappy *et al.*, 2010). Evidências demonstram uma clara associação entre exposições a dietas constituídas por açúcares de adição (principalmente sacarose, xarope de milho e frutose) e o desenvolvimento de alterações metabólicas, dentre elas: ganho de peso com obesidade central, dislipidemia (principalmente hipertrigliceridemia), acúmulo de gordura ectópica hepática, intolerância a glicose, hiperinsulinemia, RI e estresse oxidativo (Kanarek e Orthén-Gambill, 1982; Kanazawa *et al.*, 2003; Basciano *et al.*, 2005; De Moura *et al.*, 2009; Botezelli *et al.*, 2012).

O elevado consumo de sacarose/frutose também está associado a prejuízos na plasticidade do tecido hipocampal, causada principalmente por RI, hipertrigliceridemia, inflamação e estresse oxidativo (Lakhan e Kirchgessner, 2013). Isso demonstra um claro envolvimento das disfunções metabólicas da SM, especialmente a RI e obesidade, com o desenvolvimento e/ou agravamento de déficits cognitivos e demências, mesmo em idades mais precoces (Panza *et al.*, 2010). Uma abordagem mais recente inclusive descreve que prejuízos na sinalização da insulina em nível cerebral precedem as perdas cognitivas da Doença

de Alzheimer (DA), elencando a DA como um “diabetes *mellitus* tipo 3” (Suzanne e Wands, 2008).

Disfunções metabólicas como a RI, perda da homeostase da glicose e aumento da secreção hepática de triglicerídeos, possuem um grande impacto sobre a senescência celular e encurtamento de telômeros, provavelmente por compartilharem uma sinalização intermediária semelhante (Picard e Guarente, 2005; Ahima, 2009). Neste contexto, o estado de estresse do retículo endoplasmático (ERE) pode ser elencado como um possível agente intermediário que conecte as duas condições de estresse celular.

O ERE pode ser definido como uma condição de desequilíbrio entre a produção de proteínas mal enoveladas no lúmen do retículo endoplasmático (RE) e sua capacidade de erradicar estas proteínas aberrantes (Hetz, 2012). Perturbações na homeostase do RE podem levar a inibição de atividades de chaperonamento e de degradação proteassomal, causando um acúmulo de proteínas mal enoveladas e estabelecendo uma condição de ERE, que está diretamente relacionada à instauração e agravamento de diversas patologias de importância clínica, como por exemplo, doenças neurodegenerativas, disfunções metabólicas, neoplasias e cardiopatias (Park e Ozcan, 2013).

Para controlar os efeitos deletérios do ERE, uma série de eventos adaptativos conhecida como resposta a proteínas mal enoveladas (UPR) é ativada, com o objetivo de preservar a integridade celular e restaurar a homeostase do RE (Malhotra e Kaufman, 2007). Entretanto, em condições de manutenção deste ERE por um tempo prolongado (por exemplo, doenças crônicas como a SM), as mesmas proteínas sensores da UPR responsáveis por iniciar uma sinalização pró-adaptativa ao estresse podem migrar para uma sinalização pró-apoptótica, levando a uma morte celular precoce (Rutkowski e Kaufman, 2004).

O ERE tem sido descrito como um modulador negativo da síntese e sinalização da insulina, tendo um papel importante na instauração da resistência insulínica periférica e hepática, assim como na inflamação e falência de células β -pancreáticas, isto principalmente causado pela redução do chaperonamento proteico e de toda sinalização adaptativa da UPR (Flamment *et al.*, 2012; Salvadó *et al.*, 2015). É importante frisar também o envolvimento direto da UPR/ERE com o

processo de senescência fisiológico. Com o avançar da idade temos uma progressiva inibição do chaperonamento proteico, acúmulo de proteínas mal enoveladas e consequente envelhecimento celular (Brown e Naidoo, 2012).

Apesar dos dados citados acima, a comunidade científica ainda não é conclusiva quanto ao impacto da SM sobre o declínio neurofuncional e o envolvimento das vias de sinalização da UPR neste quadro. Hipotetizamos em nosso trabalho que disfunções metabólicas, declínio neurofuncional e senescência possuem uma complexa rede de sinalização compartilhada entre si, tendo o ERE no tecido hipocampal como um importante intermediário conectando todos estes estados patológicos.

A partir disso, nosso estudo tem como objetivo principal caracterizar o impacto do estresse do retículo endoplasmático hipocampal sobre o surgimento de declínios cognitivo, comportamental e motor em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta rica em sacarose. Esta caracterização é essencial a futuros estudos de substâncias antioxidantes e chaperonas sintéticas na prevenção do envelhecimento neuronal, dos fatores de risco da SM e de doenças neurodegenerativas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Retículo endoplasmático (RE) e controle de qualidade do enovelamento proteico

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela citoplasmática exclusiva de eucariotos formada a partir de invaginações da membrana nuclear, que se ramificam em uma rede de túbulos e vesículas achatadas interligando o espaço perinuclear às demais organelas citosólicas. O RE é constituído por 3 porções contínuas entre si: 1) as cisternas e túbulos, que são locais predominantes de síntese e transporte proteico; 2) o envelope nuclear, constituído por uma dupla membrana que delimita o lúmen do retículo; 3) e as zonas periféricas, porções de contato direto com o aparelho de Golgi, mitocôndrias, peroxissomos e lisossomos (Schröder, 2008; Chaudhari *et al.*, 2014) (Figura 1A).

Classicamente o RE é dividido em duas estruturas interligadas, porém funcionalmente distintas: o RE rugoso e o RE liso, relacionados à presença e ausência de ribossomos aderidos nas paredes das cisternas e túbulos, respectivamente. Em virtude da presença dos ribossomos, o RE rugoso é primordialmente caracterizado como um local de síntese e enovelamento proteico, enquanto que o RE liso está mais relacionado ao armazenamento e controle da homeostase dos íons Ca^{2+} , biossíntese de fosfolipídeos e esteróis, montagem da bicamada lipídica, metabolismo de carboidratos e produção de enzimas de detoxificação (Rutkowski e Kaufman, 2007; Bravo *et al.*, 2013) (Figura 1B).

O enovelamento proteico é monitorado pelo controle de qualidade do RE, uma série de modificações específicas reguladas por proteínas transmembrana e chaperonas luminais do RE que, de forma criteriosa, são responsáveis por promover enovelamento em proteínas nascentes, secretar proteínas maduras e encaminhar proteínas com falhas de enovelamento para sofrer processo de degradação proteassomal (Araki e Nagata, 2011).

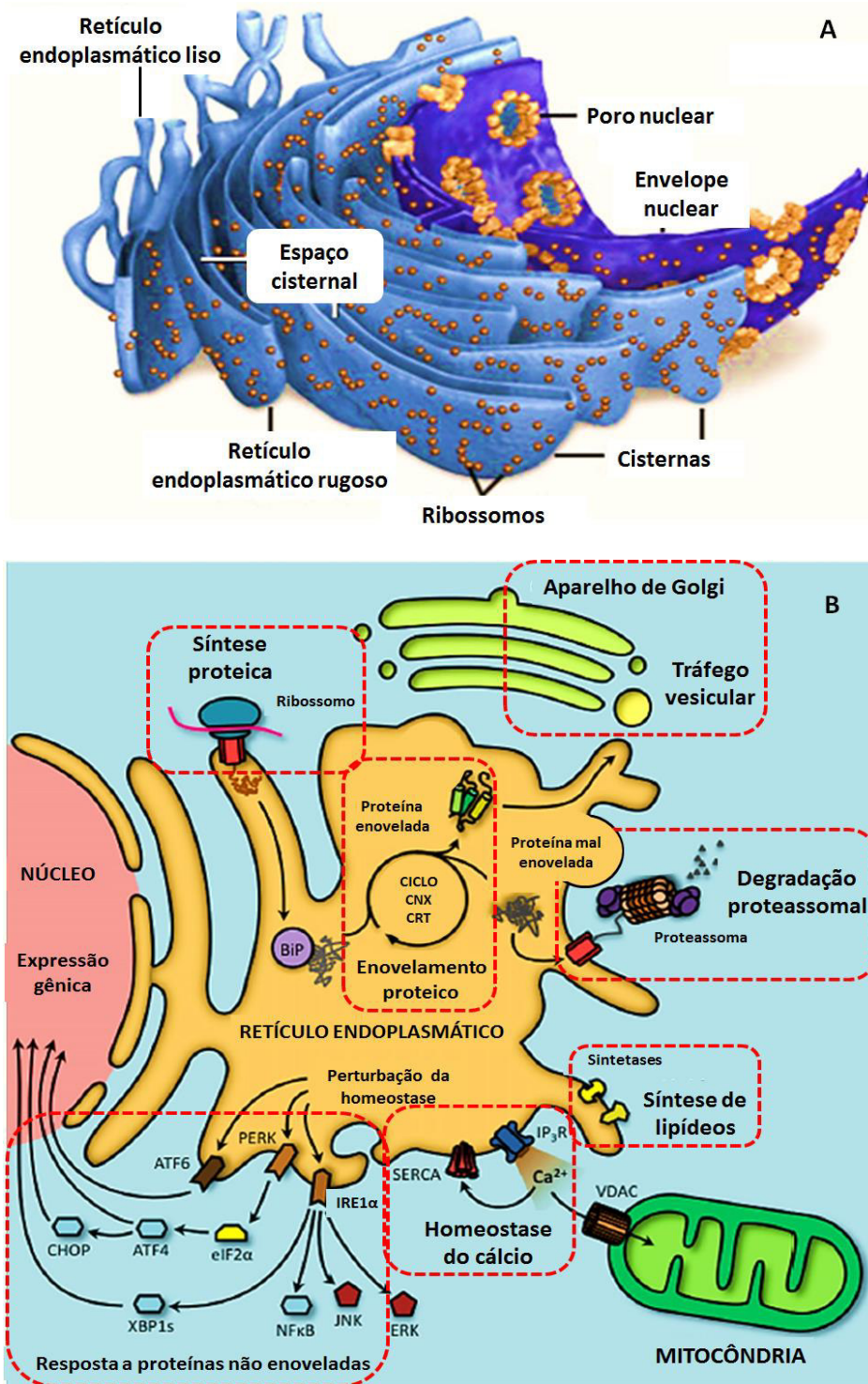


Figura 1: Caracterização do retículo endoplasmático. A | Subdivisões e estruturas do retículo endoplasmático. O retículo endoplasmático (RE) se divide em RE rugoso e liso. As invaginações contínuas à membrana nuclear formam cisternas e túbulos. B | Funções fisiológicas do retículo endoplasmático. O RE está relacionado a diversas funções fisiológicas como manutenção da homeostase do cálcio, síntese e enovelamento de proteínas, síntese de lipídeos, tráfego de substratos para demais organelas, degradação de proteínas mal enoveladas (ERAD) e sinalização adaptativa em resposta a perturbação da homeostase – Resposta a proteínas mal enoveladas (UPR). Adaptado de: A | <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/endoplasmicreticulum/endoplasmicreticulum.html>; B | Bravo *et al.* (2012)

O processo de enovelamento se inicia com a síntese proteica efetivada pelos ribossomos citosólicos e/ou aderidos às cisternas, e segue de forma sequenciada as seguintes etapas: 1) translocação da proteína nascente para o RE; 2) processo de n-glicosilação; 3) processo de chaperonamento; e 4) exportação luminal (Hebert e Molinari, 2007).

Para a etapa de translocação ocorrer se torna primeiramente necessário a identificação do canal translocador (complexo sec61) e depois o ancoramento da proteína ao canal adequado. Este processo de identificação/ancoramento é determinado pela atuação do peptídeo sinal localizado na porção n-terminal da proteína nascente. Após o devido aporte proteico no complexo sec61, a proteína nascente sofre processo de clivagem do peptídeo sinal (realizado pelas peptidases do peptídeo sinal - complexo SPC), e então é transportada ao lúmen do RE por translocação cotraducional (Palzkill *et al.*, 1994; Hebert e Molinari, 2007) (Figura 2).

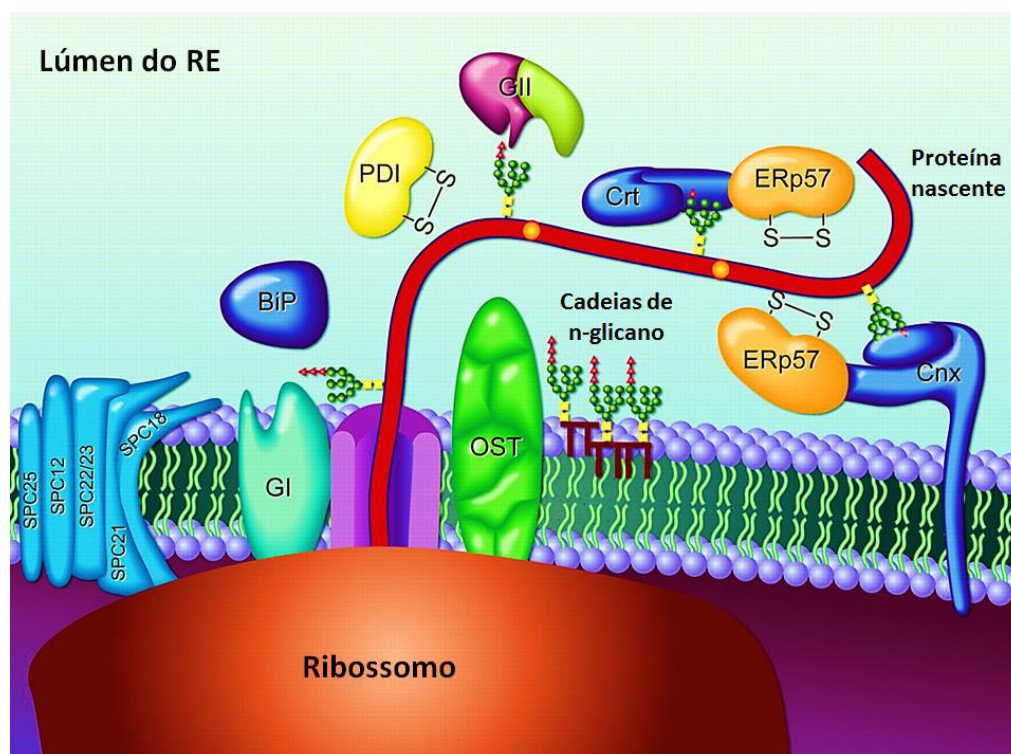


Figura 2. Processo de translocação e proteínas de suporte do lúmen do retículo endoplasmático. Proteína nascente (cadeia em vermelho) traduzida por um ribossomo, sendo translocada para o lúmen do retículo através do canal Sec61 (canal roxo) e submetida a processo de enovelamento por proteínas acessórias, como as peptidases do peptídeo sinal (complexo SPC); a oligosacariltransferase (OST), que adiciona cadeias de n-glicano na proteína nascente; glicosidases I e II (GI e GII); oxiredutases (Pdi e ERp57); e chaperonas (BiP, Cnx e Crt). **Adaptado de:** Hebert e Molinari (2007).

O processo de n-glicosilação pode ser executado antes da translocação e/ou no interior do lúmen, pela atuação das enzimas transmembrana oligosacariltransferase (OST), que realizam uma série de reações pós-traducionais de adição de sacarídeos (3 moléculas de glicose, 9 de manose e 2 de n-acetil glucosamina) a uma das extremidades da proteína nascente, com o objetivo de aumentar a solubilidade e melhorar a estabilidade das cadeias para o enovelamento (Kim e Hahn, 2015) (Figura 2). Proteínas que não são n-glicosiladas durante a translocação são captadas por chaperonas e resubmetidas à ação da OST ou então, são enoveladas de forma independente do ciclo CNX/CRT, a ser explicado em breve (Brodsky e Skach, 2011).

As proteínas chaperonas são elencadas como as principais responsáveis pelo processo de enovelamento e atuam convertendo cadeias lineares de polipeptídeos em estruturas terciárias ou quaternárias. Dobramento, montagem, clivagem do peptídeo sinal, n-glicosilação e formação de pontes de dissulfeto são as principais modificações pós-translacionais executadas por chaperonas (Ron e Walter, 2007; Yoshida, 2007). Encontram-se descritas na tabela 1 as principais chaperonas e demais proteínas relevantes para a manutenção do controle de qualidade do RE e processo de enovelamento.

O enovelamento depende principalmente da atuação das chaperonas calnexina (CNX) e calreticulina (CRT) que possuem um domínio *extended arm-like* com uma chaperona Erp57 associada (família das proteínas dissulfeto isomerase – Pdi's). CNX/CRT são duas lectinas importantes no controle da n-glicosilação, sendo a calnexina uma proteína transmembrana e a calreticulina uma homóloga solúvel no lúmen. A ligação à CNX/CRT/Erp57 retém a proteína no RE permitindo atividades catalíticas de enzimas foldases e isomerases na formação de estruturas terciárias (Hebert e Molinari, 2007). A Pdi Erp57 e outras membras da família da Pdi, são tio-oxiredutases que possuem motivos catalíticos CxxC em seu domínio tioredoxina, sendo então responsáveis pela formação de pontes de dissulfeto (função oxi-redutase), reorganização do posicionamento de pontes a partir de repetidos ciclos de oxiredução (função isomerase) e chaperonamento (independente do motivo catalítico) (Grek e Townsend, 2014).

Tabela 1. Proteínas relevantes para o controle de qualidade do RE e suas funções

Proteínas do controle de qualidade do RE	Funções
Peptidases do peptídeo sinal (complexo SPC)	Clivagem do peptídeo sinal
Oligosacariltransferase	N-glicosilação
Glicosidases I e II	Retiram moléculas de glicose da cadeia n-glicano
Proteína regulada por glicose de 78 kDa (Grp78)	Modulação do fluxo de proteínas nascentes para o RE; Exposição de sequências hidrofóbicas da proteína; Chaperonamento; Regulação da homeostase do cálcio; Transporte de proteínas mal enoveladas para a degradação; Iniciadora de respostas adaptativas do RE a situações de estresse
Calnexina (CNX) e calreticulina (CRT)	Chaperonamento
Proteínas dissulfeto isomerase (Pdi's)	Formação de pontes de dissulfeto (função oxi-redutase); Reposicionamento de pontes a partir de repetidos ciclos de oxiredução (função isomerase); Chaperonamento
Peptidil-prolil cis-trans isomerase (Ppi)	Alteração de estados conformacionais cis/trans das cadeias polipeptídicas
Proteína regulada por glicose de 94 kDa (Grp94)	Processos finais de enovelamento de proteínas de alto peso molecular (imunoglobulinas, receptores <i>tool-like</i> e integrinas)

Fonte: (Hebert e Molinari, 2007; Brodsky e Skach, 2011; Grek e Townsend, 2014).

A proteína regulada por glicose de 78 kDa (Grp78 ou BiP) também é primordial para a regulação de todo processo de enovelamento do RE, visto que ela é a responsável por: 1) modular o influxo de proteínas nascentes na porção luminal e “selar” os canais translocadores inativos; 2) expor as sequências hidrofóbicas da proteína nascente, facilitando o processo de chaperonamento; 3) atuar na dobragem, oligomerização e desagregação proteica; 4) contribuir para a homeostase do cálcio no RE; 5) transportar proteínas mal enoveladas para a degradação; 6) e atuar como iniciadora de respostas adaptativas do RE a situações de estresse (Hebert e Molinari, 2007).

A etapa de chaperonamento se inicia com a remoção na cadeia peptídica de duas moléculas de glicoses pelas enzimas glicosidase I e II de forma sucessiva, deixando a cadeia monoglicosilada e apta para a interação com a CNX/CRT/ERp57. Enquanto a proteína permanece ligada se torna disponível para o processo de

enovelamento promovido pelas chaperonas do controle de qualidade do RE. Após a finalização do processo de enovelamento, as proteínas sofrem uma clivagem da glicose remanescente da cadeia por ação da glicosidase II, o que impede novas interações com CNX/CRT/ERp57. Por fim, a proteína já enovelada, é desassociada do complexo CNX/CRT/ ERp57 e captada por lectinas de ligação (ERGIC-53, VIP36, ERGL) que se acoplam à manose restante da cadeia peptídica e transportam a mesma ao aparelho de Golgi para processamento final e distribuição para o citosol (Ellgaard e Helenius, 2003) (Figura 3).

2.2. Mecanismo de degradação associado ao RE (ERAD)

Se mesmo após sucessivas tentativas de chaperonamento uma proteína não for adequadamente manufaturada pelos mecanismos do controle de qualidade do RE, ela deve ser removida da via de montagem e submetida a mecanismos de lise proteossomal. A série de eventos que caracterizam o reconhecimento e translocação da proteína mal enovelada para o citosol e sua posterior degradação proteossomal é conhecida como mecanismo de degradação associado ao RE (ERAD) (Kleizen e Braakman, 2004).

Os defeitos no enovelamento são identificados pela enzima uridina difosfato glicuronil transferase (GTI), que adiciona uma molécula de glicose à cadeia da proteína mal enovelada, possibilitando desta forma, uma nova interação cíclica com CNX/CRT/ERP57 e demais chaperonas. A permanência no ciclo CNX/CRT/ERP57 é regulada pela atividade da GTI e da glicosidase II, que respectivamente, adicionam e retiram a glicose da cadeia permitindo sucessivas interações com as chaperonas. Em alguns casos, mesmo após diversos ciclos de interações com as chaperonas, a situação do incorreto enovelamento não se altera. Nestas condições, a proteína é transportada pela Grp78 para sofrer demanosilação (enzima α 1,2-manosidase I), tornando-a suscetível para interação com a proteína de aumento da degradação do RE como 1,2 manosidase (EDEB), que medeia o processo de translocamento da proteína para o citosol e encaminha a mesma para a via proteolítica ubiquitina-proteassoma (Ellgaard e Helenius, 2003) (Figura 3).

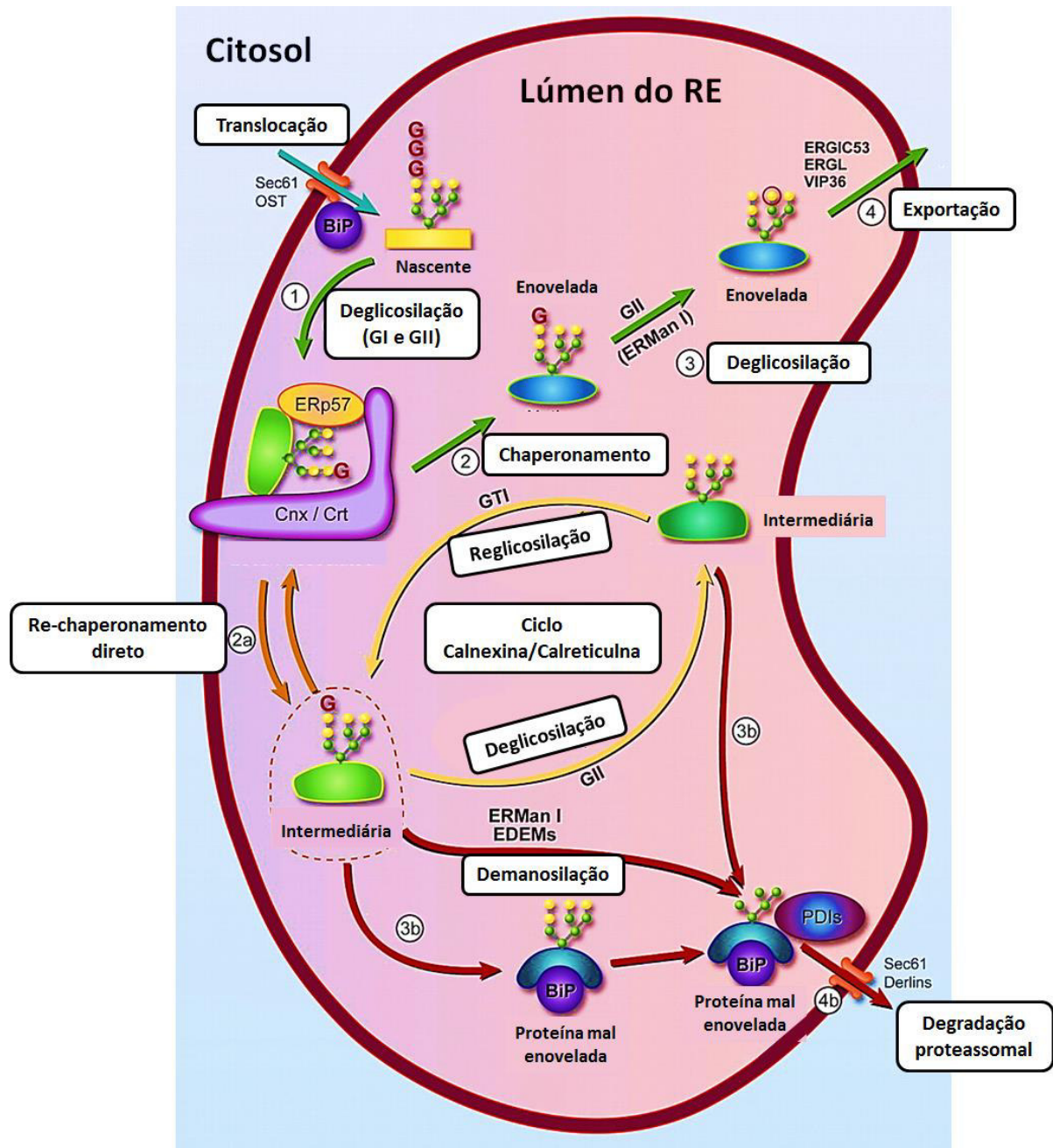


Figura 3. Enovelamento proteico. Durante o processo de translocação da proteína nascente pelo complexo Sec61 para o lúmen, a oligosacariltransferase (OST) adiciona à cadeia 3 moléculas de glicose (G), 1 de manose (pontos verdes e amarelos) e 1 de n-acetilglucosamina (não mostrada na gravura). Dois resíduos de glicose são retirados sequencialmente da cadeia pela ação da glicosidase I (G1) e glicosidase II (G2) (etapa 1). A glicoproteína monoglicosilada sofre chaperonamento pela calnexina (CNX) e/ou calreticulina (CRT) com uma oxireductase ERp57 associada (etapa 2). A proteína enovelada desacoplada do complexo CNX/CRT/ERp57 sofre deglicosilação por ação da G2 (etapa 3), impedindo nova interação com o complexo, para então ser captada pelas lectinas de ligação a manose terminal (ERGIC-53, ERGL e VIP36) e exportadas para o citosol (etapa 4). Em situações de enovelamento incorreto a proteína pode retornar ao complexo CNX/CRT/ERp57 diretamente (2a) ou de forma cíclica por meio de deglicosilação pela G2 e reglicosilação pela enzima uridina difosfato glicuronil transferase (GT1). Quando a situação do enovelamento incorreto não é corrigida, a proteína sofre retirada parcial de moléculas de manose (demanosilação) pelo EDEM e é transportada pela BiP (3b) para sofrer degradação proteossomal no citosol (4b). **Adaptado de:** Hebert e Molinari (2007).

A via proteolítica se inicia com a enzima E1 ativadora de ubiquitina que ativa a ubiquitina (com consumo de ATP) e a transfere para a enzima E2 conjugadora formando um complexo E2/ubiquitina. Durante o processo de ativação e conjugação da ubiquitina, a enzima E3 ligase promove o reconhecimento da proteína não enovelada no citosol e se liga aos resíduos de lisina da mesma. Em seguida, inicia-se a fase de ubiquitinação, onde o complexo E2/ubiquitina se liga a enzima E3 e transfere a molécula de ubiquitina à proteína não enovelada. A fase de ubiquitinação se repete sucessivamente até que uma cadeia de ubiquitina esteja atrelada a proteína. A proteína mal enovelada e agora poliubiquitinada é reconhecida pela subunidade 19S do complexo 26S proteassoma, que inicia fragmentação da proteína em oligopeptídeos por processo de proteólise (Rahimi, 2012) (Figura 4).

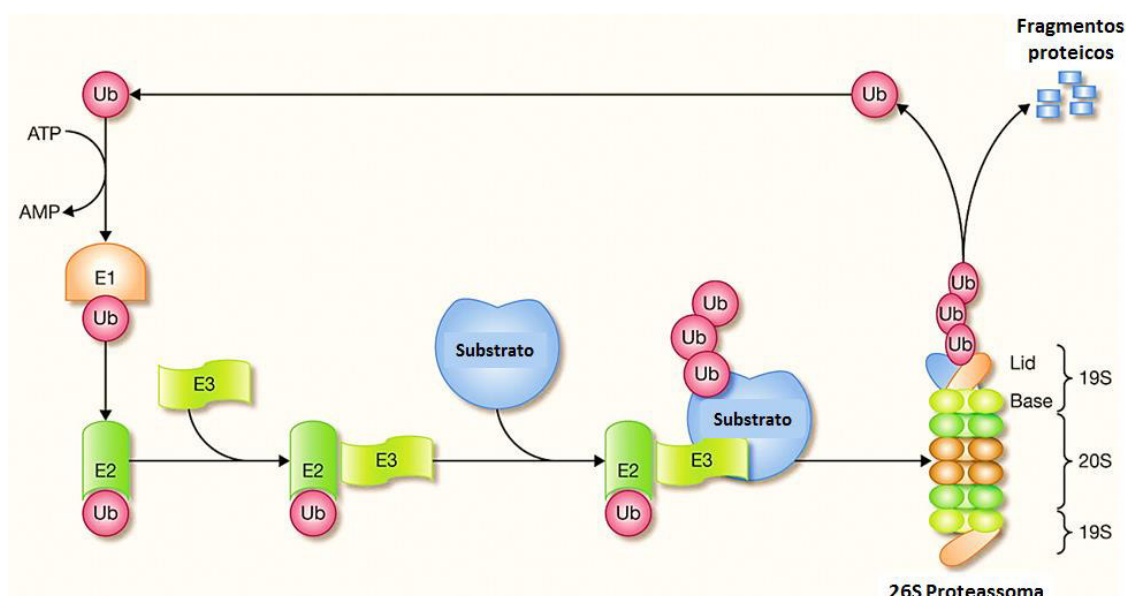


Figura 4. Processo de ubiquitinação proteica e degradação proteassomal. A ubiquitina é ativada pela enzima ativadora de ubiquitina (E1) e transferida para a enzima conjugadora de ubiquitina (E2). A E2 ubiquitinada transfere a molécula de ubiquitina para o complexo formado pelo substrato (proteína mal enovelada) e enzima ligase (E3). Esta conjugação se repete até que o substrato se torne poliubiquitinado e apto para sofrer o processo de degradação proteassomal (proteassoma 26S), liberando fragmentos proteicos e moléculas de ubiquitina para serem reaproveitadas. **Adaptado de:** Rahimi (2012).

2.3. Estresse do retículo endoplasmático (ERE) e resposta a proteínas não enoveladas (UPR)

A maquinaria responsável pelo controle de qualidade do enovelamento proteico no RE é particularmente muito sensível a quaisquer perturbações na

homeostase celular. Estados de hipóxia, isquemia, privação de sono, inanição, infecções, excesso de lipídeos e/ou carboidratos, flutuações da homeostase do cálcio e estresse oxidativo comprometem todo processo de qualidade do enovelamento, acarretando em uma maior produção e acúmulo de proteínas mal enoveladas no lúmen do RE (Rutkowski e Kaufman, 2007).

A persistência dessas perturbações leva ao acúmulo de proteínas mal enoveladas e sobrecarga de todo sistema de processamento com progressiva diminuição do chaperonamento proteico e degradação proteassomal, ocasionando maior concentração de proteínas mal enoveladas. Esta condição de acúmulo traz diversos prejuízos funcionais à célula e é denominada estresse do retículo endoplasmático (ERE) (Rutkowski e Kaufman, 2004).

Para amenizar os efeitos deletérios e preservar a integridade celular enquanto persiste a condição de ERE, a célula inicia um processo adaptativo conhecido como resposta a proteínas não enoveladas (*unfolded protein response* - UPR), no qual são ativados mecanismos adaptativos visando o restabelecimento da homeostase do retículo (Malhotra e Kaufman, 2007).

A UPR é caracterizada como uma cascata de sinalização com finalidade de: 1) resgatar a qualidade da síntese proteica; 2) atenuar a síntese global de proteínas; 3) degradar RNAm's aberrantes; 4) aumentar a síntese de proteínas chaperonas e de enzimas antioxidantes; 5) aumentar a expressão gênica dos componentes de ERAD; 6) e respostas de autofagia. Além da modulação do correto enovelamento proteico, a UPR também está relacionada ao metabolismo de aminoácidos, função mitocondrial e detoxificação (Rutkowski e Kaufman, 2007).

A UPR inicia-se com a ativação de 3 proteínas associadas à membrana do RE que desencadeiam vias sinalizadoras de resposta, são elas: a enzima 1 dependente de inositol (Ire1), o fator 6 de ativação transcricional (Atf6) e a proteína quinase do retículo endoplasmático *PKR-like* (Perk) (Rutkowski e Kaufman, 2004).

Em condições de homeostase, a Grp78 se encontra associada ao domínio transluminal das proteínas sensores (domínio amino-terminal da Ire1 e Perk, e carboxi-terminal do Atf6), mantendo-as em estado de latência. No início do quadro de ERE, quando o número de proteínas mal enoveladas excede a capacidade de enovelamento das chaperonas a Grp78 se desacopla das proteínas sensores para

auxiliar no enovelamento, desencadeando autofosforilação/dimerização das proteínas e iniciando uma cascata de sinalização. Com o aumento progressivo do ERE, as proteínas sensores se replicam formando aglomerados e intensificam todas suas cascatas de sinalização. Após controle do ERE, os aglomerados se dissociam e o Grp78 volta a se associar a proteína sensor, diminuindo sua resposta adaptativa ao estresse (Hetz, 2012) (Figura 5).

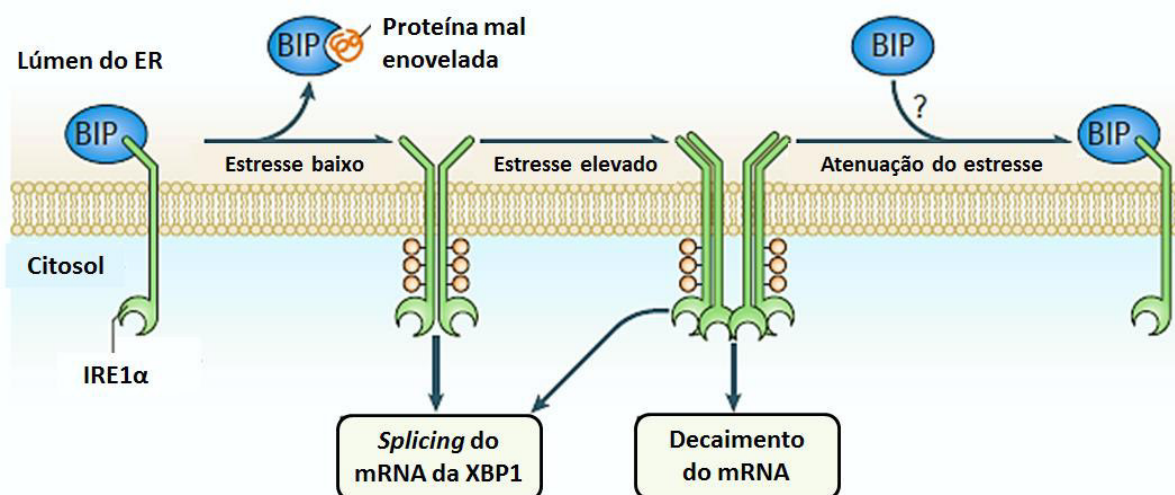


Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de ativação das proteínas sensores. No esquema encontra-se demonstrada a proteína sensor (Ire1 α) associada à Grp78 (BiP) e em estado de latência. Em situações de ERE, a Grp78 se dissocia da proteína sensor para promover chaperonamento, levando à autofosforilação e dimerização da proteína, ativando sua cascata de sinalização. Após ERE intenso e prolongado, as proteínas se replicam formando aglomerados. Com o fim do ERE, os aglomerados se dissociam e o Grp78 volta a se acoplar, inativando a proteína sensor. **Adaptado de:** Hetz (2012).

A Ire1 (isoformas α e β) é uma proteína transmembrana constituída por um domínio quinase e outro endoribonuclease e quando ativada se autofosforila e dimeriza, ativando alostericamente a atividade endonuclease no lúmen levando ao processamento de RNAm's que codificam o fator de transcrição nuclear proteína 1 de ligação à caixa X (Xbp1). Para se ativar a Xbp1 remove um íntron de 26 nucleotídeos, induzindo um *frame-shift* em sua tradução e criando um novo domínio C-terminal, resultando na expressão de um fator de transcrição mais ativo e estável, o Xbp1 *spliced*. Este fator ativo se transloca para o núcleo e aumenta a expressão gênica relacionada aos mecanismos de ERAD e chaperonas. A Xbp1 *spliced* também atua na síntese de fosfolípidos, importantes para a expansão da membrana durante o ERE. A Ire1 também está relacionada ao mecanismo de

decaimento regulado de RNAm Ire1 dependente (RIDD), que degrada de forma ativa um conjunto de RNAm's responsáveis pela codificação das proteínas aberrantes (Hetz *et al.*, 2013) (Figura 6).

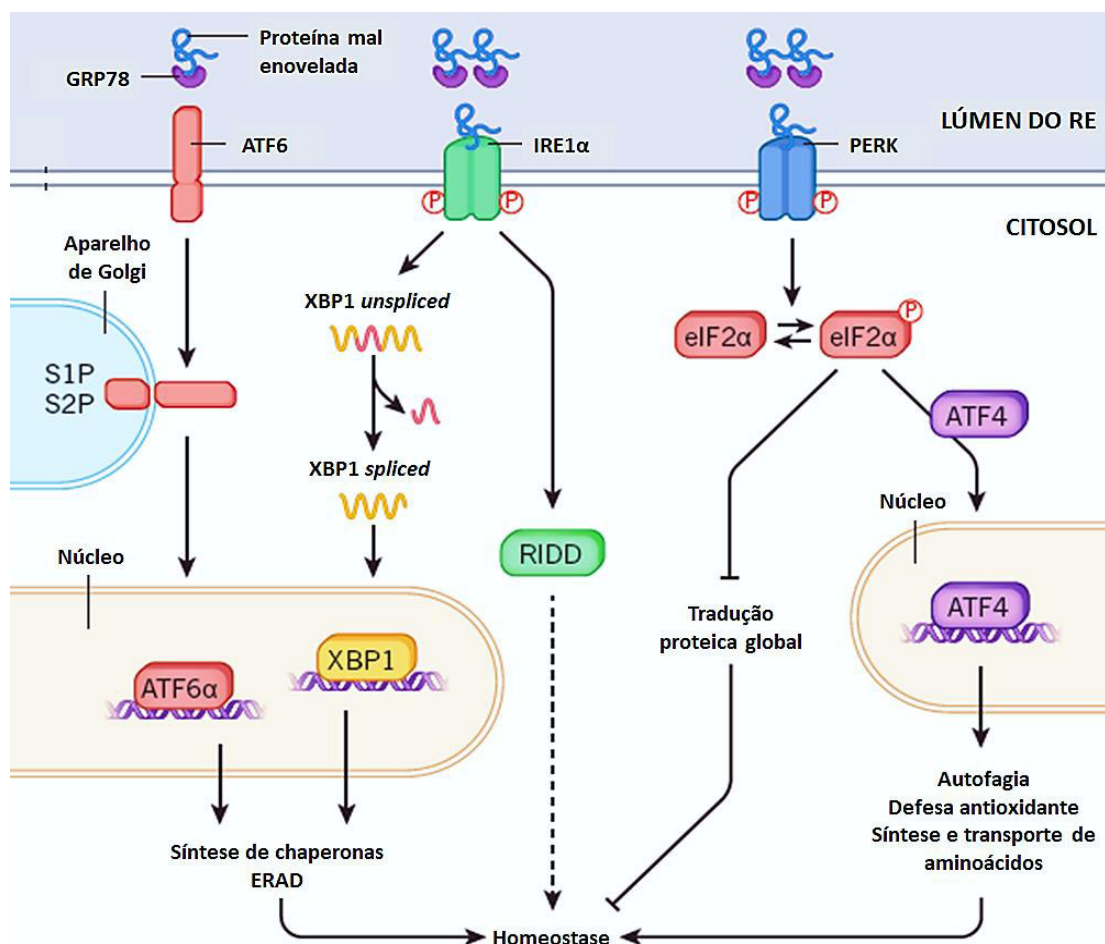


Figura 6. Cascata de sinalização adaptativa da UPR. A sinalização adaptativa da UPR é iniciada após a ativação paralela das proteínas sensores Atf6, Ire1α e Perk no RE. Em situações de ERE, relacionado ao acúmulo de proteínas mal enoveladas, as chaperonas Grp78 se desacoplam da porção luminal destas proteínas sensores para promover atividades de chaperonamento, e com isso, subsequentemente a cascata de sinalização adaptativa da UPR é ativada. Após ativação, o Atf6 é mobilizado para o aparelho de Golgi, onde é clivado pelas proteases SP1 e SP2, liberando um fator de transcrição ativo (Atf6f) que migra para o núcleo. A Ire1α ativada se autofosforila e dimeriza promovendo a codificação e *spliced* do fator de transcrição Xbp1, permitindo sua entrada no núcleo. Adicionalmente, a Ire1α ativa o mecanismo de RIDD, que degrada RNAm's aberrantes. Por fim, a Perk autofosforilada e dimerizada, promove o processo de fosforilação do fator eIF2α, que inibe a tradução global de proteínas e codifica o fator de transcrição Atf4, que também migra para o núcleo. No núcleo, os fatores Atf6f, Xbp1 *spliced* e Atf4, promovem em conjunto síntese de chaperonas, ativação da ERAD, autofagia, síntese de enzimas antioxidantes e transporte de aminoácidos, que somado a inibição da tradução global proteica e degradação de RNAm's aberrantes, garante a diminuição do estresse do retículo e retorno da homeostasia celular. **Adaptado de:** Wang e Kaufman (2012).

O Atf6 (isoformas α e β), após o desacoplamento da Grp78, interage com o complexo COPII e é translocado em vesículas para o aparelho de Golgi, onde é clivado por proteases (S1P e S2P) liberando um fator de transcrição ativo (Atf6f) que induz a expressão de genes que codificam os componentes da ERAD e de forma ainda não totalmente elucidada a Xbp1 (Santos *et al.*, 2009) (Figura 6). Estudos têm demonstrado que a ativação do Atf6 é mais seletiva quando comparada as outras proteínas sensores, ocorrendo principalmente em situações de diminuição da n-glicosilação e alterações redox (Maiuolo *et al.*, 2011)

A Perk é uma quinase seril-treonil e quando dissociada da Grp78 se dimeriza e induz por autofosforilação a ativação de seu domínio quinase. A ativação da Perk atenua a síntese geral de proteínas por meio da fosforilação da serina-51 da subunidade alfa do fator eucariótico iniciador de tradução 2 (eIF2 α). O eIF2 α também permite a tradução do RNAm que codifica o fator de transcrição Atf4, induzindo expressão gênica relacionada à ERAD, enovelamento de proteínas, metabolismo de aminoácidos e autofagia – mecanismo regulado pelos lisossomos de eliminação de agregados proteicos e organelas danificadas (Walter e Ron, 2011) (Figura 6).

A Perk também está relacionada à produção do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), fator de transcrição que regula a expressão de enzimas citoprotetoras mediante ligação ao elemento responsivo antioxidante (ARE), presente nas regiões promotoras de genes. A partir da interação do Nrf2 com o ARE, são expressas enzimas antioxidantes e de detoxificação de fase 2 em diferentes tecidos. Os genes que codificam as enzimas de detoxificação de fase II, glutathione-S-transferase, UDP-glucuronosil-transferase, epóxido hidrolase microssomal, entre outras; e as enzimas antioxidantes heme oxigenase-1, peroxirredoxina 1, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e tioredoxina podem ser regulados pelo Nrf2, fazendo dele um importante marcador da produção de enzimas antioxidantes (Surh *et al.*, 2009).

Embora todas as proteínas sensores se ativem ao mesmo tempo após o desacoplamento da Grp78, as vias de sinalização e respostas desencadeadas não ocorrem de forma simultânea e assim fases diferentes da UPR são moduladas por cada uma delas. O início da UPR é marcado pela ativação da Perk/eIF2 α e

consequente inibição da tradução proteica. Como o eIF2 α não depende de translocação ao núcleo para desencadear respostas, esta inibição ocorre rapidamente (cerca de 30 minutos após o desacoplamento) e o influxo de proteínas nascentes é interrompido, impedindo a saturação do lúmen (Novoa *et al.*, 2003). A seguir, temos ativação dos mecanismos de RIDD modulado pela fosforilação da Ire1 (Hollien *et al.*, 2009). O processo de clivagem do Atf6 se dá em paralelo à ativação da Perk, no entanto como são necessários processos de exportação da sensor, todas as respostas moduladas se dão em um momento posterior as respostas mediadas pelo eIF2 α (Okada *et al.*, 2002).

Em uma segunda etapa do processo de UPR é iniciada a síntese de proteínas chaperonas pelo Atf6f, resposta esta que será mantida posteriormente pela atividade da Xbp1 *spliced* advinda da sinalização da Ire1. Entre a produção de chaperonas e ativação da Xbp1, são desencadeadas respostas metabólicas, redox e de autofagia moduladas pela Perk/Atf4 (Ameri e Harris, 2008). Por fim, temos a degradação das proteínas mal enoveladas pelo mecanismo de ERAD modulado pela Xbp1 *spliced* e pelo Atf6f (Hetz, 2012) (Figura 7).

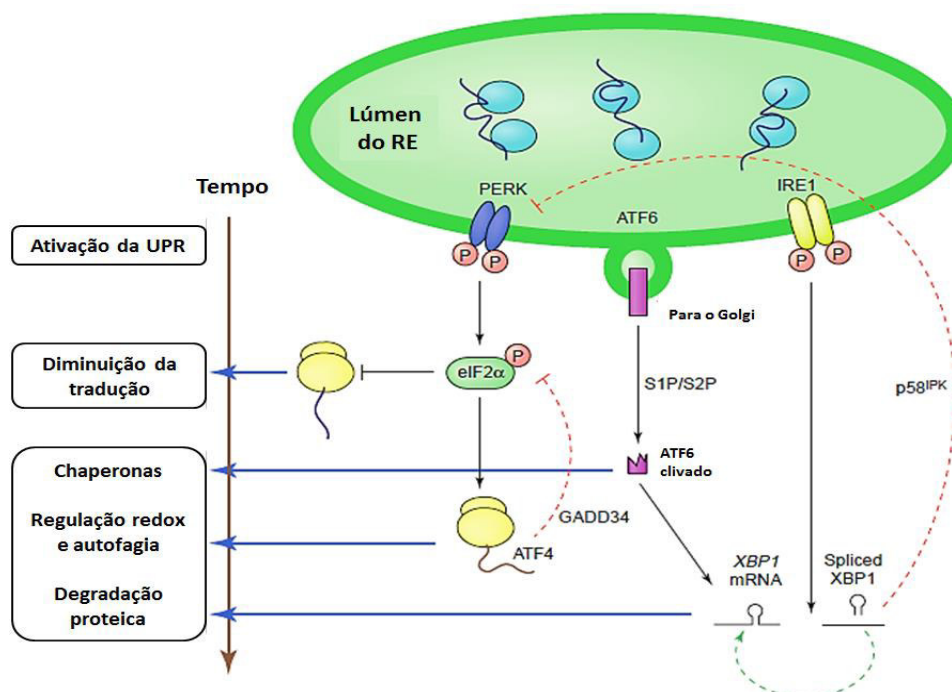


Figura 7. Ordem cronológica das respostas adaptativas da UPR. Mesmo com as proteínas sensores se ativando simultaneamente após o desacoplamento da Grp78, as respostas mediadas se dão de forma sequenciada. Inicialmente, temos atenuação da tradução modulada pelo eIF2 α , seguido da síntese de chaperonas pelo Atf6f, regulação redox e autofagia pelo Atf4 e ativação da ERAD pela Xbp1 *spliced*. **Adaptado de:** Rutkowski e Kaufman (2004)

Em conjunto, a Xbp1 *spliced*, Atf6f e o Atf4 regulam a expressão e a atividade de marcadores chave para o controle de danos relacionados ao ERE. No entanto, em condições onde este quadro de ERE é demasiadamente severo e/ou prolongado, a UPR pode não ser capaz de controlar a expansão de efeitos deletérios do lúmen para a célula. Nestas condições de ERE crônico, as mesmas proteínas sensores da UPR responsáveis por iniciar uma sinalização pró-adaptativa ao estresse podem iniciar uma sinalização pró-apoptótica, levando a uma morte celular precoce (Hetz, 2012).

2.4. Apoptose celular regulada pelo RE

Os mecanismos e mediadores intermediários envolvidos na sinalização pró-apoptótica da UPR ainda não são totalmente conhecidos, mas sabe-se que a morte celular precoce ocorre em decorrência da ativação de fatores finais desta sinalização, dentre eles: a quinase c-jun n-terminal (Jnk), o gene supressor tumoral p53 (p53), a proteína homóloga da C/EBP (Chop), espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS) e as enzimas caspases (Figura 8).

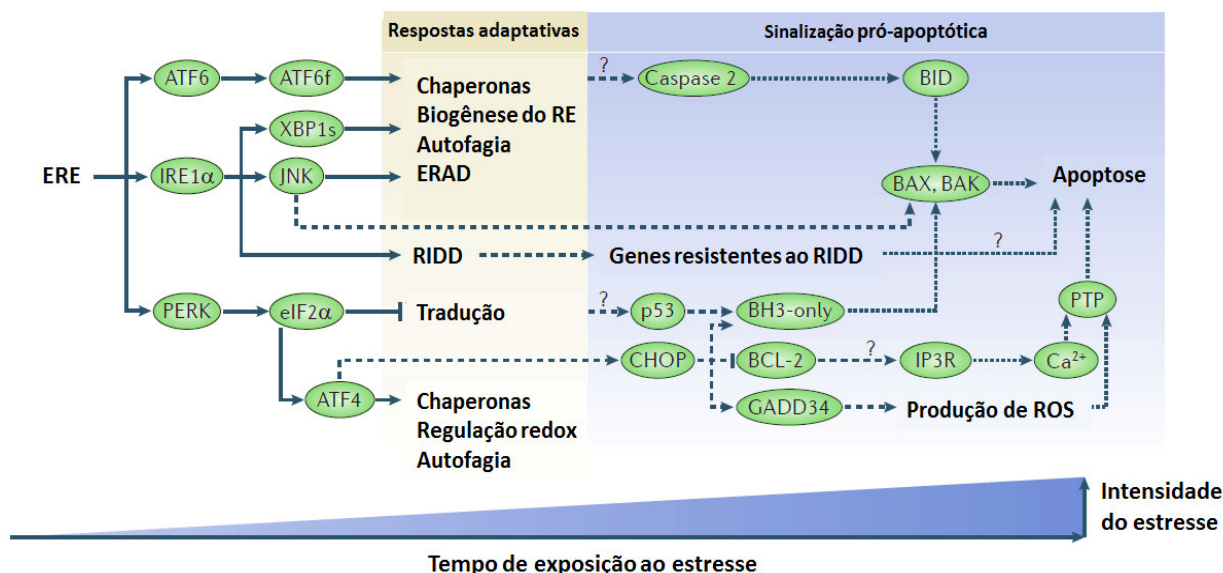


Figura 8. Destino celular em situações de manutenção do ERE. Em exposições iniciais ao ERE, temos ativação das proteínas sensores da UPR (Ire1α, Perk e Atf6) e subsequentemente de seus produtos ativos (Atf6f, Xbp1 *spliced*, elf2α e Atf4), que iniciam diversas respostas adaptativas ao estresse. Na manutenção crônica do ERE, as proteínas sensores iniciam uma sinalização pró-apoptótica marcada pelas produções da Chop, Jnk, p53 e caspases, que inibem marcadores anti-apoptóticos (Bcl2), expressam marcadores pró-apoptóticos (Bax, Bak, Bh3-only, Bid), interferem na homeostase do cálcio e produzem espécies reativas de oxigênio (ROS), levando a apoptose precoce da célula. **Adaptado de:** Hetz (2012).

O processo de apoptose se inicia a partir de um “desbalanço” entre fatores pró-apoptóticos (Bh3-*only*, Bax, Bak, Bim, Puma e Noxa) e fatores anti-apoptóticos (Bcl2, Bcl-xl e Bcl2-l2). No ERE, os fatores pró-apoptóticos são recrutados à superfície do RE, aumentam o Ca^{+2} citosólico e iniciam a rota das caspases; em contrapartida os fatores anti-apoptóticos atuam controlando este recrutamento (Woehlbier e Hetz, 2011).

Em situações de ERE crônico, a Ire1 pode interagir com o fator-2 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF2), uma proteína adaptadora que acopla a quinase reguladora de sinal de apoptose 1 (ASK1), resultando na formação do complexo ternário Ire1/TRAF2/ASK1, que por sua vez ativa a Jnk. A Jnk ativada de forma indireta pela Ire1 pode suprimir a ativação da Bcl2, com consequente aumento da expressão de Bax e Bak, além de degradar, por meio da RIDD, RNAm's-chave para o processo de enovelamento. De forma ainda desconhecida, o gene p53 atua aumentando a expressão do Bh3-*only*, Puma e Noxa em situações de ERE (Hetz *et al.*, 2013).

A Chop, um dos principais marcadores apoptóticos relacionados à ERE, é expressa a partir da ativação da Perk por intermédio do Atf4 e do Atf6 (mecanismo ainda não elucidado) e é responsável por várias ações, dentre elas: 1) supressão da Bcl2; 2) aumento da expressão de BH3-*only*; 3) aumento da expressão do indutor 34 de dano ao DNA (Gadd34), que inibe a fosforilação do eIF2 α e promove o retorno da tradução proteica, produção de ROS e perda da homeostase do Ca^{2+} ; 4) ativação da sinalização das caspases; 5) e acidificação do pH do RE por ativação da anidrase carbônica VI. Em situações de ERE prolongado, a Chop atua inibindo a produção do Grp78 por *feedback* negativo (Rutkowski *et al.*, 2006; Malhotra e Kaufman, 2007).

Em decorrência da grande interação existente entre o RE e mitocôndrias, a expressão do Gadd34 promove aumento da produção de ROS na mitocôndria. O excesso de ROS oxida tióis dos canais de rianodina do RE, causando sua inativação e permitindo liberação de Ca^{2+} pelo RE de forma desordenada, ameaçando a sobrevivência celular. Adicionalmente, por mecanismos de *feedback* positivo, este Ca^{2+} liberado progressivamente aumenta a produção de ROS na mitocôndria, desencadeando a abertura dos poros de transição de permeabilidade (PTP), levando a inchamento osmótico mitocondrial, perda da homeostase de cálcio (que já

se encontra prejudicada) e liberação de proteínas pró-apoptóticas (Favero *et al.*, 1995; Jacobson e Duchen, 2002).

As caspases são uma família de endoproteases com capacidade de gerar moléculas de sinalização que iniciam processos de apoptose, sendo divididas em caspases iniciadoras e efetoras. Em situações de ERE, o Bh3-*only* (modulado pela Chop) aumenta a expressão do Bax e Bak que se encontram na membrana do RE colocalizados com a caspase 12 (caspase 4 em humanos), alterando a permeabilidade da membrana e ativando a caspase 12. A caspase 12 (iniciadora) ativada se transloca para o citosol, onde promove a clivagem da caspase 9, que por sua vez, ativa a caspase 3 (efetora), levando a morte celular (Figura 9).

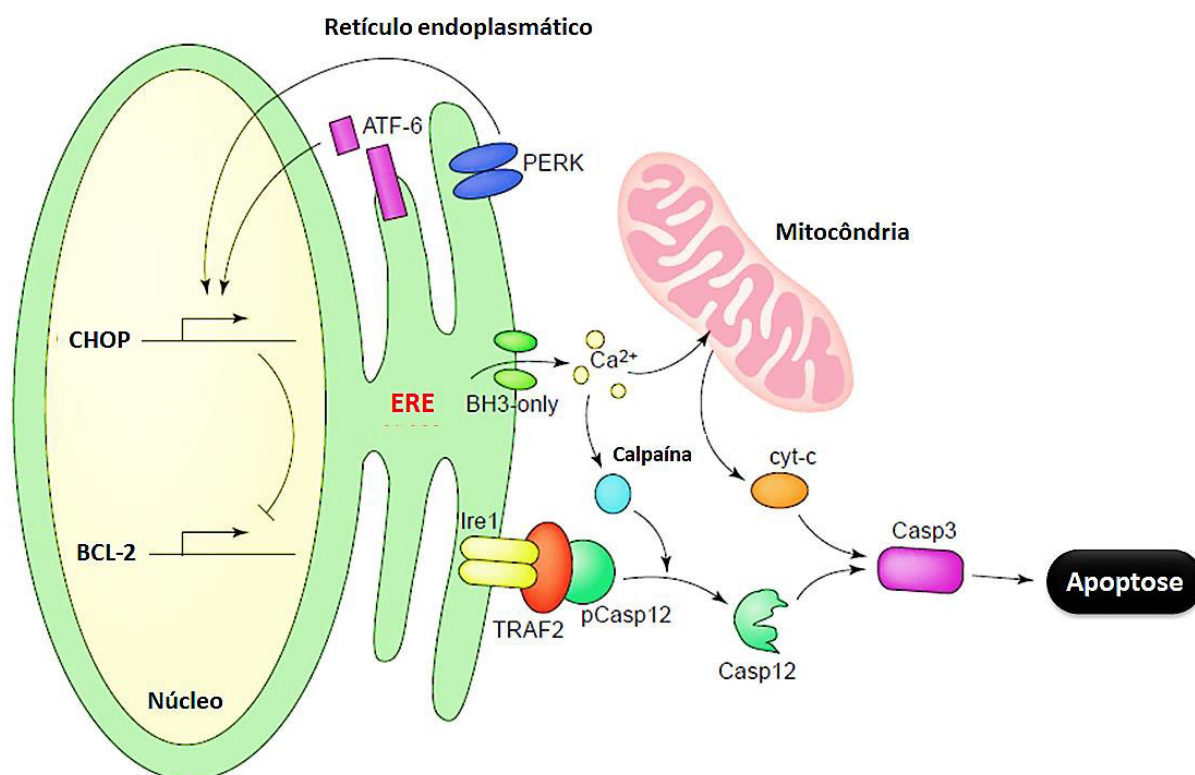


Figura 9. Sinalizadores apoptóticos no ERE. Em situações de ERE temos Perk e o Atf6 promovendo a expressão da Chop, que atua diretamente na inibição do Bcl2 (ação anti-apoptótica) e expressão do Bh3-*only* (pró-apoptótico). A interação da Ire1 com a TRAF2 promove a expressão da Jnk e consequente ativação da pró-caspase 12 e liberação de sua fração ativa (iniciadora da apoptose) para o citosol. A perda da homeostase do cálcio no retículo também possui um papel importante para o desacoplamento da caspase 12 e para a liberação de fatores apoptóticos mediados pela mitocôndria. Todos estes fatores pró-apoptóticos promovem a ativação da Caspase 3 (efetora) para desencadear a apoptose e morte celular. **Adaptado de:** Rutkowski e Kaufman (2004).

Ainda não são conhecidos todos os marcadores intermediários responsáveis pela transição da sinalização de respostas adaptativas para um quadro geral de

sinalização apoptótica. Em suma, experimentos que visam mimetizar ERE *in vitro* demonstram que os fatores de adaptação e mecanismos de ERAD são expressos na célula de forma concomitante com marcadores de morte celular (Hetz, 2012). Embora sejam estruturalmente semelhantes e possuam tempos de ativação próximos, as expressões de Ire1 e Perk estão relacionadas a este período de transição. Na fase adaptativa têm-se um aumento das expressões da Ire1 e Perk e subsequentemente todos os fatores e respostas relacionadas, contudo em condições de manutenção do ERE a expressão da Ire1 começa a diminuir (modulação negativa relacionada aos fatores PP2A, RACK1 e BI-1) enquanto a expressão da Perk e de fatores apoptóticos relacionados (Chop e Gadd34) se mantêm sustentados (Figura 10) (Lin *et al.*, 2009; Woehlbier e Hetz, 2011).

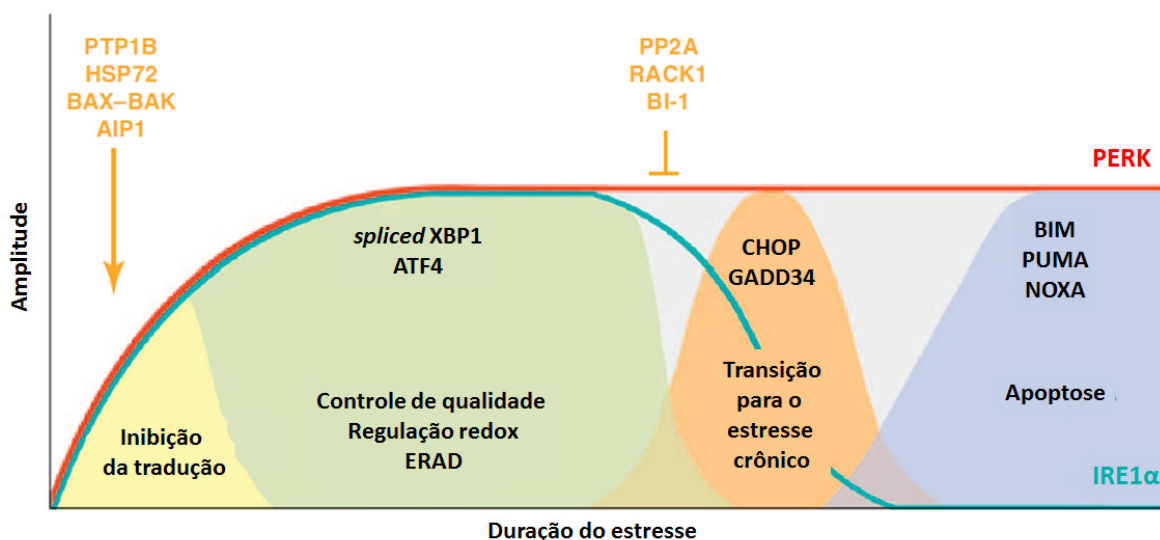


Figura 10. Cinética da UPR e apoptose celular. Nas fases iniciais do acúmulo de proteínas *misfolded* temos ativação das proteínas sensores da UPR (Ire1, Perk e Atf6) e imediatas respostas de inibição da tradução proteica, destruição de RNAm's e autofagia. Em uma segunda fase da UPR, fatores de transcrição secundários são ativados (Xbp1 *spliced*, Atf4 e Atf6f) para manutenção do controle de qualidade do RE, defesa redox e ERAD. Em condições de manutenção do ERE por um período mais prolongado (estresse crônico), inicia-se uma fase de transição da UPR, onde a Ire1 começa a diminuir sua expressão e a Perk mantém sua expressão elevada com consequente aumento da Chop e Gadd34. Por fim, a célula entra no quadro de apoptose mantido pela expressão dos marcadores pró-apoptóticos (Bim, Puma e Noxa). **Adaptado de:** Woehlbier e Hetz (2011).

Condições de ERE intenso e crônico podem ativar paralelamente processos de necrose celular, caracterizado por uma morte celular desorganizada com intenso fluxo de íons, inchamento mitocondrial e celular, ruptura não específica do DNA e da membrana celular (Majno e Joris, 1995). A calpaína é elencada como um mediador

intermediário que ativa processos necróticos e também favorece a apoptose regulada pelas enzimas caspases (Wang, 2000).

A calpaína constitui uma série de isoformas de proteases tílicas dependentes de cálcio, que em situações de perda da homeostasia do cálcio na célula (em situações de ERE, por exemplo) são responsáveis por promover proteólise da membrana lisossomal e extravasamento de seu conteúdo citoplasmático, incluindo as catepsinas lisossomais, acarretando em proteólise celular generalizada e morte celular de forma dependente ou independente da ativação das caspases (Yamashima, 2000; Syntichaki e Tavernarakis, 2003) (Figura 11).

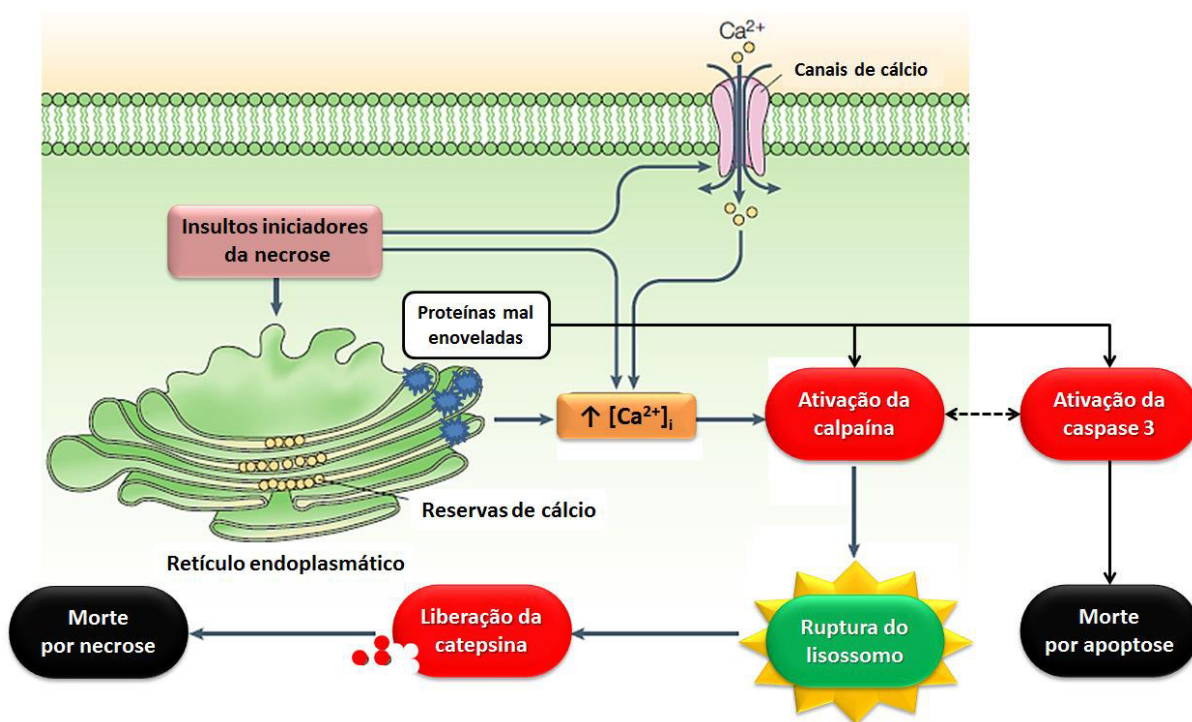


Figura 11. Necrose mediada por calpaína. Insultos indutores de necrose promovem aumento do influxo de cálcio e/ou liberação das reservas de cálcio do RE, levando ao aumento dos níveis de cálcio intracelular que ativa a calpaína. A calpaína promove processo de proteólise do lisossomo e liberação da catepsina, que inicia o processo de necrose/morte celular. A calpaína também pode levar à ativação da caspase 3 e vice-versa. Adicionalmente, o ERE pode perturbar a homeostase do cálcio e ativação da calpaína e caspases. **Adaptado de:** Syntichaki e Tavernarakis (2003).

Ativação de calpaína é encontrada em isquemias cerebrais, gliomas cerebrais e doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington. De forma importante, a calpaína também é responsável por promover clivagem e inativação da enzima poli (ADP-ribose) polimerase-1 (Parp-1),

responsável direta por processo de reparo do DNA, transcrição, remodelamento vascular, regulação da função de astrócitos e micróglia, consolidação de memórias e controle da senescência (CHAITANYA *et al.*, 2010).

2.5. UPR na regulação fisiológica de atividades celulares

Uma série de evidências tem demonstrado o importante papel da sinalização da UPR sobre diversos processos fisiológicos de diferenciação celular, imunidade inata e metabolismo energético (Hetz, 2012; Wang e Kaufman, 2012). Durante todo processo de diferenciação celular, especialmente no momento de expansão do RE, temos uma constante ativação da UPR, atuando na modulação de todo processo (Shen *et al.*, 2004). Por exemplo, a expansão do RE durante o processo de diferenciação de células B para células plasmáticas produtoras de anticorpos se dá basicamente com uma manutenção ativa da sinalização da UPR (especialmente da Ire1 α /Xbp1), presumivelmente para lidar com o aumento da via secretória gerada pela síntese de imunoglobulinas (Iwakoshi *et al.*, 2003).

Camundongos *knockout* para Ire1 e Xbp1 apresentaram falhas no processo de diferenciação de células B maduras para células plasmáticas, e curiosamente, estas mesmas falhas não foram observadas em deleções de Atf6 α , Perk e eIF2 α , evidenciando uma ativação seletiva dos sensores da UPR e suas funções distintas em diferentes tipos celulares (Reimold *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005). Parece lógico que o aumento da síntese de imunoglobulinas gere uma sobrecarga do RE, instaurando desta forma ERE e subsequente ativação da UPR, no entanto estudos demonstram que a ativação da Ire1 e Xbp1 ocorre antes da sobrecarga do RE, atuando no preparo da via secretória (Iwakoshi *et al.*, 2003).

A via da Perk também contribui para processos de diferenciação celular. Adipócitos, por exemplo, têm sua diferenciação inibida após aumento da expressão de Chop, via Perk/eIF2 α . Isto se dá provavelmente pela capacidade da Chop de inibir a família de fatores de transcrição C/EBP, os quais são necessários para os processos de diferenciação em adipócitos (Han *et al.*, 2013). A via Perk/eIF2 α também está envolvida na diferenciação de outros tipos celulares, tais como na

proliferação de células de músculo liso vascular e no processo de transição epitélio-mesenquimal (Feng *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2015).

A Xbp1 possui uma importante contribuição sobre a imunidade inata, visto que ela atua como um importante fator de transcrição nuclear após exposição de células à citocina inflamatória interleucina-6 (IL-6) (Martinon *et al.*, 2010). Deleções da Xbp1 em camundongos e *C. elegans* suprimem a capacidade desses animais de combater patógenos bacterianos (Martinon e Glimcher, 2011). Exposição a lipopolissacarídeo, um estímulo pró-inflamatório, desencadeia uma maior produção/ativação da Xbp1 para aumentar a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, especialmente a IL-6 (Martinon *et al.*, 2010). De forma semelhante ao processo de diferenciação celular de células B, o envolvimento dos sensores Perk e Atf6 em condições pró-inflamatórias parece ser irrelevante e a estimulação da Ire1/Xbp1 ocorre de forma independente de condições de ERE (Martinon *et al.*, 2010).

A UPR é crucial para o monitoramento de flutuações dos níveis circulantes de glicose, especialmente a partir de seu papel ativo sobre o processo de enovelamento, maturação e secreção da insulina (Wagner e Moore, 2011). Camundongos com deleções da Perk e mutações do sítio de fosforilação da eIF2 α possuem um metabolismo da glicose desregulado, enquanto que deleções da Perk, Ire1 α , Atf6, Xbp1 e eIF2 α em células β -pancreáticas, acarretam em redução da síntese e secreção de insulina, hiperglicemia e aceleração de morte celular (Scheuner *et al.*, 2001; Back *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2012; Usui *et al.*, 2012).

Ativação da sinalização da UPR é observada nas células β -pancreáticas em resposta a variações glicêmicas, com o objetivo de potencializar a produção de insulina (Wagner e Moore, 2011). Em situações de elevação glicêmica aguda, observa-se uma ativação da Ire1, enovelamento de pró-insulina e subsequente aumento da produção de insulina, sem aumento de *splicing* da Xbp1, fosforilação da Jnk e dissociação da Grp78. Posteriormente, esta resposta aguda leva à formação de um complexo constituído por Ire1, receptor da proteína C-quinase 1 ativada (RACK1) e proteína fosfatase 2A (PP2A). Este complexo formado inibe, por *feedback* negativo, o processo de fosforilação da Ire1, prevenindo desta forma, uma produção excessiva de insulina (Qiu *et al.*, 2010). Camundongos *knockout* para Ire1 apresentam hipoinsulinemia e hiperglicemia (Iwawaki *et al.*, 2010). Entretanto, em

situações de exposição crônica a elevadas concentrações de glicose, observa-se uma incapacidade de formação do complexo Ire1/RACK1/PP2A, mantendo desta forma um contínuo processo de fosforilação da Ire1, perda da homeostase do eixo glicose/insulina e posterior ativação da Jnk, com consequente apoptose celular precoce (Lipson *et al.*, 2006; Lipson *et al.*, 2008)

A inibição da sinalização mediada pela Ire1 e eIF2 α em hepatócitos, interfere diretamente sobre a produção hepática de glicose, em virtude da redução da expressão de genes que codificam enzimas gliconeogênicas (Birkenfeld *et al.*, 2011). O Atf4 por meio da modulação da atividade transcricional da proteína *forkhead box O1* (FOXO1) também atua aumentando a gliconeogênese (Li *et al.*, 2015). Por outro lado, aparentemente o Atf6 atua reduzindo a gliconeogênese hepática, via inibição do ligante do elemento de resposta ao AMP-cíclico (CREB) (Wang *et al.*, 2009). Os níveis de colesterol e triglicerídeos plasmáticos também são influenciados pela atuação da Xbp1, que interfere sobre genes-chave da lipogênese hepática (Lee *et al.*, 2008).

Adicionalmente, a Xbp1 contribui de forma marcante para a atividade do trato gastrointestinal, visto que atua na modulação de células secretórias, tais como células principais gástricas, células acinares, glândulas salivares e células de Paneth (Harding *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2005; Huh *et al.*, 2010).

2.6. UPR na regulação fisiológica do sistema nervoso central

Neurônios são particularmente células muito sensíveis ao ERE e mesmo com mínimas flutuações da homeostase do RE, respostas pró-apoptóticas já podem ser desencadeadas. No entanto, uma série de dados tem demonstrado um importante papel da sinalização da UPR na modulação fisiológica de diversas atividades neuronais, como a cognição (processos de aprendizado e memória), plasticidade, neurogênese, regulação neuro-endócrina e ritmo circadiano (Hetz e Mollereau, 2014).

Estudos demonstram que a fosforilação do eIF2 α mediada pela ativação da Perk ou de forma independente do ERE (por meio dos fatores GCN2 e PKR) acarretam na ativação do Atf4 e posterior inibição do CREB, reduzindo assim a

propagação de potenciais sinápticos de longa duração, a expressão de genes envolvidos na plasticidade sináptica e consolidação de memórias de curto prazo (Costa-Mattioli *et al.*, 2005; Costa-Mattioli *et al.*, 2007) (Figura 12).

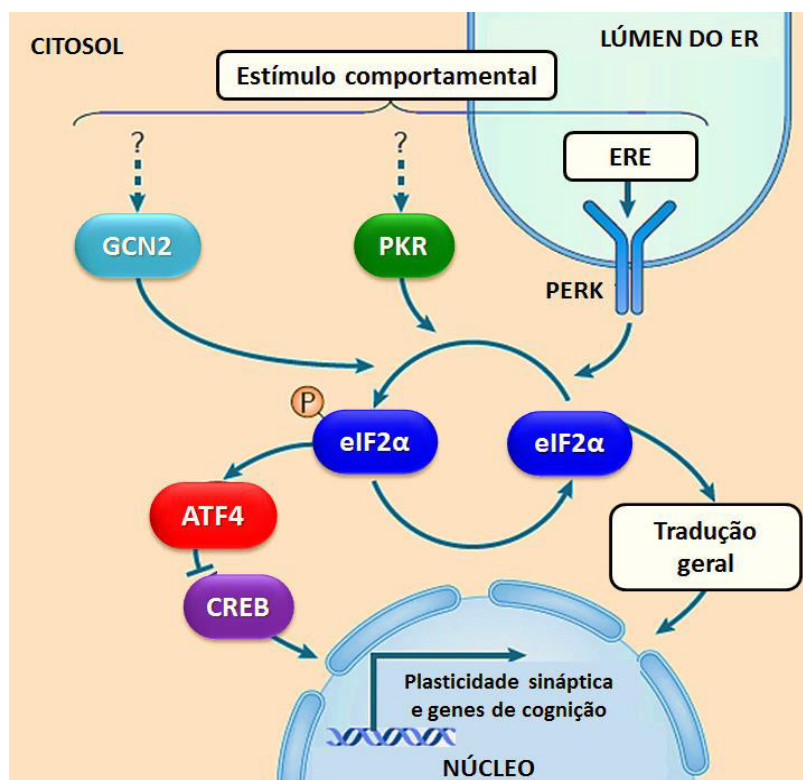


Figura 12. Atuação da UPR na expressão de genes relacionados à plasticidade neuronal e consolidação de memórias. Situações de estresse comportamental por mecanismos ainda desconhecidos desencadeiam a fosforilação do eIF2α, via ativação da Perk em situações de ERE ou pelas quinases PKR e GCN2. O eIF2α em sequência ativa o Atf4, que inibe o CREB e com isso reduz a expressão de genes relacionados a plasticidade sináptica e processos cognitivos. **Adaptado de:** Hetz e Mollereau (2014).

O fator neurotrófico derivado do cérebro (Bdnf), um dos principais fatores de neurogênese, diferenciação e plasticidade neuronal, exerce suas funções ao interagir com os receptores p75 e TRKB em situações de estresse comportamental ou gênese do SNC (Noble *et al.*, 2011). De forma ainda não clara, estes receptores agem estimulando fosforilação na porção citosólica da Ire1 e processos de *spliced* da Xbp1, induzindo desta forma a expressão de genes de diferenciação neuronal e plasticidade hipocampal (Hayashi *et al.*, 2007) (Figura 13). A Xbp1 também tem sido mencionada como um mediador importante para a expressão e tráfego para a membrana de receptores glutamatérgicos e gabaérgicos (Shim *et al.*, 2004; Hayashi *et al.*, 2008).

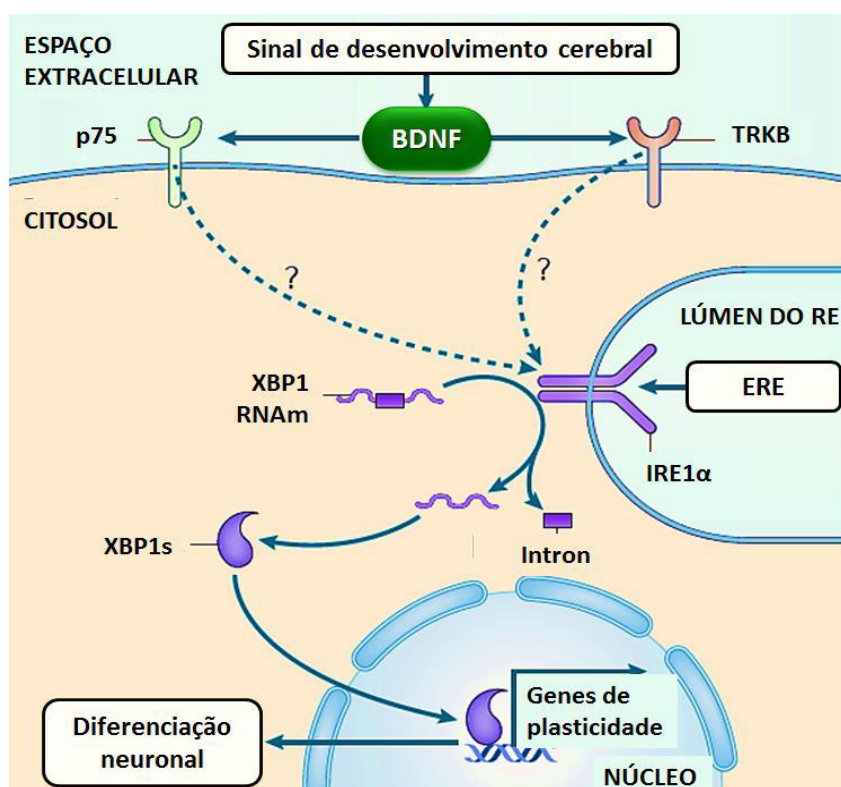


Figura 13. UPR em processos de neurogênese e diferenciação neuronal. Situações de estresse comportamental ou crescimento neural induzem a produção do fator neurotrófico derivado do cérebro (Bdnf), que ao entrar em contato com os receptores p75 e/ou TRKB, ativa o processo de *splicing* da Xbp1 via Ire1 α . A fração ativa da Xbp1 no núcleo induz a transcrição de genes relacionados à plasticidade e diferenciação neuronal. **Adaptado de:** Hetz e Mollereau (2014).

A Xbp1 parece exercer um papel importante na regulação de atividades dos núcleos hipotalâmicos. Deleção da Xbp1 no hipotálamo de camundongos acarretou em estado de ERE hipotalâmico com consequente bloqueio da ação da leptina seguida de resistência ao hormônio (Ozcan *et al.*, 2009). Schneeberger *et al.* (2013) demonstraram que a Xbp1 atua na modulação positiva da sinalização de leptina, contribuindo para a regulação da ingestão calórica e gasto energético do organismo (Figura 14). Ainda em nível hipotalâmico (núcleo anterior), a Xbp1 e as proteínas de choque térmico (HSP) também demonstraram ter grande relevância para a expressão de genes relacionados à modulação do ritmo circadiano do ciclo sono/vigília (Hatori *et al.*, 2011).

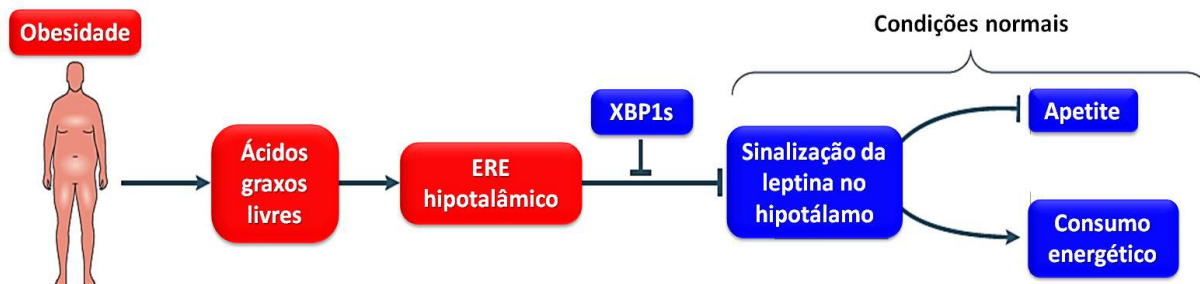


Figura 14. Atuação da Xbp1 na supressão da resistência à leptina no hipotálamo. Dislipidemia aterogênica leva a um desbalanço oxidativo gerando ERE hipotalâmico e consequente resistência à leptina, acarretando em uma menor saciedade e maior consumo energético. A Xbp1 *spliced* atua mitigando os efeitos deletérios do ERE e da resistência à leptina associada. **Adaptado de:** Hetz e Mollereau (2014).

2.7. Contribuições do ERE para o desenvolvimento de patologias

A manutenção de uma prolongada e intensa condição de estresse celular prejudica todo controle de qualidade do RE, proporcionando acúmulo de proteínas aberrantes que tendem a se depositar no interior das células e interagir com vários alvos celulares, induzindo toxicidade (Hetz *et al.*, 2013). O acúmulo de proteínas e disfunções na sinalização adaptativa mediada pela UPR perturba a homeostase do RE, contribuindo expressivamente para a instauração e progressão de diversas patologias de importância clínica, como por exemplo, doenças neurodegenerativas, disfunções metabólicas, neoplasias e cardiopatias (Park e Ozcan, 2013). Nos tópicos a seguir, alguns estudos serão levantados demonstrando o envolvimento do ERE e perda de sinalização da UPR no desenvolvimento destas patologias.

2.7.1. Doenças neurodegenerativas

Uma variedade de distúrbios neuronais está relacionada a mutações em genes que codificam proteínas que interferem na modulação da maquinaria do controle de qualidade do RE e não sofrem degradação proteassomal com facilidade, acarretando na formação e acúmulo de agregados proteicos mal enovelados. Doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (DA), Parkinson (DP), Huntington (DH), doença priônica (DPR) e esclerose amiotrófica lateral (EAL) são exemplos de distúrbios com etiologias e sintomatologias diferentes, no entanto relacionadas ao depósito progressivo de agregados proteicos aberrantes no interior

de neurônios e/ou células da glia, formando corpos de inclusão ou emaranhados proteicos com tendência à toxicidade e morte celular (Bernales *et al.*, 2012).

A DA é uma demência senil caracterizada inicialmente por prejuízos na consolidação de memórias de curto prazo e que, progressivamente, afeta o comportamento e demais funções cognitivas. As características neuropatológicas da DA incluem depósitos extracelulares de agregados de peptídeos β -amilóide ($A\beta$) e emaranhados neurofibrilares de proteína TAU hiperfosforilada (Serrano-Pozo *et al.*, 2011). A DP está relacionada à perda seletiva de neurônios dopaminérgicos dos núcleos da base levando a severo e progressivo comprometimento motor e, em longo prazo, a perdas cognitivas. Achados histopatológicos da DP são caracterizados principalmente pela presença dos agregados proteicos de α -sinucleína conhecidos como corpúsculos e neuritos de Lewy (McKeith e Mosimann, 2004).

DH é uma doença autossômica dominante fatal que surge a partir de agregados da proteína huntingtina com longas cadeias de poliglutamina codificadas. O acúmulo destes agregados está relacionado a efeitos neurotóxicos na zona nigro-estriatal com anormalidades motoras (movimentos coreiformes) e demência precoce (juvenil a meia-idade) (Vidal *et al.*, 2012). DPR's são encefalopatias espongiformes transmissíveis caracterizadas por síndrome cerebelar, acompanhada de sinais piramidais, extra-piramidais e declínio cognitivo, que podem evoluir para demência grave. Sua patogênese está relacionada à mudança conformacional da proteína priônica para sua forma amiloidogênica, que é resistente a proteases e tende a formar agregados proteicos (Poggiolini *et al.*, 2013). A EAL (também conhecida como doença de Lou-Gehrig) é caracterizada por paralisia muscular com progressiva degeneração neuronal do córtex motor primário, trato corticoespinal, tronco encefálico e medula espinal. A etiologia da doença está relacionada a mutações na enzima superóxido dismutase-1 (SOD-1), no gene TDP-43 e/ou na proteína FUS, levando ao acúmulo de agregados proteicos (Wijesekera e Leigh, 2009).

Como evidenciado, o acúmulo de proteínas mal enoveladas e o consequente estado de ERE são características comuns a diversas doenças neurodegenerativas e as respostas celulares são determinadas de acordo com a natureza da proteína e

sua distribuição no organismo. No entanto, a contribuição real do ERE para o surgimento e/ou progressão dos distúrbios ainda não foi totalmente explicado, especialmente devido ao fato de alguns marcadores-chave de doenças neurodegenerativas não se encontrarem co-localizados com os marcadores de ERE, sugerindo uma relação de danos indireta (Hetz e Mollereau, 2014). A tabela 2 relaciona o envolvimento do ERE com doenças neurodegenerativas e as proteínas-chave determinantes para a instauração do quadro patológico.

Os agregados e proteínas mutantes das doenças neurodegenerativas podem afetar a homeostase do RE das mais diversas formas, como interferência na atividade de chaperonas, prejuízo do mecanismo de ERAD, tráfego de proteínas, interferência direta sobre a UPR e perda de homeostase do cálcio (Hetz e Mollereau, 2014).

Os agregados de α -sinucleína (DP) e SOD-1 (EAL) podem “sequestrar” as proteínas Grp78 e Pdi, interferindo assim em suas atividades de chaperonamento (Kikuchi *et al.*, 2006; Colla, Jensen, *et al.*, 2012). De forma ainda desconhecida, a parkina-9 (DP), proteínas priônicas (PRP) e FUS (EAL) interferem na capacidade da Pdi de formar pontes de dissulfeto (Farg *et al.*, 2012; Xu e Zhu, 2012). Aumento da produção de ROS com nitrosilação da Pdi também foram descritas na DA, DP e EAL (Uehara *et al.*, 2006). (Figura 15).

Tabela 2. Estresse do retículo endoplasmático e seu papel no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas

Patologia	Proteína-alvo	Envolvimento do ERE	Referências
Doença de Alzheimer	Proteína β -amilóide (A β), proteínas TAU hiperfosforilada, ApoE e presenilinas 1 e 2	A expressão de Aβ e TAU hiperfosforiladas estão relacionadas a: - Expressão da pPerk, plre1, pelF2α e Xbp1 <i>spliced</i> - Aumento da expressão de Pdi e alteração da Grp78 - Diminuição do mecanismo de ERAD - Expressão da Jnk, Chop, Gadd34 e clivagem das caspases 3, 4 e 12 A expressão da ApoE está relacionada a: - Aumento da expressão da Ire1, Perk, Atf6, Xbp1, chaperonas (GRP 78, GRP 94 e Pdi), Gadd34 e Chop	(Hoozemans <i>et al.</i> , 2009; Zhong <i>et al.</i> , 2009; Lee, D. Y. <i>et al.</i> , 2010; Lee, J. H. <i>et al.</i> , 2010; Yoon <i>et al.</i> , 2012; Abisambra <i>et al.</i> , 2013)
Doença de Parkinson	Corpúsculos e neuritos de Lewy (α -sinucleína e parkina)	A expressão de α-sinucleína ou parkina estão relacionadas a: - Aumento da expressão de Perk/eIF2α/Atf4 e Atf6 - Diminuição da ERAD e do sistema ubiquitina/proteassoma - Expressão da Chop, Jnk e clivagem da caspase 12 - Alteração da expressão de Grp78 (aumento ou diminuição) - Inibição dos canais SOCE (moduladores de Ca²⁺)	(Ryu <i>et al.</i> , 2002; Holtz e O'malley, 2003; Schintu <i>et al.</i> , 2009; Bouman <i>et al.</i> , 2011; Egawa <i>et al.</i> , 2011; Colla, Coune, <i>et al.</i> , 2012)
Esclerose amiotrófica lateral	Superóxido dismutase-1 e FUS	- Prejuízos no chaperonamento - Redução da expressão dos componentes da ERAD	(Duennwald e Lindquist, 2008; Farg <i>et al.</i> , 2012)
Doença de Huntington	Huntingtina	A expressão de huntingtina está relacionada a: - Ativação da Perk/eIF2α - Expressão da Chop - Aumento de autofagia	(Vidal <i>et al.</i> , 2012; Leitman <i>et al.</i> , 2014)
Doença priônica	Proteínas priônicas (PRP)	Os agregados de PRP estão relacionados a: - Ativação da Perk/eIF2α e inibição da tradução proteica - Expressão de Grp78, Grp94 e Erp57 - Perda da homeostase do Ca²⁺	(Yoo <i>et al.</i> , 2002; Torres <i>et al.</i> , 2010; Moreno <i>et al.</i> , 2012)

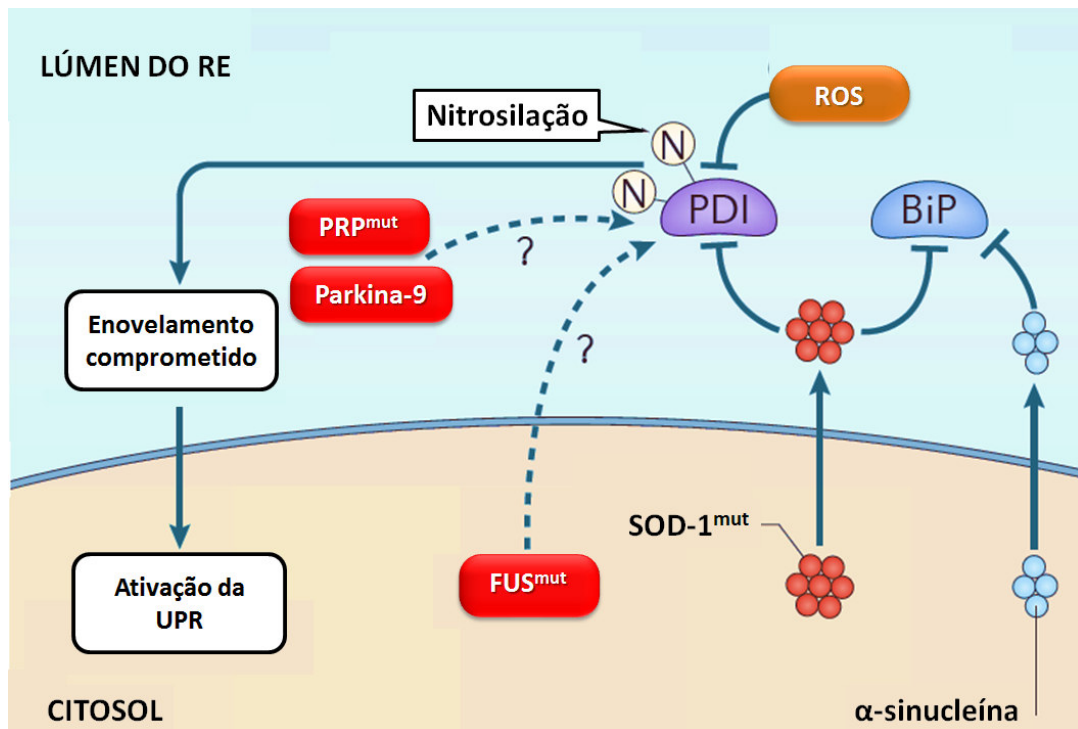


Figura 15. Interferência de proteínas mutantes sobre a atividade de chaperonas. Proteínas mutantes (PRP, parkina-9 e FUS) e agregados de proteínas mal enoveladas (α -sinucleína e SOD-1) atuam inibindo a atividade de chaperonas luminais (BiP e Pdi), interferindo no processo de enovelamento. Espécies reativas de oxigênio (ROS) promovem nitrosilação de chaperonas comprometendo sua atuação normal. **Adaptado de:** Hetz e Mollereau (2014).

A SOD-1, huntingtina, proteínas TAU hiperfosforiladas e agregados de α -sinucleína interferem na degradação proteassomal (via ERAD) ao interferir no translocamento das proteínas mal enoveladas do RE para o citosol (Duennwald e Lindquist, 2008; Yang *et al.*, 2010; Abisambra *et al.*, 2013) (Figura 16).

O tráfego de proteínas do RE para o aparelho de Golgi também pode ser prejudicado, impedindo total maturação das proteínas. Na DP, a α -sinucleína e a ATP13-A2 interagem com as proteínas de transporte vesicular e fusão de membranas (RAB1 e SNARE) interferindo negativamente no ancoramento de vesículas; e na EAL, a expressão da proteína VAPB mutante atua inibindo sua versão normal, que funciona como uma importante intermediária da fusão vesicular (YIF1A) (Thayanidhi *et al.*, 2010; Cooper, 2013) (Figura 17).

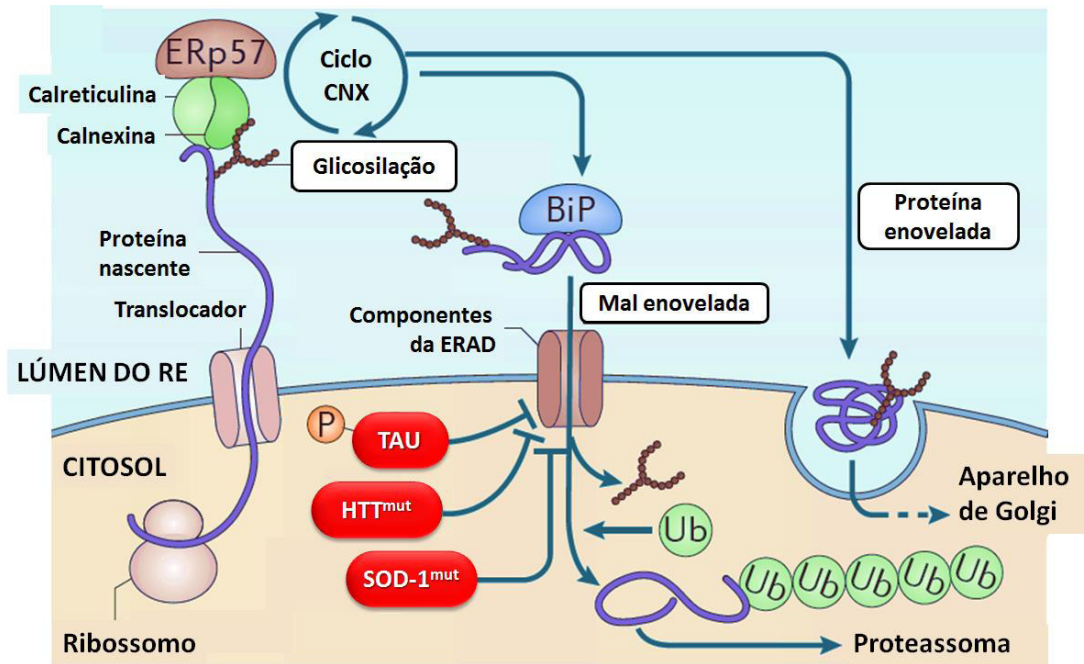


Figura 16. Interferência de proteínas mutantes sobre o mecanismo de ERAD. SOD-1, huntingtina e proteínas TAU hiperfosforiladas atuam inibindo a atividade dos componentes da ERAD e o translocamento de proteínas do lúmen do RE para o citosol. **Adaptado de:** Hetz e Mollereau (2014).

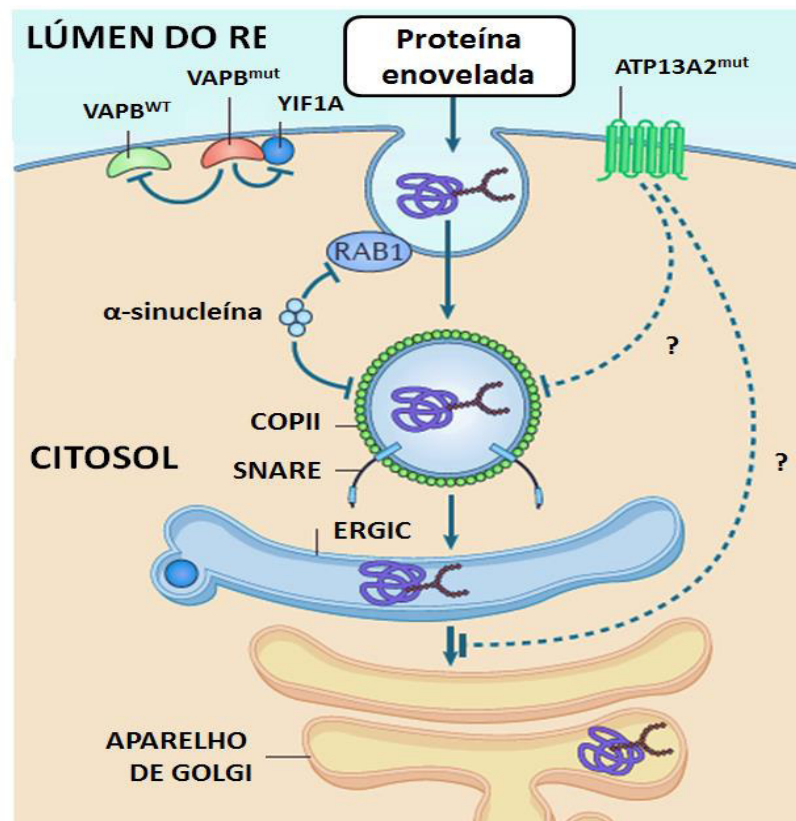


Figura 17. Interferência de proteínas mutantes sobre o tráfego para o Aparelho de Golgi. α -sinucleína, ATP13-A2 e VAPB^{mut} interagem com as proteínas de transporte vesicular e fusão de membranas (RAB1, SNARE e YIF1A) impedindo o ancoramento e fusão vesicular. **Adaptado de:** Hetz e Mollereau (2014).

As proteínas mutantes também podem atuar de forma direta sobre os marcadores adaptativos da UPR, em especial Ire1, Xbp1 e Atf6. Os agregados proteicos da DA podem promover polimorfismo da Xbp1 no núcleo, acarretando em diminuição da expressão da Xbp1 *spliced* (Liu *et al.*, 2013); e a presenilina-1 (DA) pode promover inibição do processamento normal da Ire1, levando a liberação de seu domínio citosólico (Niwa *et al.*, 1999). A proteína VAPB atua ativando a Ire1 e Xbp1 *spliced*, no entanto sua versão mutante encontrada na EAL possui uma ação antagônica, aumentando a suscetibilidade ao ERE. A VAPB mutante e a huntingtina também atuam de forma direta inibindo à ativação do Atf6 (Kanekura *et al.*, 2006) (Figura 18).

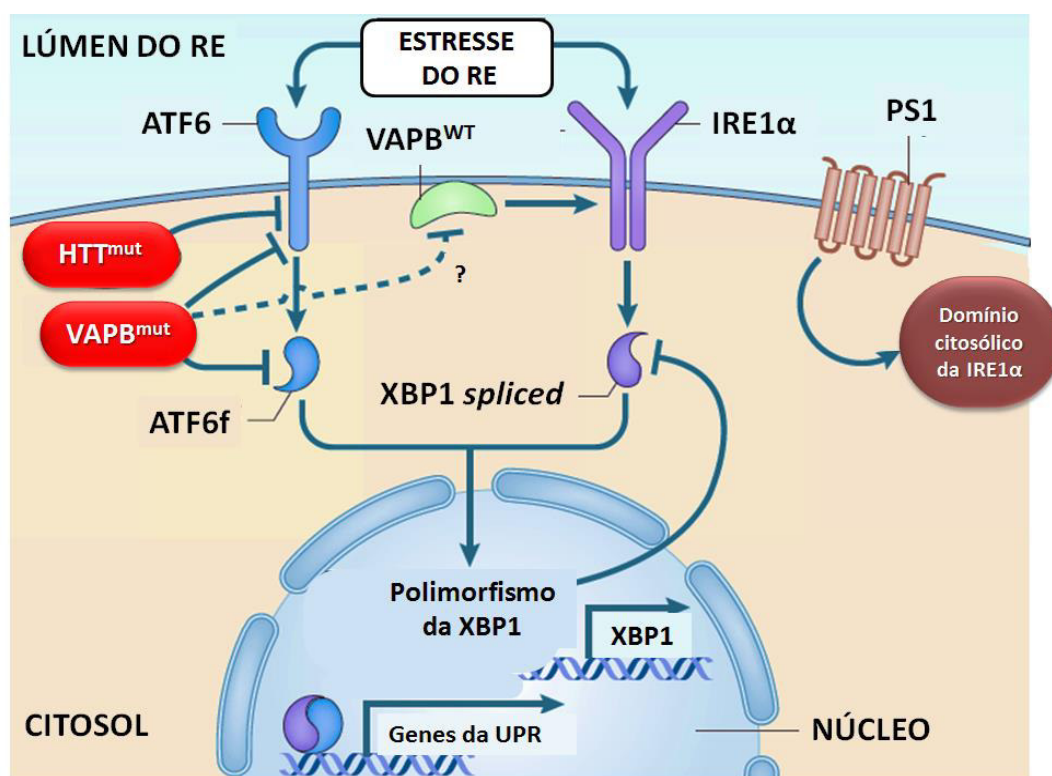


Figura 18. Interferência de proteínas mutantes sobre a ativação da UPR. O polimorfismo nuclear da Xbp1 encontrado na doença de Alzheimer atua inibindo o processo de ativação da Xbp1 normal. A presenilina-1 induz o processo de liberação do domínio citosólico da Ire1α, interferindo em suas funções. Por fim, a huntingtina e VAPB^{mut} atuam inibindo a ativação da Ire1α e Atf6 **Adaptado de:** Hetz e Mollereau (2014).

A homeostase do cálcio necessária para o correto funcionamento de chaperonas e sobrevivência celular também é comprometida em doenças neurodegenerativas. A huntingtina e PRP's interagem com receptores de rianodina e de inositol trifosfato permitindo maior efluxo de cálcio para o citosol e de forma

contrária, a α -sinucleína atua inibindo os receptores de trifosfato de inositol, aumentando a concentração de cálcio do RE (Tang *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2010; Belal *et al.*, 2012) (Figura 18).

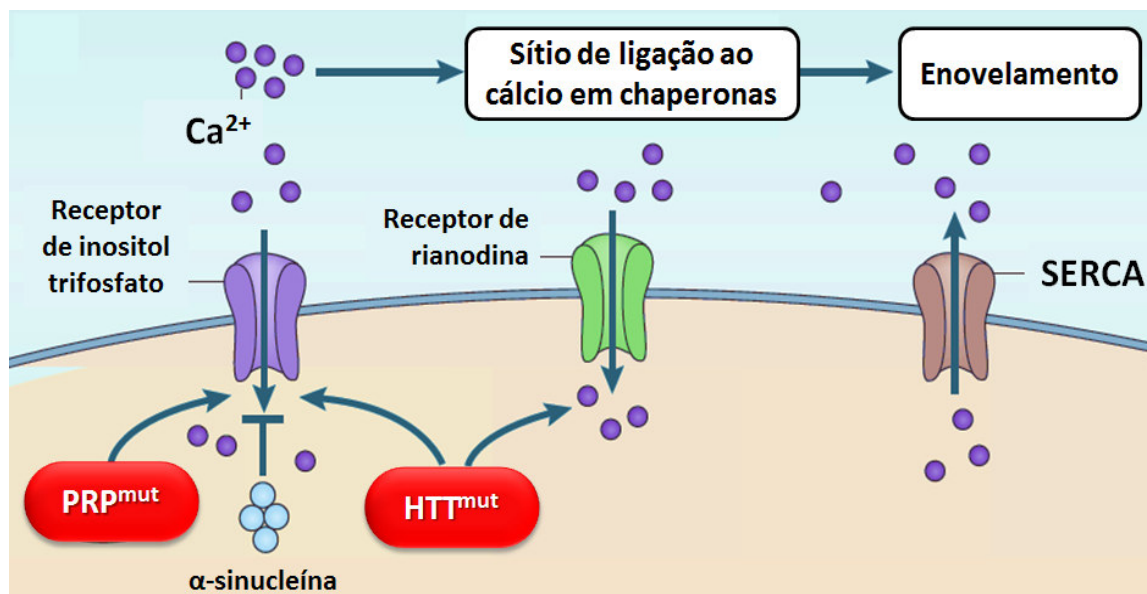


Figura 19. Interferência de proteínas mutantes sobre a homeostase dos níveis de cálcio. Agregados de α -sinucleína atuam inibindo os receptores de inositol trifosfato aumentando os níveis de cálcio no retículo, enquanto a huntingtina e PRP's atuam aumentando o efluxo de cálcio, comprometendo desta forma o correto funcionamento celular. **Adaptado de:** Hetz e Mollereau (2014).

2.7.2. Síndrome metabólica

A síndrome metabólica (SM) pode ser definida como um conjunto de disfunções metabólicas interligadas que aumentam os riscos para doenças cardiovasculares e diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2). A resistência à insulina (RI), adiposidade central, alteração dos níveis glicêmicos, dislipidemia aterogênica, esteatohepatite não-alcoólica e hipertensão são alguns dos fatores de risco que constituem esta síndrome (Kaur, 2014).

Estudos recentes têm demonstrado uma clara associação entre o ERE e o desenvolvimento de DM2. A UPR e sua cascata de sinalização têm sido propostas como agentes envolvidos na instauração do quadro de RI (Park e Ozcan, 2013). A sinalização da insulina é extremamente sensível a perturbações da homeostase do RE e do equilíbrio redox. Assim condições de ERE, estresse oxidativo e presença de citocinas inflamatórias, podem levar a ativação da quinase Jnk e comprometer toda cascata de sinalização mediada pela insulina e, subsequente, diminuição de seu

efeito (Malhotra e Kaufman, 2007). Camundongos *ob/ob* apresentam ERE em tecidos adiposo e hepático com aumento da fosforilação de Perk e Ire1 α e aumento da atividade da Jnk (Tuncman *et al.*, 2006).

A Ire1 α recruta o TRAF2 e ASK1 e ativam o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e a Jnk, que promove o processo de fosforilação de resíduos de serina do receptor de insulina (IRS-1) e contribui para a resistência à transdução do sinal da insulina através da cascata. Adicionalmente, a Jnk e o NF- κ B promovem a síntese de citocinas pró-inflamatórias (Kaneto *et al.*, 2006). A supressão da Jnk ameniza o estado de ERE e acarreta em mitigação dos efeitos deletérios relacionados a RI. Tratamento de camundongos com chaperonas químicas aperfeiçoam o processo de enovelamento proteico, reduzem o ERE e melhoram a sensibilidade à insulina em seus tecidos-alvo (Özcan *et al.*, 2004).

Camundongos heterozigotos Xbp1^{+/-} quando expostos a dieta rica em gordura desenvolvem RI quando comparados ao grupo controle, isto relacionado à redução da sinalização mediada pela Xbp1, que subsequentemente acarreta em ERE e ativação da Jnk (Özcan *et al.*, 2006). A Xbp1 é capaz de interagir com a FOXO1, sendo relacionada ao restabelecimento de níveis glicêmicos, tolerância à glicose e sensibilidade à insulina (Zhou *et al.*, 2011). Assim, conclui-se que a ativação da sinalização adaptativa da UPR via Ire1 α /Xbp1 melhoram o controle de qualidade do RE e a sensibilidade à insulina, enquanto que ativação da via deletéria Ire1 α /Jnk favorece a RI.

Células β -pancreáticas também são afetadas pela sinalização deletéria da UPR, especialmente mediada pela Perk/eIF2 α . Fisiologicamente, a Perk/eIF2 α são ativadas para amenizar efeitos deletérios relacionados a flutuações da glicemia, promovendo atenuação da síntese proteica para um correto enovelamento de insulina. A via Perk/eIF2 α também está relacionada a ativação do fator Nrf2, que é responsável pela síntese de enzimas antioxidantes e de detoxificação, controlando o estresse oxidativo (Malhotra e Kaufman, 2007).

Diversos fatores estão relacionados à ativação da UPR decorrente de ERE na obesidade, dentre eles a presença de ácidos graxos livres, a ativação do complexo 1 da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC1) e perda da homeostase do cálcio. Por exemplo, exposição ao ácido graxo palmitato induz ERE

e ativação da Jnk, favorecendo o desenvolvimento de RI em células β -pancreáticas, hepatócitos e cardiomioblastos, além de comprometer a integridade da membrana do RE (Kharroubi *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2006; Pfaffenbach *et al.*, 2010). O mTORC1 está relacionado a processos de crescimento, metabolismo, autofagia e apoptose celular (Laplane e Sabatini, 2009). O ERE presente na obesidade leva a uma maior ativação do mTORC1, que por sua vez bloqueia a fosforilação da tirosina de receptores IRS-1 e IRS-2, ativando o PI3K e reduzindo a AKT, inibindo assim a sinalização da insulina (Shah *et al.*, 2004). Por fim, o ERE relacionado tanto a obesidade quanto ao DM2 reduz a expressão de canais SERCA2, alterando os níveis de cálcio e comprometendo as atividades de chaperonas dependentes do íon para seu funcionamento (Park, Zhou, Lee, Lee, *et al.*, 2010).

Por fim, a subunidade p85 do PI3K interage com a Xbp1 *spliced* facilitando o processo de translocação do fator para o interior do núcleo. Este processo é importante especialmente para inibição da gliconeogênese e reduzir o ERE decorrente da ingestão de nutrientes. No entanto, na obesidade esta interação entre a Xbp1 e a subunidade fica prejudicada, impedindo a translocação para o núcleo e todos os efeitos adaptativos resultantes da ativação da Xbp1 (Park, Zhou, Lee, Lu, *et al.*, 2010).

2.8. ERE e o envelhecimento celular

A evolução da idade é marcada por um progressivo declínio funcional em níveis moleculares, celulares e teciduais, predispondo o organismo a diversas patologias relacionadas ao envelhecimento, como sarcopenia, distúrbios cardiovasculares, osteoporose, insuficiência pulmonar e renal e doenças neurodegenerativas. De forma geral estas alterações funcionais se iniciam em faixas etárias posteriores a metade do período total de vida da espécie (a partir do 50 anos de idade, nos humanos) (Campisi, 2013). Células de indivíduos com idade avançada possuem uma propensão mais elevada para produzir e acumular agregados de proteínas mal enoveladas, que estão diretamente relacionados à diminuição da expectativa de vida celular (Cuanalo-Contreras *et al.*, 2013).

A evolução da idade de forma progressiva compromete todas as atividades relacionadas ao RE, com destaque para: 1) diminuição da atividade de proteínas chaperonas e da sinalização adaptativa mediada pela UPR, favorecendo a atividade dos marcadores apoptóticos (Chop, Jnk e caspases) (Brown e Naidoo, 2012); 2) surgimento de alterações estruturais do RE, como perda do alinhamento paralelo das cisternas e túbulos, prejudicando a síntese e o transporte proteico (Hinds e Mcnelly, 1978); 3) prejuízos na formação e maturação do autofagossomo, reduzindo assim respostas adaptativas de autofagia (Rajawat e Bossis, 2008).

Ademais, o envelhecimento promove um desequilíbrio entre fatores pró-oxidantes e antioxidantes, instaurando estresse oxidativo celular (Tzanetakou *et al.*, 2012). O aumento de ROS no fígado de camundongos com idade avançada (24 meses) favorece o processo de carbonilação das chaperonas Grp78, calreticulina e Pdi, diminuindo assim suas atividades de enovelamento, n-glicosilação e formação de pontes de dissulfeto (Rabek *et al.*, 2003; Nuss *et al.*, 2008). Erickson *et al.* (2006), com o intuito de verificar o impacto de alterações na expressão proteica de chaperonas mediadas pelo envelhecimento em amostras de fígado de ratos, encontraram uma perda de 40%, 29% e 32% da expressão proteica do Grp78, calnexina e ERp57, respectivamente. A redução do chaperonamento contribui diretamente para a produção de fatores apoptóticos, ativação da via das caspases e colapso de potenciais de membrana mitocondriais.

Em decorrência do envelhecimento, de forma marcante a sinalização adaptativa da UPR sofre prejuízos, enquanto a apoptótica se torna mais expressiva. Em amostras de cérebro, Naidoo *et al.* (2008) descreveram uma redução da fosforilação do eIF2 α e da expressão do Grp78 (30%) no córtex de camundongos C57bl/6 com 24 meses e aumento da expressão de Chop e Caspase 12; Gavilan *et al.* (2006) observaram redução da expressão da Perk e das chaperonas Grp78, Calnexina e Pdi no hipocampo de ratos Wistar com 26 meses em relação ao controle de 4 meses e aumento da expressão de Chop e Caspase 12; e Hussain e Ramaiah (2007) observaram em amostras de córtex, cerebelo, fígado, rins, pulmões, coração e baço de ratos Wistar de diferentes faixas etárias (0-18 meses de idade) redução da expressão de eIF2 α e Grp78 e aumento de Jnk e Gadd34, impedindo a inibição traducional iniciada pela eIF2 α e tornando mais propícia a síntese de Chop.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Caracterizar o impacto do estresse do retículo endoplasmático hipocampal sobre o surgimento de declínios cognitivo, comportamental e motor em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta rica em sacarose em diferentes faixas etárias.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o desenvolvimento do fenótipo de síndrome metabólica induzida por dieta rica em sacarose em ratos com diferentes períodos de exposição à dieta e faixas etárias (jovens e adultos);
- Caracterizar o desbalanço redox e subsequentes danos oxidativos induzidos pelo fenótipo de síndrome metabólica após diferentes períodos de exposição à dieta obesogênica;
- Avaliar o impacto da síndrome metabólica sobre funções cognitivas, comportamentais e motoras nos grupos experimentais propostos;
- Investigar o efeito da síndrome metabólica perante a expressão gênica/proteica de marcadores-chave de vias de sinalização envolvidas no estresse do retículo endoplasmático, estresse oxidativo, senescência e morte celular no tecido hipocampal dos grupos experimentais;
- Comparar os possíveis danos neurofuncionais e neuro-moleculares dos animais jovens e adultos com o fenótipo de síndrome metabólica a animais com idade avançada e sem obesidade induzida.

4. RESULTADOS

4.1. Capítulo I

- Artigo publicado no periódico *Metabolic Brain Disease*
- Qualis Capes 2015 – Medicina I: **Classificação B1**
- Fator de impacto: **2.603**
- Título: “**Early and sustained exposure to high-sucrose diet triggers hippocampal ER stress in young rats**” - DOI 10.1007/s11011-016-9830-1
- Autores: Bruno Araújo Serra Pinto, Thamys Marinho Melo, Karla Frida Torres Flister, Lucas Martins França, Daniela Kajihara, Leonardo Yuji Tanaka, Francisco Rafael Martins Laurindo, Antonio Marcus de Andrade Paes

Early and sustained exposure to high-sucrose diet triggers hippocampal ER stress in young rats

Bruno Araújo Serra Pinto¹ · Thamys Marinho Melo¹ · Karla Frida Torres Flister¹ · Lucas Martins França¹ · Daniela Kajihara² · Leonardo Yuji Tanaka² · Francisco Rafael Martins Laurindo² · Antonio Marcus de Andrade Paes¹

Received: 3 November 2015 / Accepted: 28 April 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Early-life environmental insults have been shown to promote long-term development of chronic non-communicable diseases, including metabolic disturbances and mental illnesses. As such, premature consumption of high-sugar foods has been associated to early onset of detrimental outcomes, whereas underlying mechanisms are still poorly understood. In the present study, we sought to investigate whether early and sustained exposure to high-sucrose diet promotes metabolic disturbances that ultimately might anticipate neurological injuries. At postnatal day 21, weaned male rats started to be fed a standard chow (10 % sucrose, CTR) or a high-sucrose diet (25 % sucrose, HSD) for 9 weeks prior to euthanasia at postnatal day 90. HSD did not alter weight gain and feed efficiency between groups, but increased visceral, non-visceral and brown adipose tissue accumulation. HSD rats demonstrated elevated blood glucose levels in both fasting and fed states, which were associated to impaired glucose tolerance. Peripheral insulin sensitivity did not change, whereas hepatic insulin resistance was supported by increased serum triglyceride levels, as well as higher TyG index values. Assessment of hippocampal gene expression showed endoplasmic reticulum (ER) stress pathways were activated in HSD rats, as compared to CTR. HSD rats had overexpression of unfolded protein response sensors, PERK and ATF6; ER chaperone, PDIA2 and apoptosis-related genes, CHOP and Caspase 3; but decreased expression of chaperone GRP78.

Finally, HSD rats demonstrated impaired neuromuscular function and anxious behavior, but preserved cognitive parameters. In conclusion, our data indicate that early exposure to HSD promote metabolic disturbances, which disrupt hippocampus homeostasis and might precociously affect its neuro-behavioral functions.

Keywords High-sucrose diet · Metabolic syndrome · Hippocampus · Unfolded protein response · Neurological impairment · Developmental origins of health and disease

Introduction

Metabolic syndrome (MetS) is conceptually defined as the co-occurrence of at least three out of the following metabolic disturbances: central/visceral obesity, hypertriglyceridemia, hyperglycemia, insulin resistance, hyperinsulinemia and hypertension (Alberti et al. 2009). While precise mechanisms underlying the development of its clustered comorbidities are not completely understood, MetS has rapidly reached epidemic proportions worldwide in a straight relationship with the access to sugar-rich foods and beverages, as well as less physical activity (Bray et al. 2004). Additionally, accumulating data have suggested that metabolic (re)programming processes subsequent to early-life insults, i.e. during pregnancy, infancy or childhood, may lead to long-term development of chronic non-communicable diseases, such as MetS, cancer, mental illness, among others (Chan et al. 2015; Gluckman et al. 2007; Inadera 2013). This hypothesis for the developmental origins of health and disease (DOHaD) was first proposed in the 1990's by Dr. David Barker, and attracted increasing attention of scientists, medical doctors, epidemiologists and policymakers around the world (Cooper 2013).

✉ Antonio Marcus de Andrade Paes
marcuspaes@ufma.br

¹ Laboratory of Experimental Physiology, Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

² Laboratory of Vascular Biology, Heart Institute of the School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

Human consumption of sugar in industrialized countries has exponentially arisen for over 200 years, whereas concerns about its deleterious effects have just come up during the last 4 decades (Bray 2010; Bray et al. 2004; Yudkin 1972; Yudkin 1983). Sucrose is the main collaborator to total sugar intake worldwide, reaching rates as high as 25 % of total energy intake in many countries (Bray 2010; Gibson et al. 2013). Upon the action of intestinal sucrase, sucrose is efficiently hydrolyzed into its two monosaccharide constituents, glucose and fructose, which are absorbed under very similar rates (Tappy et al. 2010). However, once inside the bloodstream their fate diametrically differs. Glucose elicits insulin release toward its own uptake by insulin-sensitive tissues, whereas fructose undergoes nearly complete hepatic uptake where it is converted into trioses and further used for the *de novo* synthesis of triglycerides (Rippe and Angelopoulos 2013). Consequently, rats fed a high-sucrose diet, and thus fructose, develop hypertriglyceridemia (Kanazawa et al. 2003) and increased fat accumulation, even after short-term dietary intervention (Toida et al. 1996). On the other hand, high-glucose diet did not cause the same alterations both in rats (Kanarek and Orthen-Gambill 1982) and humans (Cohen and Schall 1988), emphasizing the pivotal role played by fructose on sucrose deleterious effects.

Blood-brain barrier and synaptic tree are still under development during infancy and beginning of childhood, letting brain susceptible to environmental insults (Christoffel et al. 2012). Early onset of MetS comorbidities may affect important brain areas, compelling them to undergo adaptive responses that usually involve endoplasmic reticulum (ER)-based mechanisms (Cnop et al. 2012; Ozcan and Tabas 2012). Under ER stress, protein synthesis is overactivated to support increased metabolic demand, but may also lead to impaired protein folding, a triggering event of the unfolded protein response (UPR). Depending on the insult's intensity and duration, UPR sensors – inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α), protein kinase RNA-like ER kinase (PERK) and activating transcription factor 6 (ATF6) – activate distinct signaling pathways toward pro-adaptive or pro-apoptotic cellular fate. Pro-adaptive pathways selectively inhibit *de novo* protein synthesis; upregulate the transcription of genes encoding ER chaperones, as well as antioxidants to maintain redox homeostasis; and activate ER-associated protein degradation (ERAD) pathway. On the contrary, pro-apoptotic pathways mainly include the upregulation of the transcription factor C/EBP-homologous protein (CHOP) and its downstream signaling pathway (Hetz 2012; Santos et al. 2009). In fact, ER stress pathways have been increasingly associated with the pathogenesis of neurodegenerative diseases (Hetz Mollereau 2014; Roussel et al. 2013), specially as a mid- to late-term outcome of metabolic disturbances (van der Harg et al. 2014).

In addition to hypothalamus, recent studies have proposed a role for hippocampus as a neuroendocrine interconnector

between metabolic cues and cognitive functions (Calvo-Ochoa and Arias 2015; Davidson et al. 2009; Kanoski and Davidson 2011; Mainardi et al. 2015), a relationship further supported by the description that insulin is produced and secreted by mature neurons of the dentate gyrus (Kuwabara et al. 2011). Even short-term dietary interventions have been shown to alter rat hippocampus structure and function (Calvo-Ochoa et al. 2014). However, it is not known whether those alterations arise from local or peripheral metabolic signals that disturb hippocampus homeostasis. Thus, in the present study, we hypothesized that early and sustained exposure of weaned rats to high-sucrose diet (HSD) promotes MetS-related metabolic disturbances, which ultimately might anticipate neurological injuries. Data herein presented reinforce this hypothesis and further support that those alterations are associated with precocious triggering of hippocampal ER stress.

Material and methods

Animals, diets and experimental design

At weaning (postnatal day 21), male Wistar Hannover rats provided by animal facility house of Federal University of Maranhão were randomized into two groups: control group (CTR, $n = 9$), fed a standard chow (Nuvital®, Nuvilab, Brazil), whose macronutrient composition was 55.4 % total carbohydrate (10 % sucrose), 21 % proteins, 5.2 % total lipids, totaling 352 Kcal/100 g; and high-sucrose diet group (HSD, $n = 7$), fed a high sucrose chow manufactured with powdered standard chow (40 %), condensed milk (40 %), refined sugar (8.5 %) and filtered water *qsp* for a final macronutrient composition of 65 % total carbohydrates (25 % sucrose), 12.3 % proteins, 4.3 % total lipids, totaling 348 Kcal/100 g (de Lima et al. 2008). Animals were maintained in a controlled room (temperature 22 ± 3 °C, humidity, 60 %) with airflow conditions, artificial dark-light cycle (lights on from 7 : 00 a.m. to 7 : 00 p.m.) and free access to water and chow for 9 weeks, until the postnatal day 90.

During dietary intervention period, animals' body weight and their food intake were measured twice a week for feed efficiency calculation. Monthly, the Lee index (body weight (g)^{1/3} naso-anal length (cm)⁻¹ $\times$ 1000) was determined for obesity development assessment (Bernardis and Patterson 1968). Behavioral and cognitive tests were performed during the last week before euthanasia. Additionally, animals were subjected to intraperitoneal glucose and insulin tolerance tests. At postnatal day 90, overnight fasted animals were anesthetized (10 mg/kg xylazine, 40 mg/kg ketamine) for blood and tissue collection upon laparotomy and decapitated to craniotomy and hippocampus dissection. Blood samples were processed to serum or plasma separation. Serum triglyceride levels were spectrophotometrically measured using laboratorial kits

according to manufacturer's instructions (LABTEST®, Brazil). Liver, pancreas, gastrocnemius and soleus skeletal muscles, interscapular brown adipose tissue; and periepididymal, retroperitoneal and mesenteric white adipose tissue fat pads were weighed for morphometric assessment. Morphometric data were expressed as tissue mass (g) per 100 g body weight. The dissected hippocampus was rapidly stored in RNAlater® solution (Ambion, USA) for qPCR procedures. All protocols were approved by the Committee for Ethics and Welfare on Animal Use – CEUA of the Federal University of Maranhão under ruling N° 23,115.009595/2014–81.

Assessment of glucose-insulin axis function

For intraperitoneal glucose tolerance test (*ip*GTT), animals were submitted to 8-h fasting prior to administration of 2 g/kg glucose. Tail vein blood drops were collected immediately before (time 0) and 15, 30, 60 and 120 min after glucose load for blood glucose measurement through glucometer (Accu-check Active®, Roche Diagnostic, Germany). Data were expressed as mean area under curve (AUC). Similar procedure was carried out for intraperitoneal insulin tolerance test (*ip*ITT), excepting animals were fed and received 1 IU/kg insulin (Humulin 70/30®, Lilly, USA). Glucose disappearance rate (K_{ITT}) was derived from *ip*ITT data and calculated as $0.693/t_{1/2}$. Hepatic insulin sensitivity was predicted by means of TyG index calculation [$\ln$ (fasting glucose $\times$ fasting triglyceride)/2] (Guerrero-Romero et al. 2010).

Assessment of ex vivo lipolytic activity

Samples of periepididymal fat pad (~100 mg) from both groups were fragmented and incubated in Krebs buffer (120 mM NaCl, 15 mM NaHCO₃, 4.83 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.21466 mM KH₂PO₄, 2.4 mM CaCl₂, 1 % BSA and 0.1 % glucose after pH adjustment to 7.4) under pumping aeration (37 °C) in the presence or absence of 20 μ M isoproterenol (Sigma Aldrich, USA). After 1 h incubation the samples were cooled to stop the reactions and glycerol concentration was determined by enzymatic colorimetric assay (540 nm) using triglyceride commercial kit according to manufacturer's instructions (Labtest®, Brazil) (Vaughan 1962).

Assessment of gene expression by real time PCR (qPCR)

Hippocampus samples were used for RNA extraction using Trizol® (Invitrogen, Germany) as manufacturer's instructions. RNA pellet was diluted in 50 μ l nuclease-free water and quantity and purity determined by measurement of A260/A280 ratios with a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA), followed by agarose gel

electrophoresis (0.8%). RNA samples were stored at –80 °C. RNA samples (3 μ g) were converted into cDNA using Super Script II Reverse Transcriptase® (Invitrogen, Germany). Primers were designed using Primer Express® software (Applied Biosystem, USA) and manufactured by Invitrogen Brazil (Table 1). The qPCR amplification and Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Germany) detection were performed using the 7500 Real-time PCR Applied Biosystems®, USA. Reactions were incubated at 50 °C for 2 min and 95 °C for 2 min (holding stage) followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s (denaturation) and 60 °C for 1 min (annealing and extension). To melt curve stage, reactions were incubated at 95 °C for 15s, 60 °C for 60 min and 95 °C for 15 s. All samples were normalized to the relative levels of GAPDH and results are expressed as the fold change (FC) values of $2^{-\Delta\Delta CT}$, as determined by real-time amplification.

Assessment of behavioral and cognitive outcomes

Neuromotor activity and exploratory behavior were assessed by rotarod and open field tests, respectively, as previously described (Hall and Ballachey 1932; Srodulski et al. 2014). Briefly, two days prior to rotarod test animals were allowed to accommodate standing on rod and probed at rotating speed of 12 rpm for 5 min. Each animal was tested 3 times a day over 5 consecutive days. At day 5, animals were fasted for 2 h before experimental performance, when latency to fall was recorded in seconds (s). To assess anxiety and exploratory behavior, the animals were individually placed at the center of a glass-wall circular arena (140 cm²), divided in 9 quadrants, for 5 min. Total number of quadrant crossing, frequency of entrances in the central quadrant and stereotyped behaviors were recorded for data analysis. To assess spatial learning-memory and cognitive functions, animals were subjected to water maze test (Morris 1984). The apparatus consisted of a circular pool (120 cm diameter, 50 cm deep), filled with water (22 $\pm$ 2.0 °C) to a depth of 30 cm and divided into four quadrants. A platform (15 cm wide and 35 cm high) was placed 1.5 cm below water surface in the center of the pre-set quadrant. During training period, animals were individually released into the water from one of the four quadrants, facing maze wall, and allowed to swim for 60 s to find the hidden platform. Rats that failed to locate the platform were gently guided to the platform and allowed to stay on it for 30 s. Animals were trained four times a day for 3 consecutive days. Latency time to find the hidden platform was recorded for spatial learning assessment. On 4th day, the platform was removed and the animals released in the center of the pool to swim for 120 s. The time spent in the quadrant where platform was expected to be was recorded for memory retention assessment.

Table 1 Primers sequence

Rat gene*	Forward primer	Reverse primer	Amplicon length (bp)	GenBank accession n°
GAPDH	5'-GAGACAGCCGCATCTTCTTGT-3'	5'-CGACCTTCACCATCTTGTCTATGA-3'	62	NM_017008.4
IRE1 α	5'-GGATGTGAGTGACCGAATAGAAAA-3'	5'-TCCAACTGCCGCACGAT-3'	60	NM_001191926.1
PERK	5'-GGCTGGTGAGGGATGGTAAA-3'	5'-TTGGCTGTGTAACTTGTGTCATCA-3'	64	NM_031599.2
ATF6	5'-TCTCTGATGGCCGTGCAT-3'	5'-TGAAGATGACCCACAGAACCAA-3'	65	NM_001107196.1
GRP78	5'-AAAGAAAGGTCACCCATGCAGTT-3'	5'-GCCGCTGTGCATCATTA-3'	59	NM_013083.2
PDIA2	5'-GCACCTGGTCACAGAAATCAAC-3'	5'-TGAGGATCCTGGCTGCAAA-3'	62	NM_001105775.2
CALNEXIN	5'-TGGGGTGGTGCCTACGT-3'	5'-GGAGTCTTGTCTGGGAATTGATC-3'	74	NM_172008.2
Nrf2	5'-CCCATTGAGGGCTGTGATCT-3'	5'-GCCTTCAGTGTGCTTCTGGTT-3'	60	NM_031789.2
Bcl2	5'-GGGATGCCTTTGTGGAACATATATG-3'	5'-CAGCCAGGAGAAATCAACACA-3'	62	NM_016993.1
CHOP	5'-TGGCACAGCTTGTGAAGAG-3'	5'-TCAGGCGCTCGATTTCCT-3'	54	NM_001109986.1
CASPASE 3	5'-TTTGGCCCATGCTGAAACT-3'	5'-ACGAGTGAGGATGTGCATGAAT-3'	59	NM_012922.2

Abbreviations GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GRP78, Glucose regulated protein 78; PDIA2, Protein disulfide isomerase family A, member 2; IRE1 α , Inositol-requiring enzyme 1 alpha; PERK, Protein kinase RNA-like ER kinase; ATF6, Activating transcription factor 6; Nrf2, Nuclear factor, erythroid derived 2, like 2; Bcl2, B-cell CLL/lymphoma 2; CHOP, C/EBP-homologous protein. bp, base pair

Statistical analysis

Data was expressed as mean $\pm$ SEM and compared by means of unpaired *t* test (one-tailed) for a significant difference of 5% ($p < 0.05$).

Results

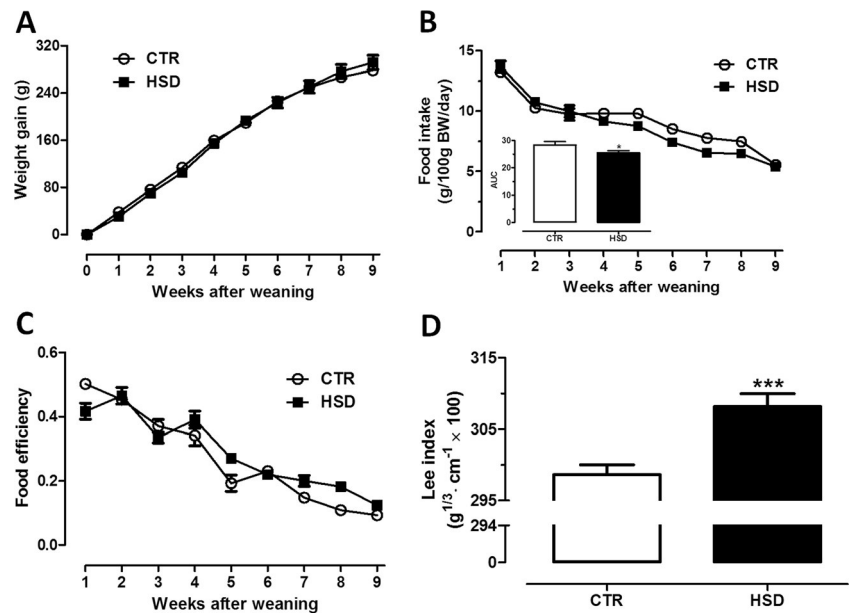
Early exposure to HSD increased adipose tissue accumulation

Early exposure to HSD did not alter weight gain and feed efficiency between groups, whereas slightly decreased food intake in 90-days old HSD-fed rats, as compared to age-matched CTR (Fig. 1 a-c). Nevertheless, HSD rats had higher body mass than CTR as assessed by Lee Index calculation (308.1 ± 1.8 vs 298.6 ± 1.4 g^{1/3}·cm⁻¹, $p = 0.0004$, Fig. 1d), reaching values that classify them as overweight (Stephens 1980). Moreover, HSD rats showed increased white and brown adipose tissue accumulation, but no change was found on liver, pancreas and skeletal muscle relative masses (Table 2). To further characterize the effects of HSD on adiposity, we measured basal and isoproterenol-induced ex vivo lipolysis in visceral periepididymal fat pads from both groups. As showed in Fig. 2, basal unstimulated lipolysis had no difference between groups. However, lipolytic response to sympathetic stimulus was significantly decreased in HSD rats, as compared to CTR (7.4 ± 0.56 vs 9.55 ± 0.89 μ g/mg/h, $p = 0.0002$).

Early exposure to HSD impaired glucose and triglyceride homeostasis

In order to investigate the effects of early HSD exposure on insulin-glucose axis, animals from both groups were subjected to *ip*GTT and *ip*ITT. HSD rats showed higher baseline glucose levels in both states as compared to CTR (Fasted: 102.7 ± 1.38 vs 94.67 ± 1.43 mg/dl, $p = 0.0007$; Fed: 128.3 ± 2.2 vs 106.7 ± 3.49 mg/dl, $p = 0.0001$, Fig. 3a-b). After glucose bolus administration, both groups reached maximum glucose levels within 15 min, returning to baseline levels in 2 h (Fig. 3c). Calculation of *ip*GTT AUC showed that HSD rats had impaired glucose tolerance (625.3 ± 57.02) as compared to CTR (493.6 ± 33.55 , $p = 0.0283$, Fig. 3d). On the other hand, peripheral insulin sensitivity was preserved in HSD group, as depicted from *K*_{ITT} calculation (Fig. 3f). Surprisingly, HSD animals presented a rebound increase of glucose levels, which might be due to enhanced hepatic sensitivity to glucagon (Fig. 3e). Taking into account that assembly and secretion of triglyceride-rich VLDL particle is associated with hepatic insulin resistance, we measured fasting triglyceride levels in both groups. Serum triglyceride levels

Fig. 1 Morphometric parameters: **a**, Weight gain (g); **b**, food intake (g/100g/day) and area under curve (AUC); **c**, Feed efficiency [food intake (g) Δ body weight⁻¹ (g)]; and **d**, Lee index (g^{1/3} cm⁻¹ $\times$ 100) were assessed in standard chow fed (CTR, $n = 9$) and high-sucrose diet (HSD, $n = 7$) fed rats during nine weeks from weaning (postnatal day 21). Points and bars represent mean $\pm$ SEM, compared by unpaired t -test (one-tailed) * $p < 0.05$. *** $p < 0.001$



in HSD was $\sim 60\%$ higher than CTR (145.3 ± 14.24 vs 88.89 ± 5.79 mg/dl, $p = 0.0007$, Fig. 3g). Finally, fasting glucose and triglyceride levels were used to calculate TyG Index as a surrogate measure of hepatic insulin resistance (Du et al. 2014; Simental-Mendia et al. 2008). Result in Fig. 3h is suggestive of higher insulin resistance in HSD group, in spite of unchanged K_{ITT} showed in Fig. 3f. In this context, our data support the hypothesis that early exposure to HSD leads to a precocious metabolic syndrome phenotype mainly characterized by visceral fat accumulation, dysglycemia, glucose intolerance and hypertriglyceridemia through mechanisms that might involve the impairment of insulin-dependent actions.

Early exposure to HSD activated hippocampal ER stress pathways

We next investigated whether the precocious development of the metabolic syndrome phenotype herein described would

disturb hippocampal ER homeostasis, a central signaling pathway for cellular stress sensing. Data in Fig. 4 show that HSD-fed rats demonstrated elevated mRNA levels for two out of the three ER stress transducers, PERK (3.31 ± 0.64 FC; $p = 0.0039$) and ATF6 (2.3 ± 0.47 FC; $p = 0.0229$), whereas no significant change was found for IRE1 α . Consistent with this, expression of ER chaperone genes was increased for PDIA2 (4.46 ± 0.44 FC; $p = 0.0001$), decreased for GRP78 (0.19 ± 0.29 FC; $p = 0.0367$) and unchanged for Calnexin. Despite the strong increase in PERK mRNA levels, Nrf2 gene expression did not change. Assessment of apoptosis-related genes expression showed Caspase 3 and CHOP mRNA levels were elevated (2.66 ± 0.49 FC, $p = 0.027$ and 2.04 ± 0.27 FC, $p = 0.0262$; respectively). In accordance, Bcl2 mRNA levels, an anti-apoptosis gene, showed a non-significant downward trend. In total, six of the ten ER stress-related genes tested demonstrated significant differential expression in the hippocampus of our 90-days old HSD-fed rats.

Table 2 Weight of tissues collected from rats fed a standard chow (CTR) or high-sucrose diet (HSD) for 9-weeks from weaning

Tissue	CTR (g/100 g BW)	HSD (g/100 g BW)	<i>p</i>
Retroperitoneal fat	0.71 $\pm$ 0.11	0.99 $\pm$ 0.08	0.0459
Periepididymal fat	0.70 $\pm$ 0.06	1.18 $\pm$ 0.03	< 0.0001
Mesenteric fat	0.58 $\pm$ 0.07	0.90 $\pm$ 0.01	0.0044
Brown adipose tissue	0.08 $\pm$ 0.004	0.10 $\pm$ 0.008	0.0224
Liver	2.74 $\pm$ 0.04	2.64 $\pm$ 0.05	0.0669
Pancreas	0.45 $\pm$ 0.01	0.45 $\pm$ 0.03	0.4748
Gastrocnemius muscle	0.63 $\pm$ 0.001	0.65 $\pm$ 0.02	0.3011
Soleus muscle	0.04 $\pm$ 0.001	0.04 $\pm$ 0.001	0.3311

Data are mean $\pm$ SEM compared by unpaired t test. CTR, $n = 9$; HSD, $n = 7$

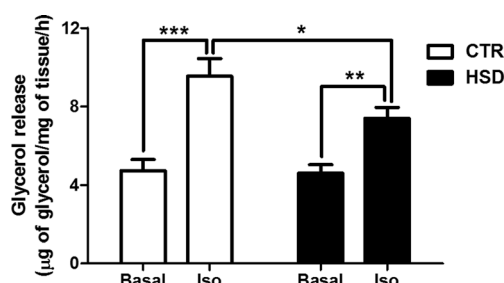


Fig. 2 Ex vivo lipolytic activity: Periepididymal fat pads isolated from rats fed a standard chow (CTR, $n = 9$) or high-sucrose diet (HSD, $n = 7$) for nine weeks from weaning (postnatal day 21) were assayed for measurement of glycerol release rate ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue/h) under basal or isoproterenol (Iso; $20 \mu\text{M}$) stimulation. Bars represent mean $\pm$ SEM compared by unpaired t-test (one-tailed). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Early exposure to HSD impaired neuromuscular function but did not alter learning-memory ability

Assessment of behavioral and cognitive functions in CTR and HSD-fed rats showed significant impairment caused by early and sustained exposure to high dietary sucrose. Data in Fig. 5a show that HSD group performance on rotarod was significantly worse than CTR (120.00 ± 29.82 vs 214.80 ± 36.88 s, respectively; $p = 0.0369$), denoting important impairment of neuromuscular function. On the other hand, no spatial learning-memory impairment was found during water maze test (Fig. 5 b and c). Nevertheless, HSD rats demonstrated higher anxiety, inferred from the increased number of total crosses during open field test performance (Fig. 5d), whereas other parameters were not affected (Fig. 5 e and f).

Discussion

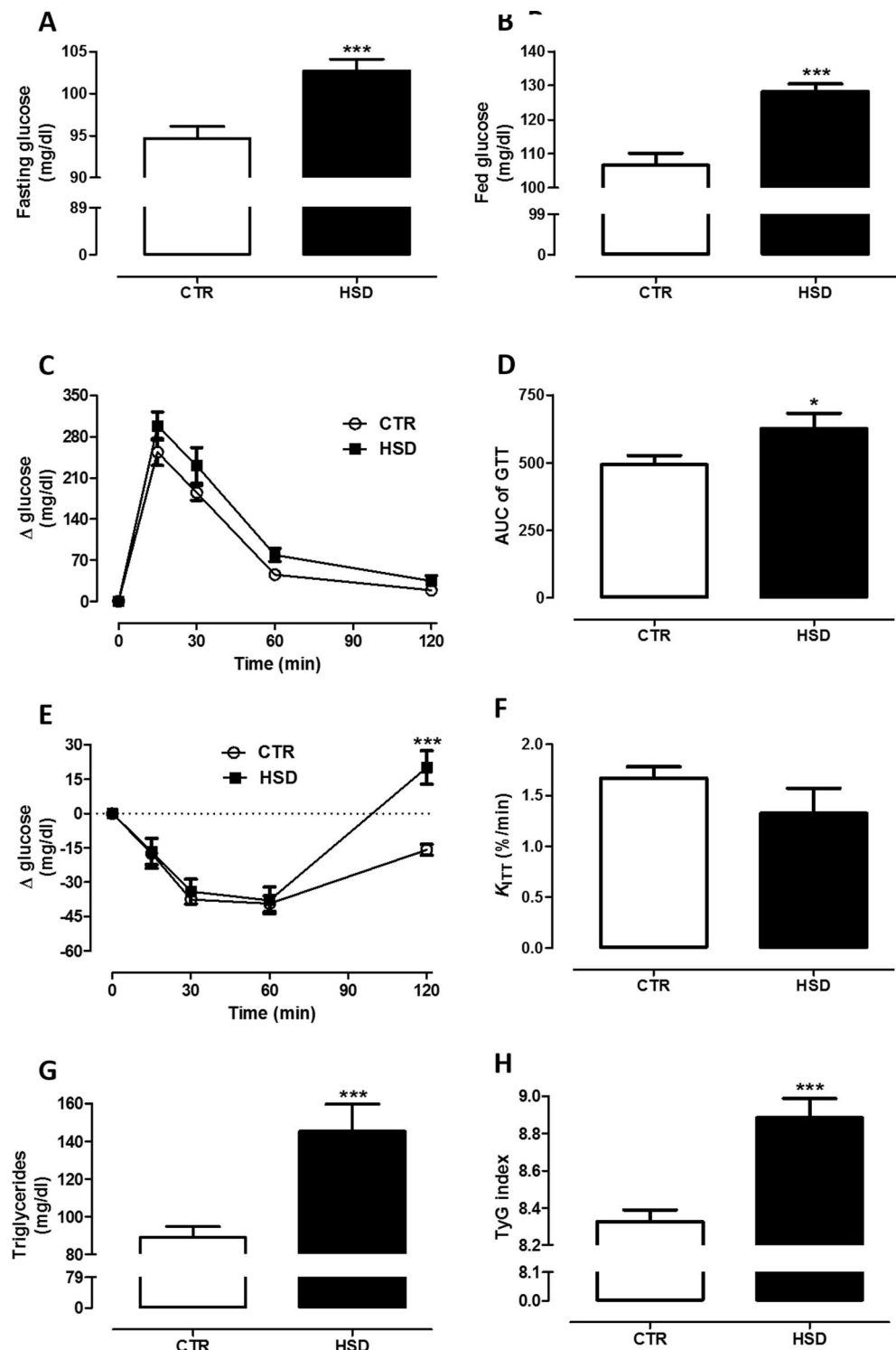
The present study provides several levels of evidence that early and sustained exposure to HSD leads to a metabolic syndrome phenotype with subsequent impairment of hippocampal ER homeostasis. Firstly, 90-days old rats fed a HSD since weaning accumulated more visceral and non-visceral adipose tissue than age-matched CTR rats, despite no statistical difference in body weight. Secondly, HSD rats presented higher blood glucose levels, at both fasted and fed states and hypertriglyceridemia. These metabolic disturbances are thought to underlie the disruption of hippocampal ER homeostasis detected in HSD rats, which might concur for the neuromotor impairment and anxiogenic behavior also demonstrated by HSD animals. Together, these results suggest that early high sucrose intake promotes precocious damage to important brain areas that may lead to behavioral and cognitive, beyond metabolic, disorders at adulthood.

According to our data, an early 9-week sucrose-rich but isocaloric dietary intervention, from weaning to the young age of 90-days old, increased fat accumulation on both

visceral and non-visceral depots. Surprisingly, animals' whole body weight did not statistically differ between groups, though HSD rats had higher Lee Index as well as lower food intake than CTR. These data are corroborated by previous studies which showed that rats fed an isocaloric high sugar diet for 2- (Kanazawa et al. 2003), 4-, 12- (Toida et al. 1996) or 18-weeks (Pawlak et al. 2004) had increased visceral fat accumulation, despite having similar mean body weight. Furthermore, assessment of ex vivo catecholamine-evoked glycerol release from periepididymal fat pad showed that our HSD rats had impaired response, besides keeping unchanged basal lipolysis. In fact, elevated fat mass in high-fructose fed rats has been attributed, at least in part, to decreased isoproterenol-stimulated lipolysis (Rizkalla et al. 1992), which might be related to increased catecholamine-resistance on adipocyte β_2 -adrenoceptor that leads to increased stimulation of antilipolytic α_2 -adrenoceptors (Jocken and Blaak 2008). On the other hand, our HSD rats also showed hypertrophic brown adipose tissue, a sensitive site for hypothalamus-driven sympathetic activity. Brown adipose tissue mass has been shown to be modulated by low-grade hypothalamic inflammation secondary to white adipose tissue accumulation (Arruda et al. 2011b; Velloso and Schwartz 2011), which might compromise other functions of hypothalamus. It has been demonstrated that rats submitted to 8-week feeding with HSD also had brown adipose tissue hypertrophy, which was ascribed to β_3 -adrenoceptor upregulation due to reduced sympathetic activation or receptor desensitization (de Queiroz et al. 2012). Actually, the impairment of sympathetic nervous system has been defended by MONA LISA hypothesis, which states that most obesities – thus, obesity models – known are low in sympathetic activity (Bray 1991; Bray and York 1998).

In this study, HSD rats presented higher blood glucose levels in both fed and fasted states, clearly demonstrating an impaired glucose handling that was further corroborated by results from *ip*GTT. However, no difference was found in blood glucose clearance capacity assessed by means of *ip*ITT, suggesting preserved insulin sensitivity. On the other hand, HSD rats showed a marked increase of serum triglyceride levels, which was associated with elevated fasting glycemia to rather suggest an increased hepatic insulin resistance, as assessed by TyG index calculation. In addition to its fructose-derived effects on lipid metabolism, sucrose has also the potential to influence glucose tolerance and insulin sensitivity through the insulinemic response to glucose (Gibson et al. 2013). However, when rats fed either 32% glucose, fructose or sucrose solutions for 50 days were submitted to GTT, only fructose- and sucrose-treated ones showed impaired glucose tolerance (Kanarek and Orthén-Gambill 1982). Furthermore, it was shown that sucrose fed rats had increased triglyceride content in the liver and VLDL particles within six weeks, while it took about three months to significantly accumulate in skeletal muscle; demonstrating that hepatic, but not

Fig. 3 Glucose-insulin axis function assessment: **a**, Fasting blood glucose levels (mg/dL); **b**, fed blood glucose levels (mg/dl); **c**, blood glucose levels (mg/dL) during intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT); **d**, area under curve of ipGTT; **e**, blood glucose levels (mg/dl) during intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT); **f**, blood glucose disappearance rate (KITT); **g**, serum triglyceride levels (mg/dL); and **h**, TyG index [$\ln(\text{fasting glucose} \times \text{fasting triglyceride})/2$] were assessed in rats fed a standard chow (CTR, $n = 9$) or high-sucrose diet (HSD, $n = 7$) for nine weeks from weaning (postnatal day 21). Points and bars represent mean $\pm$ SEM compared by unpaired t-test (one-tailed) * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$



muscular, insulin resistance is an early event in sucrose-based dietary interventions (Thresher et al. 2000). Noteworthy, these authors have further suggested that fructose is the primary mediator of sucrose-induced adverse metabolic effects (Bizeau and Pagliassotti 2005). Although we have not measured circulating insulin levels in our rats, this set of data,

especially by increased fasting glucose and triglyceride levels, allow us to speculate that our HSD rats had increased insulin levels secondary to hepatic insulin resistance and possible pancreatic lipotoxicity depicted from the elevated plasma lipid peroxidation (data not shown). Absence of muscle insulin resistance is supported by no differences in *ipITT*, skeletal

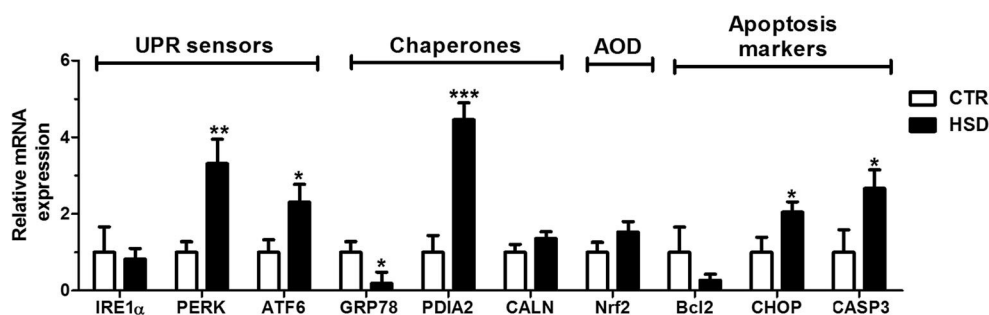


Fig. 4 Expression of genes related to ER stress: Relative mRNA expression of UPR sensors (IRE1 α , PERK and ATF6), chaperones (GRP78, PDIA2 and CALNEXIN - CALN), antioxidant defense (AOD) (Nrf2) and apoptosis markers (Bcl2, CASPASE 3 – CASP3 and CHOP) in the hippocampus of rats fed a standard chow (CTR, $n = 9$) or high-sucrose diet (HSD, $n = 7$) for nine weeks from weaning (postnatal

day 21). All samples were normalized to the relative levels of GAPDH and results are expressed as the fold change values of $2^{-\Delta\Delta CT}$, as determined by real-time amplification. Points and bars represent mean $\pm$ SEM compared by unpaired t-test (one-tailed). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

muscle masses and muscle triglyceride content (data not shown) between HSD and CTR groups.

Consistent set of data has demonstrated the outcomes of diet-induced metabolic disturbances on functional impairment of important brain areas, particularly hypothalamus, through mechanisms involving low-grade inflammation (Velloso and Schwartz 2011), as well as oxidative and ER stresses (Cnop et al. 2012; Tappy et al. 2010). Increasing evidence has proposed a role for the hippocampus on metabolic control,

besides its well-known role on learning and memory functions (Davidson et al. 2009). Indeed, Western diet intake may cause hippocampal dysfunction with subsequent cognitive impairment (Kanoski and Davidson 2011). Concerning our data, increased brown adipose tissue mass in our HSD rats may be related to low-grade hypothalamic inflammation, as previously shown (Arruda et al. 2011b), which might extend to interconnected brain areas, such as hippocampus (Cenquizca and Swanson 2007). Thus, given the causative relationship

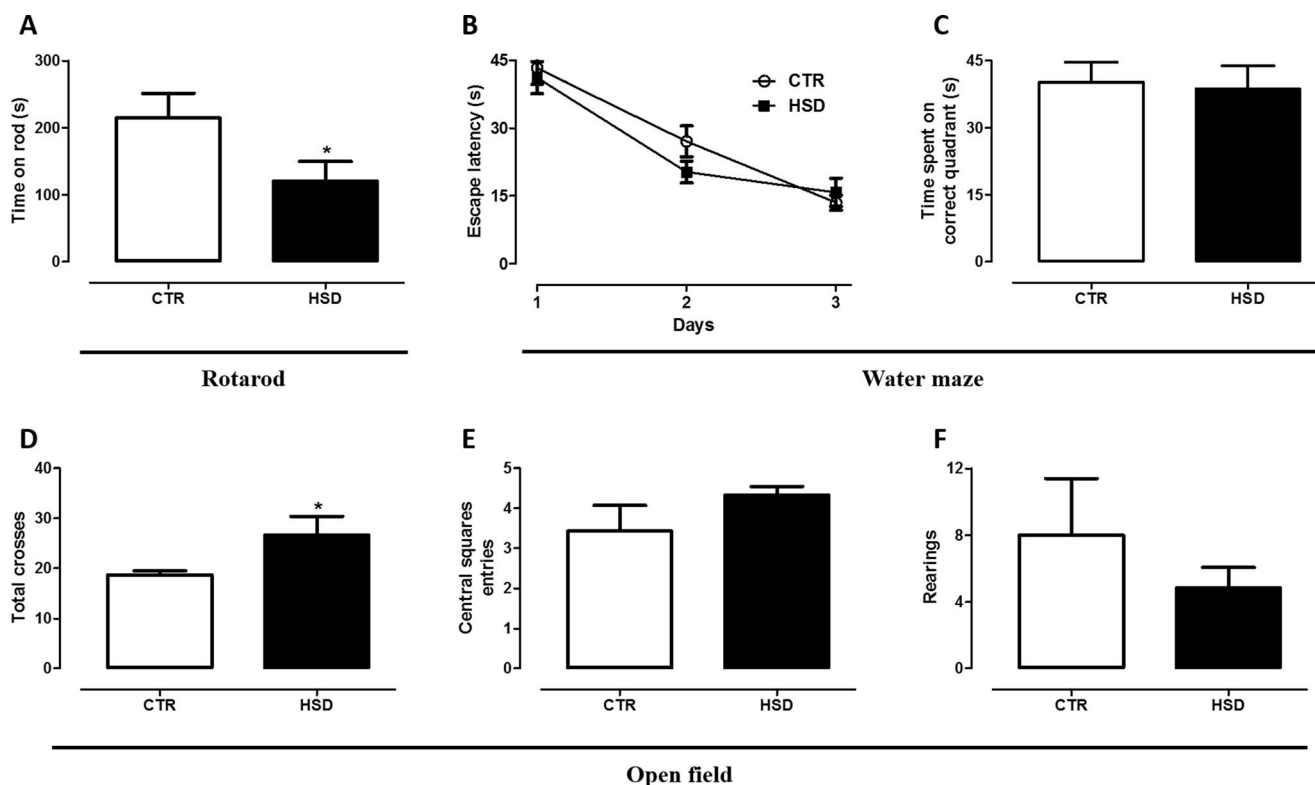


Fig. 5 Neuromotor, behavioral and cognitive parameters. **a** Time (s) on rod in rotarod test; **b** evolution of latency time (s) to find the hidden platform; **c**, time spent (s) in the correct quadrant in water maze test; **d**, total number of crosses, **e** entries in the central quadrant, and **f**, frequency

of rearings in open field test were assessed in rats fed a standard chow (CTR, $n = 9$) or high-sucrose diet (HSD, $n = 7$) for nine weeks from weaning (postnatal day 21). Points and bars represent mean $\pm$ SEM compared by unpaired t-test (one-tailed). * $p < 0.05$

between metabolic disturbances, low-grade inflammation and ER stress (Arruda et al. 2011a; Cnop et al. 2012; Velloso and Schwartz 2011); we next investigated potential early disruption of hippocampal ER homeostasis in our HSD-fed young rats.

Hippocampal gene expression of UPR sensors PERK and ATF6 were increased in our HSD rats, indicating an activated ER response to augmented protein traffic, though no change was seen in IRE1 α gene expression. Under stressing conditions, such as increased unfolded/misfolded protein traffic, GRP78 dissociates from IRE1 α , PERK and ATF6 to support correct protein folding; allowing UPR sensors to autophosphorylate and activate their modulatory effects on gene expression. Early UPR aims to decrease general protein translation but maintains the expression of genes related to chaperone and antioxidant functions as an attempt to further support its own pathways (Hetz 2012). These findings strengthen our data since PDIA2 was overexpressed, suggesting a supportive role against protein over load. However, GRP78 expression was decreased in HSD group, an unexpected finding if one takes into consideration its role on UPR pro-adaptive pathways. Upon persistent ER stress, cells undergo pro-apoptotic rather than pro-adaptive pathways, which result in higher expression of apoptosis-related genes such as CHOP and Caspase-3 (Hetz 2012). Noteworthy, our HSD rats showed increased expression of these two genes, which account for a deep impairment of ER homeostasis even at such young age. In a recent report, hippocampal CHOP expression was shown to promote a time-dependent inhibition of GRP78 expression in streptozotocin-induced diabetic mice (Zhao et al. 2015), which might explain the reduced GRP78 expression herein described. Furthermore, prolonged ER stress may turn off IRE1 α pathway, whereas sustaining PERK signaling (Lin et al. 2009). In fact, UPR transition from pro-adaptive to pro-apoptotic phase demands attenuation of IRE1 α signaling, while sustained PERK signaling favours upregulation of pro-apoptotic genes (Hetz 2012). Alternatively, CHOP overexpression would also be maintained by late ATF6 activation (Santos et al. 2009). Despite the pathway responsible for CHOP overexpression, it might be further involved in the Caspase-3 overexpression, as well as marginally decreased Bcl2 expression herein exhibited. Notwithstanding, a pro-apoptotic phenotype is also suggested by the failure of PERK to increase Nrf2 expression. As a whole, these alterations are thought to limit neuroplasticity and impair behavioral and cognitive functions in our HSD-fed rats.

HSD feeding did not affect spatial learning-memory, but limited the ability to stay on rod, an effect possibly related to the anxiogenic behavior demonstrated by our HSD rats in the open field test. In a recent study Zhang et al. (2015) showed that C57BL/6 mice fed a high-fat diet for 4 weeks demonstrated a worse performance on rod, an effect positively correlated with body weight. Contrariwise, our groups had no body weight difference, further supporting the occurrence of early neuromotor control impairment. However, it might also be

due to injury of specific hippocampus areas, such as anterior and ventral cingulate areas, which have been shown to be involved in memory for motor response as well as attention and emotional processing (Cenquizca and Swanson 2007). In humans, hippocampus has been shown to mediate motor sequence learning during training, accounting for sequential gain in performance (Albouy et al. 2008). Damage of such areas is probably involved in the impairment of motor skills of HSD rats on rotarod. Furthermore, ventral hippocampus plays a role in unconditioned anxiety and conditioned fear, which is consistent with hippocampal connections to amygdala and hypothalamus, important members of brain's anxiety and fear machinery (Zhang et al. 2014), besides to brain-stem sites mediating motor responses (Bast et al. 2009). Early studies have already shown that hippocampal lesions increase animal's ambulation in the open field test (Gray and McNaughton 1983). Similar injuries are probably responsible for the slightly greater anxiety demonstrated by our HSD rats in the same test. On the other hand, CA1 field seems to be somehow spared from HSD deleterious effects, at least at such young age, since no memory deficit was found in our HSD rats. This finding is corroborated by one demonstration that 12-week feeding of BALB/c mice with HSD did not alter their performance on water maze (Pyndt Jorgensen et al. 2014). Whether longer dietary interventional periods would lead to deeper impairments of the hippocampus-driven functions remains to be addressed in future studies.

In summary, this study reinforces the knowledge on the consequences of early introduction of high dietary levels of sucrose, thus fructose and glucose, on metabolic control of body functions. Moreover, it originally shows that the hippocampus homeostasis is particularly disrupted with very precocious development of ER stress, as well as neuromotor and behavioral impairments; expanding the branches of MetS-related disturbances. Whereas additional studies on progressive or late neurobehavioral impacts of HSD are still needed, this study also reaffirm the pertinence of DOHaD concept, which should strongly be taken into consideration by parents, pediatricians, public health professionals and policymakers for proper advising on the transition from breastfeeding to ready-to-eat foods.

Acknowledgments Authors are thankful to the LeFisio's staff for all the technical support during experimental procedures, especially to Caroline Vale, Danylo Noleto and Pâmela Santos. This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA through the grants PAEDT-00380/14, UNIVERSAL-00523/14, and UNIVERSAL-00792/14. TMM received fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest Authors declare the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- Alberti K et al. (2009) Harmonizing the metabolic syndrome a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; world heart federation. International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity Circulation 120:1640–1645
- Albouy G et al. (2008) Both the hippocampus and striatum are involved in consolidation of motor sequence memory. *Neuron* 58:261–272. doi:10.1016/j.neuron.2008.02.008
- Arruda AP et al. (2011a) Low-grade hypothalamic inflammation leads to defective thermogenesis, insulin resistance, and impaired insulin secretion. *Endocrinology* 152:1314–1326. doi:10.1210/en.2010-0659
- Arruda AP, Milanski M, Velloso LA (2011b) Hypothalamic inflammation and thermogenesis: the brown adipose tissue connection. *J Bioenerg Biomembr* 43:53–58. doi:10.1007/s10863-011-9325-z
- Bast T, Wilson IA, Witter MP, Morris RG (2009) From rapid place learning to behavioral performance: a key role for the intermediate hippocampus. *PLoS Biol* 7:e1000089. doi:10.1371/journal.pbio.1000089
- Bernardis L, Patterson B (1968) Correlation between Lee index and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol* 40:527–528
- Bizeau ME, Pagliassotti MJ (2005) Hepatic adaptations to sucrose and fructose. *Metabolism* 54:1189–1201. doi:10.1016/j.metabol.2005.04.004
- Bray GA (1991) Obesity, a disorder of nutrient partitioning: the MONA LISA hypothesis. *J Nutr* 121:1146–1162
- Bray GA (2010) Fructose: pure, white, and deadly? Fructose, by any other name, is a health hazard. *J Diabetes Sci Technol* 4:1003–1007
- Bray GA, York DA (1998) The MONA LISA hypothesis in the time of leptin. *Recent Prog Horm Res* 53:95–117; discussion 117–118
- Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM (2004) Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr* 79:537–543
- Calvo-Ochoa E, Arias C (2015) Cellular and metabolic alterations in the hippocampus caused by insulin signalling dysfunction and its association with cognitive impairment during aging and Alzheimer's disease: studies in animal models. *Diabetes Metab Res Rev* 31:1–13. doi:10.1002/dmrr.2531
- Calvo-Ochoa E, Hernandez-Ortega K, Ferrera P, Morimoto S, Arias C (2014) Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 34:1001–1008. doi:10.1038/jcbfm.2014.48
- Cenquizca LA, Swanson LW (2007) Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res Rev* 56:1–26
- Chan KA, Tsoulis MW, Sloboda DM (2015) Early-life nutritional effects on the female reproductive system. *J Endocrinol* 224:R45–R62. doi:10.1530/JOE-14-0469
- Christoffel KK, Wang X, Binns HJ (2012) Early origins of child obesity: bridging disciplines and phases of development – September 30–October 1, 2010. *Int J Environ Res Public Health* 9:1227–1262. doi:10.3390/ijerph9041227
- Cnop M, Foufelle F, Velloso LA (2012) Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med* 18:59–68. doi:10.1016/j.molmed.2011.07.010
- Cohen JC, Schall R (1988) Reassessing the effects of simple carbohydrates on the serum triglyceride responses to fat meals. *Am J Clin Nutr* 48:1031–1034
- Cooper C (2013) David barker (1938–2013). *Nature* 502:304. doi:10.1038/502304a
- Davidson TL, Chan K, Jarrard LE, Kanoski SE, Clegg DJ, Benoit SC (2009) Contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex to energy and body weight regulation. *Hippocampus* 19:235–252. doi:10.1002/hipo.20499
- de Lima DC, Silveira SA, Haibara AS, Coimbra CC (2008) The enhanced hyperglycemic response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex. *Metab Brain Dis* 23:361–373
- de Queiroz KB, Rodovalho GV, Guimarães JB, de Lima DC, Coimbra CC, Evangelista EA, Guerra-Sá R (2012) Endurance training blocks uncoupling protein 1 up-regulation in brown adipose tissue while increasing uncoupling protein 3 in the muscle tissue of rats fed with a high-sugar diet. *Nutr Res* 32:709–717
- Du T, Yuan G, Zhang M, Zhou X, Sun X, Yu X (2014) Clinical usefulness of lipid ratios, visceral adiposity indicators, and the triglycerides and glucose index as risk markers of insulin resistance. *Cardiovasc Diabetol* 13:146
- Gibson S, Gunn P, Wittekind A, Cottrell R (2013) The effects of sucrose on metabolic health: a systematic review of human intervention studies in healthy adults. *Crit Rev Food Sci Nutr* 53:591–614
- Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS (2007) Non-genomic transgenerational inheritance of disease risk. *BioEssays* 29:145–154. doi:10.1002/bies.20522
- Gray JA, McNaughton N (1983) Comparison between the behavioural effects of septal and hippocampal lesions: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 7:119–188
- Guerrero-Romero F et al. (2010) 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
- Hall C, Ballachey EL (1932) A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. University of California Publications in Psychology, Berkeley, University of California Press
- Hetz C (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:89–102
- Hetz Mollereau B (2014) Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 15:233–249. doi:10.1038/nrn3689
- Inadera H (2013) Developmental origins of obesity and type 2 diabetes: molecular aspects and role of chemicals. *Environ Health Prev Med* 18:185–197. doi:10.1007/s12199-013-0328-8
- Jocken JW, Blaak EE (2008) Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. *Physiol Behav* 94:219–230
- Kanarek RB, Orthen-Gambill N (1982) Differential effects of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate-induced obesity in rats. *J Nutr* 112:1546–1554
- Kanazawa M et al. (2003) Effects of a high-sucrose diet on body weight, plasma triglycerides, and stress tolerance. *Nutr Rev* 61:S27–S33
- Kanoski SE, Davidson TL (2011) Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiol Behav* 103:59–68. doi:10.1016/j.physbeh.2010.12.003
- Kuwabara T et al. (2011) Insulin biosynthesis in neuronal progenitors derived from adult hippocampus and the olfactory bulb. *EMBO Mol Med* 3:742–754. doi:10.1002/emmm.201100177
- Lin JH, Li H, Zhang Y, Ron D, Walter P (2009) Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability. *PLoS One* 4:e4170. doi:10.1371/journal.pone.0004170
- Mainardi M, Fusco S, Grassi C (2015) Modulation of hippocampal neural plasticity by glucose-related signaling. *Neural Plast* 2015:657928. doi:10.1155/2015/657928
- Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47–60
- Ozcan L, Tabas I (2012) Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annu Rev Med* 63:317

- Pawlak DB, Kushner JA, Ludwig DS (2004) Effects of dietary glycaemic index on adiposity, glucose homeostasis, and plasma lipids in animals. *Lancet* 364:778–785
- Pyndt Jorgensen B et al. (2014) A possible link between food and mood: dietary impact on gut microbiota and behavior in BALB/c mice. *PLoS One* 9:e103398. doi:[10.1371/journal.pone.0103398](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103398)
- Rippe JM, Angelopoulos TJ (2013) Sucrose, high-fructose corn syrup, and fructose, their metabolism and potential health effects: what do we really know? *Adv Nutr* 4:236–245. doi:[10.3945/an.112.002824](https://doi.org/10.3945/an.112.002824)
- Rizkalla SW, Luo J, Guilhem I, Boillot J, Bruzzo F, Chevalier A, Slama G (1992) Comparative effects of 6 week fructose, dextrose and starch feeding on fat-cell lipolysis in normal rats: effects of isoproterenol, theophylline and insulin. *Mol Cell Biochem* 109:127–132
- Roussel BD, Kruppa AJ, Miranda E, Crowther DC, Lomas DA, Marciniak SJ (2013) Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease. *Lancet Neurol* 12:105–118. doi:[10.1016/S1474-4422\(12\)70238-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70238-7)
- Santos CX, Tanaka LY, Wosniak J Jr, Laurindo FR (2009) Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal* 11:2409–2427
- Simental-Mendia LE, Rodriguez-Moran M, Guerrero-Romero F (2008) The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. *Metab Syndr Relat Disord* 6:299–304. doi:[10.1089/met.2008.0034](https://doi.org/10.1089/met.2008.0034)
- Srodulski S et al. (2014) Neuroinflammation and neurologic deficits in diabetes linked to brain accumulation of amylin. *Mol Neurodegener* 9:30
- Stephens DN (1980) Does the lee obesity index measure general obesity? *Physiol Behav* 25:313–315
- Tappy L, Le KA, Tran C, Paquot N (2010) Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. *Nutrition* 26:1044–1049. doi:[10.1016/j.nut.2010.02.014](https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.02.014)
- Thresher JS, Podolin DA, Wei Y, Mazzeo RS, Pagliassotti MJ (2000) Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance. *Am J Phys Regul Integr Comp Phys* 279: R1334–R1340
- Toida S, Takahashi M, Shimizu H, Sato N, Shimomura Y, Kobayashi I (1996) Effect of high sucrose feeding on fat accumulation in the male. *Wistar Rat Obesity Research* 4:561–568
- van der Harg JM et al. (2014) The unfolded protein response mediates reversible tau phosphorylation induced by metabolic stress. *Cell Death Dis* 5:e1393. doi:[10.1038/cddis.2014.354](https://doi.org/10.1038/cddis.2014.354)
- Vaughan M (1962) The production and release of glycerol by adipose tissue incubated in vitro. *J Biol Chem* 237:3354–3358
- Velloso LA, Schwartz MW (2011) Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. *Int J Obes* 35:1455–1465. doi:[10.1038/ijo.2011.56](https://doi.org/10.1038/ijo.2011.56)
- Yudkin J (1972) Sugar and disease. *Nature* 239:197–199
- Yudkin J (1983) Sugar and obesity. *Lancet* 2:794
- Zhang WN, Bast T, Xu Y, Feldon J (2014) Temporary inhibition of dorsal or ventral hippocampus by muscimol: distinct effects on measures of innate anxiety on the elevated plus maze, but similar disruption of contextual fear conditioning. *Behav Brain Res* 262:47–56. doi:[10.1016/j.bbr.2013.10.044](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.10.044)
- Zhang Y, Fischer KE, Soto V, Liu Y, Sosnowska D, Richardson A, Salmon AB (2015) Obesity-induced oxidative stress, accelerated functional decline with age and increased mortality in mice. *Arch Biochem Biophys* 576:39–48. doi:[10.1016/j.abb.2014.12.018](https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.018)
- Zhao Y, Yan Y, Zhao Z, Li S, Yin J (2015) The dynamic changes of endoplasmic reticulum stress pathway markers GRP78 and CHOP in the hippocampus of diabetic mice. *Brain Res Bull* 111:27–35. doi:[10.1016/j.brainresbull.2014.12.006](https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2014.12.006)

4.2. Capítulo II

- Artigo submetido no periódico ***Scientific Reports***
- Qualis Capes 2015 – Medicina I: **Classificação A1**
- Fator de impacto: **5.578**
- Título: **“Hippocampal endoplasmic reticulum stress accelerates motor and cognitive decline in adult rats sustainedly exposed to high-sucrose diet.”**
- Autores: **Bruno Araújo Serra Pinto, Thamys Marinho Melo, Karla Frida Torres Flister, Lucas Martins França, Vanessa Ribeiro Moreira, Daniela Kajihara, Adriana Leandro Camara, Silma Regina Ferreira Pereira, Francisco Rafael Martins Laurindo, Antonio Marcus de Andrade Paes**

ORIGINAL RESEARCH

Hippocampal endoplasmic reticulum stress accelerates motor and cognitive decline in adult rats sustainedly exposed to high-sucrose diet.

AUTHORS

Bruno Araújo Serra Pinto¹, Thamys Marinho Melo¹, Karla Frida Torres Flister¹, Lucas Martins França¹, Vanessa Ribeiro Moreira², Daniela Kajihara³, Adriana Leandro Camara¹, Silma Regina Ferreira Pereira², Francisco Rafael Martins Laurindo³, Antonio Marcus de Andrade Paes^{1*}.

AFFILIATIONS

¹Laboratory of Experimental Physiology, Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís (MA), Brazil; ²Laboratory of Genetics and Molecular Biology, Department of Biology, Federal University of Maranhão, São Luís (MA), Brazil; ³Laboratory of Vascular Biology, Heart Institute of the School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo (SP), Brazil.

***Correspondence:** Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes, Federal University of Maranhão, Av. dos Portugueses 1966, Bacanga, 65080-805, São Luís (MA), Brazil.
Phone/Fax: +55 (98) 3272 8547; E-mail: marcuspaes@ufma.br

ABSTRACT

This study investigates the deleterious effects of early and prolonged exposure to high-sucrose diet on motor and cognitive functions of adult rats and its relationship with hippocampal endoplasmic reticulum (ER) stress. Weaned Wistar male rats fed with high-sucrose diet until adulthood (HSD; 6-months-old) were compared to both age-mated lean adult rats and middle-aged lean rats (OLD; 20-months-old). Metabolic syndrome (MetS) development; serum redox profile; behavioral, motor and cognitive functions; and hippocampal gene/protein expressions for ER stress pro-adaptive and pro-apoptotic pathways, as well as senescence markers were assessed. Prolonged exposure to HSD induced MetS with marked body weight gain associated to central obesity, hypertriglyceridemia-based dyslipidemia, insulin resistance and oxidative stress. HSD rats showed motor and cognitive decline similar to OLD animals. Noteworthy, HSD rats presented marked hippocampal ER stress characterized by failure of pro-adaptive signaling and increased expression of Chop, Parp-1 and p21, markers of cell death and aging, whereas the anti-apoptotic factor Bcl2 was reduced. This panorama was alike that found in OLD rats. *In toto*, our data showed that early and sustained exposure to high-sucrose diet induces MetS, which subsequently disrupt hippocampus homeostasis leading to premature impairment of motor and cognitive functions in adult rats.

KEYWORDS

High-sucrose diet; Metabolic syndrome, Hippocampus, ER stress, Cognitive and motor impairments.

INTRODUCTION

Metabolic syndrome (MetS) is a worldwide alarming public-health concern related to excess energy intake associated to sedentary lifestyle, which lead to metabolic dysfunctions highly associated with increased risk of cardiovascular diseases, type 2 diabetes mellitus (T2DM), and all-cause mortality (1). Clinical criteria for MetS demands the presence of at least three out of the following: insulin resistance (IR), central adiposity, impaired glycemic profile, atherogenic dyslipidemia, nonalcoholic steatohepatitis and hypertension (2). Nevertheless, recent studies have increasingly shown an association of MetS dysfunctions, especially T2DM and obesity, with impaired cognitive function and all-types dementias, independently from advanced age (3).

Hippocampus is a key cerebral area classically responsible for cognitive processing made by its two-third dorsal area, but whose role have been expanded by studies showing that neurons projecting from hippocampal ventral region toward amygdala and ventral striatum are involvement in motor and behavioral modulation (4, 5). Moreover, hippocampus also acts as a neuroendocrine interconnector between metabolic signals and cognitive functions, particularly in obesity models based on dietary fructose (6). The importance of this relationship is further supported by the description that mature neurons from dentate gyrus are able to produce and secrete insulin (7). Currently, it is well established that metabolic dysfunctions; such as progressive IR, lipolysis inhibition, impaired control of hepatic glucose production and triglyceride secretion; are directly involved in cellular aging (8), through mechanisms potentially shared by aging- and obesity-triggered processes (9). Meanwhile the

pathways involved in this shared deteriorating signaling is still unclear, endoplasmic reticulum (ER) stress has emerged as a potential underlying condition linking those pathways.

ER stress can be defined as an unbalance between misfolded proteins overload in ER lumen and its limited capacity to handle such aberrant proteins (10). To control ER stress, a complex network of adaptive signaling, known as unfolded protein response (UPR), is activated in ER lumen to rescue ER homeostasis and ensure cell survival (11). However, under persistent unresolved ER stress, UPR migrates from an adaptive to a pro-apoptotic pattern that ultimately leads to early cell death (12). Recently, ER stress has emerged as a key agent to IR onset, by acting as a negative modulator of insulin signaling (13, 14). Aging, in a similar way, takes to progressive declines in expression/activity of ER chaperoning system and subsequently, compromise proper protein folding and UPR-adaptive responses (15). Several neurodegenerative age-related diseases have been associated with this aberrant protein accumulation, particularly Alzheimer and Parkinson's diseases (16).

In a previous report, we showed that MetS induced by early exposure to high-sucrose diet triggers ER stress pathways leading to activation of hippocampal pro-apoptotic signaling and mild motor and behavioral impairments but with no cognitive deficit in young rats (3-months-old) (17). Thus, in the present study we supportively show that sustained exposure to the same diet until 6-months-old deepened ER stress-driven hippocampal damage and accelerated cognitive decline in a fashion very similar

89 to 20-months-old lean rats, which emphasize the dysfunctional outcomes of early MetS
90 onset on neuromotor and cognitive health of young-to-adult subjects.

RESULTS

Early and sustained exposure to high-sucrose diet induces metabolic syndrome phenotype in adult rats

Early and sustained feeding of weaned rats with high-sucrose diet induced MetS-related disorders assessed at adulthood (6 months-old) mainly characterized by increased body weight associated to higher Lee Index, which infers obesity development, besides reduced caloric intake in HSD rats, as compared to CTR (Figure 1A-C). Additionally, HSD rats showed increased visceral and non-visceral fat pads accumulation (Figure 1D-F), as well as heavier livers (Figure 1G) containing expressively more ectopic fat (Figure 1H) than CTR ones. On the other hand, posterior skeletal muscles were atrophied in HSD (Figure 1I).

In accordance to the obese phenotype, HSD rats presented higher blood glucose levels in both fasting and fed states (Figure 2A and D, respectively), which was consistent with their impaired glucose tolerance, as assessed in the *ip*GTT test (Figure 2B and C). Curiously, insulin-induced glucose disappearance rate (*kl*TT) did not differ between groups (Figure 2E and F), whereas HSD rats were hyperinsulinemic in comparison to CTR (Figure 2G). Notwithstanding, calculation of HOMA Indexes suggested an increased secretory capacity of pancreatic β -cells (Figure 2H) and lower peripheral insulin sensitivity (Figure 2I) induced by sustained HSD feeding.

To further characterize the metabolic changes caused by early and sustained consumption of sucrose, animals' lipid profile was assessed. Serum triglycerides and free fatty acid levels were augmented by nearly 241.7% and 109.9%, respectively, in

HSD group (Figures 2J and K), while no differences were detected for total cholesterol and its fractions (data not shown). Finally, as an attempt to associate triglyceride production with hepatic insulin sensitivity, calculation of TyG Index showed HSD group to present higher values (Figure 2L), which was consistent with hepatic IR. In a whole, this set of data supports that early and sustained exposure to high-sucrose diet induces MetS, mainly characterized by central obesity, disturbance of glucose-insulin axis, and peripheral as well as hepatic IR.

Metabolic syndrome induced by high-sucrose consumption promotes serum redox unbalance and oxidative damage

Assessment of serum redox profile showed HSD group had increased SOD and CAT activities by approximately 15% and 28%, respectively (Figures 3A and B), whereas GPx activity was reduced in nearly 62% (Figure 3C). Accordingly, HSD rats presented higher lipid peroxidation, as demonstrated by a 20% increase of MDA levels in comparison to CTR (Figure 3D).

Metabolic syndrome induced by high-sucrose consumption impairs motor, behavioral and cognitive functions

In order to verify central repercussions of MetS phenotype induced by early and sustained exposure to high-sucrose consumption, both CTR and HSD rats were subjected to neurofunctional tests and additionally compared with the performances of the OLD group. In rotarod test, time spent on rod was decreased in 48.9% and 99.1% in HSD and OLD groups, respectively (Figure 4A), depicting substantial motor deficit. Meanwhile, animals' performance in the open field test revealed increased anxiogenic

behavior in HSD group, characterized by a 62% higher ambulation, an outcome not observed in OLD rats when both groups were compared to CTR (Figure 4D). Nevertheless, other anxiety-related stereotyped behaviors were not observed in any group.

Cognitive capacity, represented by spatial learning and memory retention, was assessed through the water maze test. HSD rats spent more time to find the hidden platform throughout the 3-days trial period, as compared to CTR (Figure 4B). Noteworthy, OLD rats did not show the same adaptive behavior observed in the others, since the time spent to find the platform did not decay in the 2nd and 3rd days. At 4th day, memory assessment displayed both HSD and OLD rats had significant impairment of memory consolidation, since these animals spent, respectively, 38% and 25% less time in the correct quadrant in relation to CTR (Figure 4C).

Failure of pro-adaptive and activation of pro-apoptotic pathways anticipates hippocampal senescence in cognitively deficient HSD rats

Hippocampus role is not restricted to cognitive functions but rather influence other brain areas responsible for metabolic, motor, and behavioral control (18). Thus, we next investigated whether the disruption of hippocampus homeostasis underlies the cognitive impairment observed in HSD, as well as OLD rats. Assessment of several markers involved in pro-adaptive UPR signaling showed reduced gene expression of UPR sensors (Ire1 α , Perk and Atf6) in both HSD and OLD groups to levels lesser than half that found in CTR (Figures 5A-C). Gene expression of ER chaperones (Grp78, Pdi A2, Calnexin and Calreticulin) was similarly reduced in HSD, while only Pdi A2 and

Calnexin were decreased in OLD rats (Figures 5D-G), a finding further supported by decreased protein expression of chaperones Grp94 and Grp78 in the same groups (Supplementary Figure 1). Bdnf, a factor related to neural plasticity, was significantly less expressed in HSD and OLD rats (Figure 5H), meanwhile expression of Nrf2, a nuclear factor related to antioxidant defense, was unchanged in HSD but increased in OLD rats (Figure 5I).

Regarding the triggering of UPR pro-apoptotic pathways, hippocampal gene expression of Bcl2, an important anti-apoptotic factor, was reduced in HSD and OLD groups (Figure 6A); an effect oppositely corroborated by increased gene (Figure 6B) and protein (Supplementary Figure 2) expressions of Chop, an apoptotic factor, in HSD, but not in OLD rats. Surprisingly, Caspase 3 gene expression was strongly decreased in the same groups (Figure 6C). Assessment of p53 and p21 gene expression, two genes intimately related to cell senescence, showed they were, as expected, augmented in the OLD group (Figures 6D and E). It is noteworthy that p21 gene expression was also increased in HSD, suggesting an accelerated neuronal aging. Notwithstanding, Parp-1 protein expression revealed a 40-kDa band, which is compatible with its cleavage by calpain, an important marker of cell necrosis (19).

DISCUSSION

The exponential rise of worldwide sucrose consumption during the last decades has been directly correlated to the epidemic growth of MetS and its associated dysfunctions, affecting individual quality of life and health insurance systems (20, 21). Besides its peripheral metabolic damages, MetS has also been classified as an age-related illness with important impact on cognitive decline in both humans and rodents (6). Nevertheless, we have recently shown that rats fed a high-sucrose diet since weaning already presented MetS along with motor and behavioral impairments at young age (3-months-old), which were ascribed to hippocampal ER stress (17). Thus, in this study, we expanded those findings by showing that rats' exposure to the same diet until adulthood (6-months-old) not only aggravates metabolic dysfunctions and serum oxidative profile, but worsens hippocampus-driven neuronal functions, especially cognition, as consequence of the precocious failure of UPR pro-adaptive responses, as well as increased expression of neuronal aging and cell death markers.

Exposure of HSD rats to high-sucrose diet until 6-months-old deepened the obesogenic phenotype as compared to previously described young HSD animals (17). Particularly, HSD body weight gain was mainly associated with strong central obesity and IR, which concurred with hypertriglyceridemia-based dyslipidemia, glucose intolerance, hyperinsulinemia, and ectopic accumulation of fat in the liver, features not found in CTR rats. Those alterations might be primarily attributed to the high consumption of sucrose, since glucose elicits insulin release toward its own uptake by insulin-sensitive tissues, whereas fructose is promptly uptaken via hepatic GLUT-2 and

partially converted into fatty acids through *de novo* lipogenesis that favors triglycerides synthesis and VLDL secretion (22). Noteworthy, fructose-induced *de novo* lipogenesis and its metabolic outcomes have been shown to be exacerbated upon co-ingestion with glucose than fructose alone (23).

In addition to MetS development, our adult HSD rats showed motor and cognitive impairment compatible with the middle-aged (20-months-old) OLD rats. Motor deficit in rotarod test is generally associated with increased body mass, skeletal muscle atrophy – both of them found in adult HSD rats – as well as motor neuron degeneration (24). Nevertheless, since young HSD rats displayed deficient performance on rod, without increased body mass or muscle atrophy (17), we speculate that degeneration of motor-controlling brain areas would be the primary cause. This assumption is corroborated by findings that mice fed a high-fat diet for 10 months poorly performed on rotarod in a way not correlated with adipose mass increase (25). Fructose-induced obesity has also been related to long-term spatial memory impairment subsequent to hippocampal IR (26-28) which results from elevated triglycerides levels that penetrate the blood-brain barrier and interfere with insulin signaling (27). Other MetS risk factors, such as hyperglycemia, hyperinsulinemia, and peripheral IR might contribute for hippocampal IR development as well (29, 30). Accordingly, high sucrose intake did not impair cognitive functions on young HSD rats (17), which were later characterized as yet non-insulin resistant (unpublished data), but did in the adult HSD rats herein described. Besides IR, serum oxidative stress has also been enrolled as a potential trigger of cognitive decline secondary to hippocampal homeostasis disruption (31).

ER stress pathways have emerged as a common mechanism underlying neuronal damage induced by oxidative stress, IR and/or aging (15, 32). Our adult HSD rats presented remarkable hippocampal ER stress mainly characterized by failure of pro-adaptive signaling, as depicted from very low gene expression of UPR-sensors, chaperones and Bdnf. On the other hand, gene expression of Chop and p21, both of them markers of cell death and aging, were increased, whereas the anti-apoptotic factor Bcl2 was reduced. OLD rats presented a very similar profile, excepting that Chop expression was not increased. Unexpectedly, caspase 3 expression was heavily decreased in both HSD and OLD groups. Hippocampus of 6-months-old diabetic *db/db* mice has been shown to have decreased gene/protein expression of pro-adaptive sensors Grp78, Grp94 and Xbp1, as well as lower Xbp1 spliced/unspliced ratio (33); similarly to the profile found in cortical brain samples from 24-months-old non-obese/non-diabetic C57bl/6 mice, which displayed reduction of eIF2 α phosphorylation and Grp78 expression along with increased expression of Chop and Caspase 12 (34). Alike, progressive failure of neuronal UPR pro-adaptive pathways has been also noticed in middle-aged (35) and aged Wistar rats (36), rendering this as a hallmark of idiopathic neuronal aging.

The scenario in our adult HSD rats demonstrates a worsen and irreversible hippocampal damage, since they further presented high expression of a 40 kDa fragment of Parp-1, a finding consistent with its cleavage by calpain (19), which may lead to inhibition of Parp-1 role on genome integrity maintenance, as well as generalized proteolysis followed by necrosis and/or apoptosis in a caspase-independent way (37).

Increase Parp-1 cleavage by calpain has also been found in brain ischemia and neurodegenerative diseases such as Alzheimer, Parkinson and Huntington's disease (37-39). All cognitive impairments found in both HSD and OLD groups seem to be intrinsically linked to the reduced expression of Bdnf, a capital factor for neurogenesis, cellular differentiation, and hippocampal plasticity that promotes Ire1 α phosphorylation and Xbp1 splicing toward UPR-pro-adaptive responses (40-42). Notwithstanding, augmented gene expression of p21, despite unchanged p53, in adult HSD rats supports acceleration of hippocampal senescence and telomere shortening by sustained exposition to high-sucrose diet and agrees with demonstration of premature aging in obese *Agouti* mice (43).

Collectively, data herein shown reinforce the harmful consequences of early and sustained introduction of refined sugars to daily diets. To the best of our knowledge, this work originally shows that MetS induced by high sucrose intake accelerates hippocampal aging and establishes a series of biochemical and functional impairments subsequent to the disruption of ER homeostasis. Furthermore, it corroborates the hypothesis that obesity and correlated metabolic disturbances hastens cellular aging by subsequently promote ROS over generation, antioxidant defense insufficiency, and ultimately DNA damage and aging (9), to which we add UPR ineptitude as an underlying mechanism. Finally, in spite of the fact that this study has successfully established a direct relationship between cognitive losses and MetS-driven hippocampal ER stress, it still remains unknown whether diet exchange for a low-sugar one would mitigate/revert this morbid condition.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Experimental Design

Weaned male Wistar rats provided by the animal facility house of the Federal University of Maranhão [postnatal day (pnd) 21; 51.07 ± 0.57 g] were randomized into two groups: control rats (CTR; $n = 7$), fed a standard chow (Nuvital®, Nuvilab, Brazil) composed by 55.4% total carbohydrate (10% sucrose), 21% proteins, 5.2% total lipids, totaling $1473.5 \text{ kJ} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$; or high-sucrose diet rats (HSD, $n = 7$), fed a high-sucrose but isocaloric chow composed by 65% total carbohydrates (25% sucrose), 12.3% proteins, 4.3% total lipids, totaling $1456.7 \text{ kJ} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, as previously described (17). Both groups were followed for 24 weeks until 6-months-old. To provide an aging control, an additional group of 20-months-old non-obese rats (OLD, $n = 7$) was introduced 30 days before the end of the experimental period. Animals were maintained in a controlled room ($21 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 60% humidity and 12h light/dark cycle) with water and chow *ad libitum*.

Throughout dietary interventional period, body weight and energy intake were assessed twice a week. Lee index ($\text{body weight (g)}^{1/3} \cdot \text{naso-anal length (cm)}^{-1} \cdot 1000$) was calculated every month for assessment of obesity development (44). Behavioral and cognitive tests were performed during the last week before euthanasia. Paralleling, animals were also subjected to intraperitoneal glucose and insulin tolerance tests. At pnd 180, overnight fasted animals were anesthetized (40:10 mg/kg ketamine:xylazine solution) for blood and tissue collection upon laparotomy, as well as craniotomized for hippocampus dissection. Retroperitoneal, periepididymal and mesenteric white adipose tissue fat pads, liver and posterior skeletal muscles (gastrocnemius and soleus) were

weighed for morphometric assessment and expressed as tissue mass (g) per 100 g body weight. Liver samples were also used for fat liver content measurement. Serum samples were used for the assessment of biochemical, hormonal and redox profiles, whereas hippocampi homogenates were used for gene/protein expression protocols. All procedures were performed in accordance with the rules of Brazilian Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and approved by the Ethical Committee on Animal Use and Welfare of the Federal University of Maranhão, under ruling number 23115.009595/2014-81.

Assessment of behavioral, cognitive and motor functions

In order to assess exploratory and anxiety-like behavior, animals were individually placed at the center of a lit Plexiglas circular arena (140 cm²), divided in 9 quadrants, for 5 min. The total number of quadrant crossings, frequency of entrances in the central quadrant and stereotyped behaviors were recorded for subsequent analysis (45). Rotarod equipment was used to assess the neuromotor activity. Briefly, animals were accommodated on rod and trained 3 times a day for 4 consecutive days. At day 5, animals were fasted for 2h before experimental performance, when the rod was set at 12 rpm and the latency to fall was recorded in seconds for a maximum of 5 min (46).

To assess spatial learning/memory functions, animals were subjected to water maze test (47). The apparatus consisted of a circular fiberglass pool filled with water and divided into four quadrants with presence of visible clues to the rats in the walls. A hidden escape platform was submerged so that it reached 1.5 cm below the water surface in the pre-set quadrant. Animals were trained for 3 consecutive days, when they

were individually released into the water from one of the four quadrants, facing maze wall, and allowed to swim for 60 s to find the hidden platform. Rats that failed to locate the platform were gently guided to the platform and allowed to stay on it for 30 s. Each rat received 4 trials per day for 3 consecutive days. Latency to find the hidden platform was recorded for spatial learning assessment. At day 4, the platform was removed and the animals released in the center of the pool to swim for 120 s. The time spent in the quadrant where platform was expected to be was recorded for memory retention assessment.

Assessment of serum biochemical and redox profiles

Serum samples were used for colorimetric measurement of triglycerides, total cholesterol and fractions (Labtest, Brazil) and free fatty acids (Sigma-Aldrich, USA) levels according to manufacturer's instructions. Insulin levels were assessed by radioimmunoassay using ^{125}I -labeled human insulin as tracer, rat insulin as standard and rat insulin antibody, as elsewhere described (48). Redox profile was assessed by measuring serum malondialdehydes levels (MDA) (49), as well as antioxidant enzymes activities, namely superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), according to manufacturer's instructions (Cayman Chemical, USA).

Assessment of glucose-insulin axis function

For intraperitoneal glucose tolerance test (*ip*GTT), animals were submitted to 8h fasting prior to administration of glucose 2 g/kg. Tail vein blood drops were collected immediately before (time 0) and 15, 30, 60 and 120 min after glucose bolus for glucose measurement through glucometer (Accucheck Active[®], Roche Diagnostic, Germany).

Data were expressed as area under glycemic curve (AUC). Similar procedure was carried out for intraperitoneal insulin tolerance test (*ip*ITT), excepting animals were fed and received 1 UI/kg insulin (Humulin 70/30[®], Lilly, USA). Glucose disappearance rate (*k*ITT) was derived from ITT curve and calculated as $0.693/t_{1/2}$ (50). Peripheral insulin sensitivity was inferred by calculation of homeostasis model assessment (HOMA) Index (HOMA-IR = fasting glucose (mM)·fasting insulinemia (μU/ml)·22.5⁻¹) and HOMA Index of β-cell function (HOMA-B = (fasting insulin (μU/ml)·20)·(fasting glucose (mM) – 3.5)⁻¹ (51). Hepatic IR was inferred from TyG index calculation [$\ln \cdot (\text{fasting glucose (mg/dL)} \cdot \text{fasting triglyceride (mg/dL)}) \cdot 2^{-1}$] (52).

Assessment of liver fat content

Liver fat accumulation was assessed from 500 mg liver samples, as previously described (53). Briefly, samples were homogenized with chloroform/methanol solution (2:1) and resulting supernatant was paper-filtered and diluted in 0.9% NaCl (5:1). The organic phase was collected, air-flow oven-dried at 40 °C and for the measurement of the total fat content (mg) per tissue mass (g). The total fat was resuspended in Triton X/methanol (2:1) for colorimetric measurement of triglycerides and total cholesterol. Results were expressed as triglycerides (mg) per tissue mass (g) and total cholesterol (mg) per tissue mass (g).

Gene expression by real time PCR (qPCR)

Hippocampi samples ($n = 5$) were used for RNA extraction using Trizol[®] (Invitrogen, Germany) as manufacturer's instructions. RNA samples (3 μg) were converted into cDNA using Super Script II Reverse Transcriptase[®] (Invitrogen,

Germany). The qPCR amplification and Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Germany) detection were performed using the 7500 Realtime PCR Applied Biosystems[®], USA. Reactions were incubated at 50 °C for 2 min and 95°C for 2 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. To melt curve stage, reactions were incubated at 95 °C for 15s, 60 °C for 60 min and 95 °C for 15 s. Primers were designed using Primer Express[®] software (Applied Biosystem, USA) and manufactured by Invitrogen, Brazil (Supplementary Table 1). All samples were normalized to the relative levels of GAPDH and results were expressed as the fold change (FC) values of $2^{-\Delta\Delta CT}$, as determined by real-time amplification.

Protein expression by immunoblotting

Hippocampi samples ($n = 5$) were homogenized in lysis buffer containing protease inhibitors (1 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL leupeptin, and 10 mM PMSF). After protein quantification by Bradford reagent method, aliquots (30 µg) were diluted in sample buffer, subjected to 12% SDS–PAGE, and transferred to nitrocellulose membranes. Detection of specific proteins was performed by incubating membranes with primary antibodies [anti-Kdel (1:1000; Enzo Life Sciences, USA), anti-Pdi (1:1000; Thermo Fisher Scientific, USA), anti-Chop (1:1000; Thermo Fisher Scientific, USA) and anti-Parp-1 (1:2500; Calbiochem, USA)], followed by peroxidase-conjugated secondary antibodies and revealed by chemiluminescence method (peroxidase-H₂O₂-luminol). Results were expressed as a relative density. Equal amount of protein in each lane was confirmed by hybridization with an anti-β-Actin (1:1000; Sigma Aldrich, USA).

Statistical analysis

374 Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism 7.0 software
375 (GraphPad Software Inc., USA). Data were expressed as mean $\pm$ SEM and submitted to
376 normality test (Kolmogorov-Smirnov) followed by parametrical analysis through unpaired
377 t test (one-tailed) or one-way ANOVA (post test Newman-Keuls) for a significance level
378 of 5% ($p < 0.05$).

REFERENCES

1. Alberti KGM, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome-a new worldwide definition. *The Lancet*. 2005;366(9491):1059.
2. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009;120(16):1640-5.
3. Panza F, Frisardi V, Capurso C, Imbimbo BP, Vendemiale G, Santamato A, et al. Metabolic syndrome and cognitive impairment: current epidemiology and possible underlying mechanisms. *Journal of Alzheimer's disease*. 2010;21(3):691-724.
4. Moser MB, Moser EI. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*. 1998;8(6):608-19.
5. Strange BA, Witter MP, Lein ES, Moser EI. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*. 2014;15(10):655-69.
6. Lakhan SE, Kirchgessner A. The emerging role of dietary fructose in obesity and cognitive decline. *Nutrition journal*. 2013;12(1):114.
7. Kuwabara T, Kagalwala MN, Onuma Y, Ito Y, Warashina M, Terashima K, et al. Insulin biosynthesis in neuronal progenitors derived from adult hippocampus and the olfactory bulb. *EMBO Mol Med*. 2011;3(12):742-54.
8. Picard F, Guarente L. Molecular links between aging and adipose tissue. *International Journal of Obesity*. 2005;29:S36-S9.

- 402 9. Ahima RS. Connecting obesity, aging and diabetes. *Nature medicine*.
403 2009;15(9):996-7.
- 404 10. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER
405 stress and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(2):89-102.
- 406 11. Malhotra JD, Kaufman RJ, editors. The endoplasmic reticulum and the unfolded
407 protein response. *Seminars in cell & developmental biology*; 2007: Elsevier.
- 408 12. Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human
409 disease. *J Cell Biol*. 2012;197(7):857-67.
- 410 13. Flamment M, Hajduch E, Ferré P, Foulfelle F. New insights into ER stress-induced
411 insulin resistance. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2012;23(8):381-90.
- 412 14. Salvadó L, Palomer X, Barroso E, Vázquez-Carrera M. Targeting endoplasmic
413 reticulum stress in insulin resistance. *Trends in Endocrinology & Metabolism*.
414 2015;26(8):438-48.
- 415 15. Brown MK, Naidoo N. The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-
416 related diseases. *Frontiers in physiology*. 2012;3.
- 417 16. Hetz, Mollereau B. Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in
418 neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15(4):233-49.
- 419 17. Pinto BAS, Melo TM, Flister KFT, França LM, Kajihara D, Tanaka LY, et al. Early
420 and sustained exposure to high-sucrose diet triggers hippocampal ER stress in
421 young rats. *Metabolic brain disease*. 2016:1-11.
- 422 18. Cenquizca LA, Swanson LW. Spatial organization of direct hippocampal field CA1
423 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain research reviews*.
424 2007;56(1):1-26.

- 425 19. McGinnis KM, Gnegy ME, Park YH, Mukerjee N, Wang KK. Procaspase-3 and poly
426 (ADP) ribose polymerase (PARP) are calpain substrates. *Biochemical and*
427 *biophysical research communications*. 1999;263(1):94-9.
- 428 20. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in
429 beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr*.
430 2004;79(4):537-43.
- 431 21. Bray GA. Fructose: pure, white, and deadly? Fructose, by any other name, is a
432 health hazard. *J Diabetes Sci Technol*. 2010;4(4):1003-7.
- 433 22. Tappy L, Le KA, Tran C, Paquot N. Fructose and metabolic diseases: new findings,
434 new questions. *Nutrition*. 2010;26(11-12):1044-9.
- 435 23. Kolderup A, Svihus B. Fructose metabolism and relation to atherosclerosis, type 2
436 diabetes, and obesity. *Journal of nutrition and metabolism*. 2015;2015.
- 437 24. Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide.
438 *Nature Reviews Neuroscience*. 2009;10(7):519-29.
- 439 25. Zhang Y, Fischer KE, Soto V, Liu Y, Sosnowska D, Richardson A, et al. Obesity-
440 induced oxidative stress, accelerated functional decline with age and increased
441 mortality in mice. *Arch Biochem Biophys*. 2015;576:39-48.
- 442 26. Stranahan AM, Norman ED, Lee K, Cutler RG, Telljohann RS, Egan JM, et al. Diet-
443 induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in
444 middle-aged rats. *Hippocampus*. 2008;18(11):1085-8.

- 445 27. Agrawal R, Gomez-Pinilla F. 'Metabolic syndrome' in the brain: deficiency in omega-3
446 fatty acid exacerbates dysfunctions in insulin receptor signalling and cognition. *The*
447 *Journal of physiology*. 2012;590(10):2485-99.
- 448 28. Jurdak N, Lichtenstein AH, Kanarek RB. Diet-induced obesity and spatial cognition
449 in young male rats. *Nutritional neuroscience*. 2008;11(2):48-54.
- 450 29. Greenwood CE, Winocur G. Learning and memory impairment in rats fed a high
451 saturated fat diet. *Behavioral and neural biology*. 1990;53(1):74-87.
- 452 30. Greenwood CE, Winocur G. Cognitive impairment in rats fed high-fat diets: a
453 specific effect of saturated fatty-acid intake. *Behavioral neuroscience*.
454 1996;110(3):451.
- 455 31. Huang T-T, Leu D, Zou Y. Oxidative stress and redox regulation on hippocampal-
456 dependent cognitive functions. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2015;576:2-
457 7.
- 458 32. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*.
459 2006;444(7121):860-7.
- 460 33. Sims-Robinson C, Zhao S, Hur J, Feldman E. Central nervous system endoplasmic
461 reticulum stress in a murine model of type 2 diabetes. *Diabetologia*.
462 2012;55(8):2276-84.
- 463 34. Naidoo N, Ferber M, Master M, Zhu Y, Pack AI. Aging impairs the unfolded protein
464 response to sleep deprivation and leads to proapoptotic signaling. *The Journal of*
465 *Neuroscience*. 2008;28(26):6539-48.

- 466 35. Hussain SG, Ramaiah KV. Reduced eIF2 α phosphorylation and increased
467 proapoptotic proteins in aging. *Biochemical and biophysical research*
468 *communications*. 2007;355(2):365-70.
- 469 36. Gavilan MP, Vela J, Castaño A, Ramos B, Juan C, Vitorica J, et al. Cellular
470 environment facilitates protein accumulation in aged rat hippocampus. *Neurobiology*
471 *of aging*. 2006;27(7):973-82.
- 472 37. Chaitanya GV, Alexander JS, Babu PP. PARP-1 cleavage fragments: signatures of
473 cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling*.
474 2010;8(1):31.
- 475 38. Yamashima T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in
476 ischemic neuronal death of primates. *Progress in neurobiology*. 2000;62(3):273-95.
- 477 39. Phulwani NK, Kielian T. Poly (ADP-ribose) polymerases (PARPs) 1-3 regulate
478 astrocyte activation. *Journal of neurochemistry*. 2008;106(2):578-90.
- 479 40. Hayashi A, Kasahara T, Iwamoto K, Ishiwata M, Kametani M, Kakiuchi C, et al. The
480 role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced XBP1 splicing during brain
481 development. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(47):34525-34.
- 482 41. Hayashi A, Kasahara T, Kametani M, Kato T. Attenuated BDNF-induced
483 upregulation of GABAergic markers in neurons lacking Xbp1. *Biochemical and*
484 *biophysical research communications*. 2008;376(4):758-63.
- 485 42. Martínez G, Vidal RL, Mardones P, Serrano FG, Ardiles AO, Wirth C, et al.
486 Regulation of memory formation by the transcription factor XBP1. *Cell reports*.
487 2016;14(6):1382-94.

- 488 43. Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, et al. A crucial role
489 for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nature medicine*.
490 2009;15(9):1082-7.
- 491 44. Bernardis L, Patterson B. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in
492 weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *Journal of Endocrinology*.
493 1968;40(4):527-8.
- 494 45. Hall C, Ballachey EL. A study of the rat's behavior in a field. A contribution to
495 method in comparative psychology. University of California Publications in
496 Psychology. 1932.
- 497 46. Srodulski S, Sharma S, Bachstetter AB, Brelsfoard JM, Pascual C, Xie XS, et al.
498 Neuroinflammation and neurologic deficits in diabetes linked to brain accumulation
499 of amylin. *Molecular neurodegeneration*. 2014;9(1):30.
- 500 47. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in
501 the rat. *Journal of neuroscience methods*. 1984;11(1):47-60.
- 502 48. Sanches JR, França LM, Chagas VT, Gaspar RS, dos Santos KA, Gonçalves LM, et
503 al. Polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaf dually improves peripheral insulin
504 sensitivity and pancreatic islet function in monosodium L-glutamate-induced obese
505 rats. *Frontiers in pharmacology*. 2016;7.
- 506 49. Marcelino T, Longoni A, Kudo K, Stone V, Rech A, De Assis A, et al. Evidences that
507 maternal swimming exercise improves antioxidant defenses and induces
508 mitochondrial biogenesis in the brain of young Wistar rats. *Neuroscience*.
509 2013;246:28-39.

- 510 50. Rafacho A, Roma L, Taboga S, Boschero A, Bosqueiro J. Dexamethasone-induced
511 insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein
512 expression in pancreatic rat islets. Canadian journal of physiology and
513 pharmacology. 2007;85(5):536-45.
- 514 51. Matthews D, Hosker J, Rudenski A, Naylor B, Treacher D, Turner R. Homeostasis
515 model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma
516 glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia. 1985;28(7):412-9.
- 517 52. Guerrero-Romero F, Simental-Mendía LE, González-Ortiz M, Martínez-Abundis E,
518 Ramos-Zavala MG, Hernández-González SO, et al. The product of triglycerides and
519 glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-
520 hyperinsulinemic clamp. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.
521 2010;95(7):3347-51.
- 522 53. França LM, Freitas LNC, Chagas VT, Coêlho CFF, Barroso WA, Costa GC, et al.
523 Mechanisms underlying hypertriglyceridemia in rats with monosodium L-glutamate-
524 induced obesity: evidence of XBP-1/PDI/MTP axis activation. Biochemical and
525 biophysical research communications. 2014;443(2):725-30.

526

527

ACKNOWLEDGMENTS

Authors are thankful to the Laboratory of Experimental Physiology's and Laboratory of Vascular Biology's staff for all the technical support during experimental procedures. This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA through the grants PAEDT-00380/14, PAEDT-02085/15, ESTAGIO-05258/15, UNIVERSAL-00523/14 and UNIVERSAL-00792/14. TMM and VRM received fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, respectively.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

B.A.S.P and A.M.A.P were responsible for the conception and study design. B.A.S.P., T.M.M., K.F.T.F., L.M.F. and V.R.M. performed animal experiments, biochemical and molecular biology protocols, and analyzed data. A.M.A.P., D.K., A.L.C. and S.R.F.P. supervised protocols execution and helped interpreting data. F.R.M.L. critically discussed data. B.A.S.P and A.M.A.P. drafted the manuscript. All authors read, critically discussed and approved the final manuscript.

COMPETING FINANTIAL INTERESTS

Authors declare the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Figure legends

Figure 1. Morphometric parameters. **A**, weight gain (g) and AUC; **B**, Lee index ($\text{g}^{1/3} \cdot \text{cm}^{-1} \times 100$); **C**, energy intake (Kcal/100g/day) and AUC; **D**, weight of retroperitoneal fat (g/100g BW); **E**, weight of periepididymal fat (g/100g BW); **F**, weight of mesenteric fat (g/100g BW); **G**, weight of liver (g/100g BW); **H**, fat deposited in liver (g/liver weight); **I**, weight of skeletal muscles (g/100g BW) assessed in rats fed a standard chow (CTR, n = 7) and high-sucrose diet (HSD, n = 7) until 6-months-old from weaning. Points and bars represent mean $\pm$ SEM (unpaired t-test one-tailed). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 2. Glucose-insulin axis function assessment. **A**, Fasting blood glucose levels (mg/dL); **B**, blood glucose levels (mg/dL) during intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT); **C**, AUC of ipGTT; **D**, fed blood glucose levels (mg/dL); **E**, blood glucose levels (mg/dL) during intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT); **F**, blood glucose disappearance rate (KITT); **G**, serum insulin levels ($\mu\text{LU/mL}$); **H**, HOMA-B; **I**, HOMA-IR; **J**, serum triglyceride levels (mg/dL); **K**, serum free fatty acids (mM); **L**, TyG index assessed in rats fed a standard chow (CTR, n = 7) and high-sucrose diet (HSD, n = 7) until 6-months-old from weaning. Points and bars represent mean $\pm$ SEM (unpaired t-test one-tailed). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 3. Serum redox profile. **A**, superoxide dismutase activity (U/mL); **B**, catalase activity (nmol/min/mL); **C**, glutathione peroxidase activity (nmol/min/mL); **D**, serum MDA (μM) assessed in rats fed a standard chow (CTR, n = 7) and high-sucrose diet (HSD, n

= 7) until 6-months-old from weaning. Bars represent mean $\pm$ SEM (unpaired t-test one-tailed). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Figure 4. Motor, behavioral and cognitive assessments. **A**, motor skills assessment by time on rod (s) in rotarod test; **B**, spatial learning assessment by latency time (s) to find the hidden platform in water maze test; **C**, memory assessment by time spent (s) in the correct quadrant in water maze test; **D**, behavioral assessment by frequency of total crosses, central and peripheral squares entries, rearings, groomings and defecation in open field test assessed in rats fed a standard chow (CTR, $n = 7$) and high-sucrose diet (HSD, $n = 7$) until 6-months-old from weaning, and middle-aged (20-months-old) animals fed a standard chow (OLD, $n = 7$). Points and bars represent mean $\pm$ SEM (One-way ANOVA Newman Keuls). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ when compared to CTR; + $p < 0.05$ when compared to OLD; and ## $p < 0.01$ when compared to HSD.

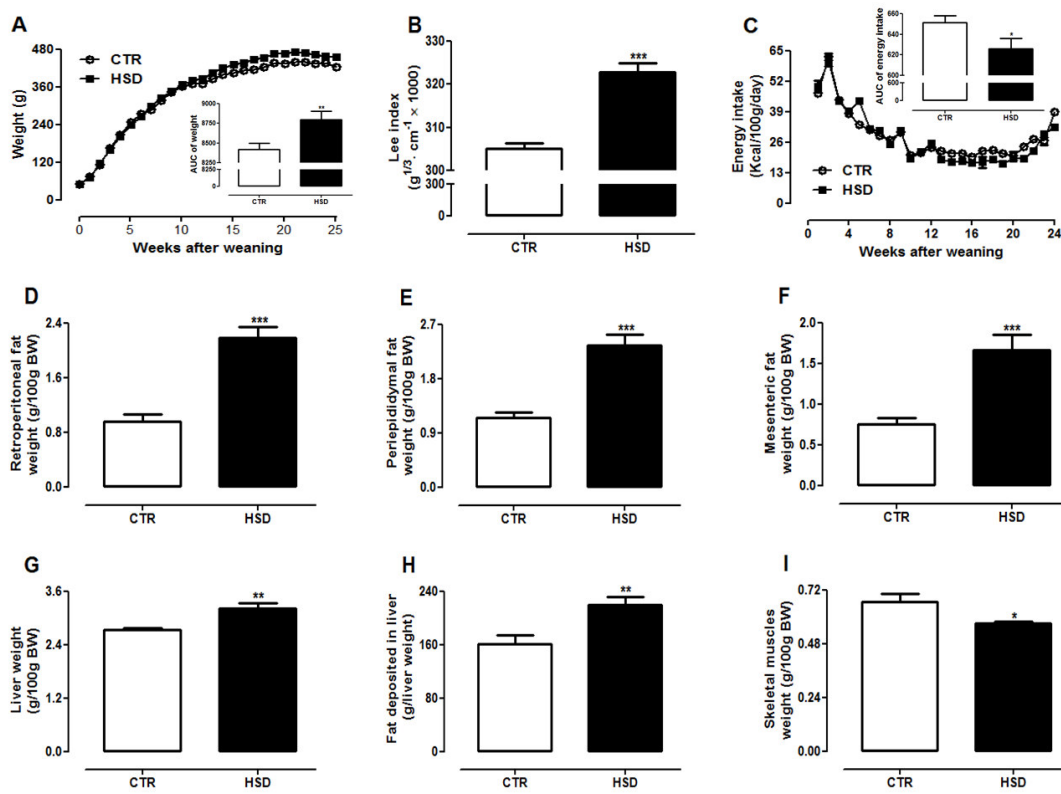
Figure 5. Expression of UPR pro-adaptive markers in hippocampus. Relative mRNA expression of UPR sensors Ire1 α (**A**), Perk (**B**) and Atf6 (**C**); chaperones Grp78 (**D**), PdiA2 (**E**), Calnexin (**F**) and Calreticulin (**G**); neural plasticity Bdnf (**H**); and antioxidant defense Nrf2 (**I**) assessed in hippocampus of rats fed a standard chow (CTR, $n = 7$) and high-sucrose diet (HSD, $n = 7$) until 6-months-old from weaning, and middle-aged (20-months-old) animals fed a standard chow (OLD, $n = 7$). All samples were normalized to the relative levels of GAPDH and results are expressed as the fold change values of $2^{-\Delta\Delta CT}$, as determined by real-time amplification. Bars represent mean $\pm$ SEM

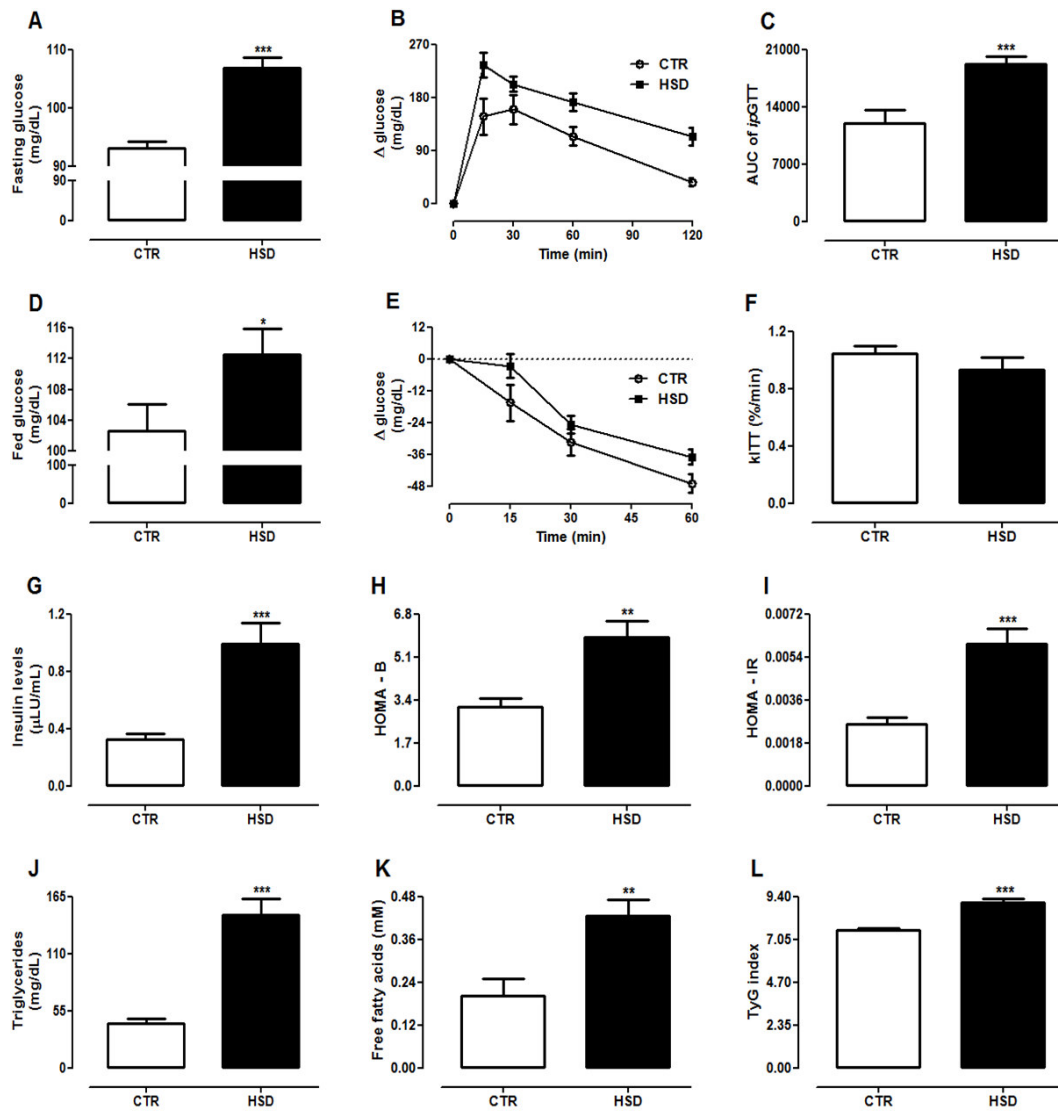
(One-way ANOVA Newman Keuls). $*p < 0.05$; $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ when compared to CTR; $^{++}p < 0.01$ when compared to OLD; and $^{###}p < 0.001$ when compared to HSD.

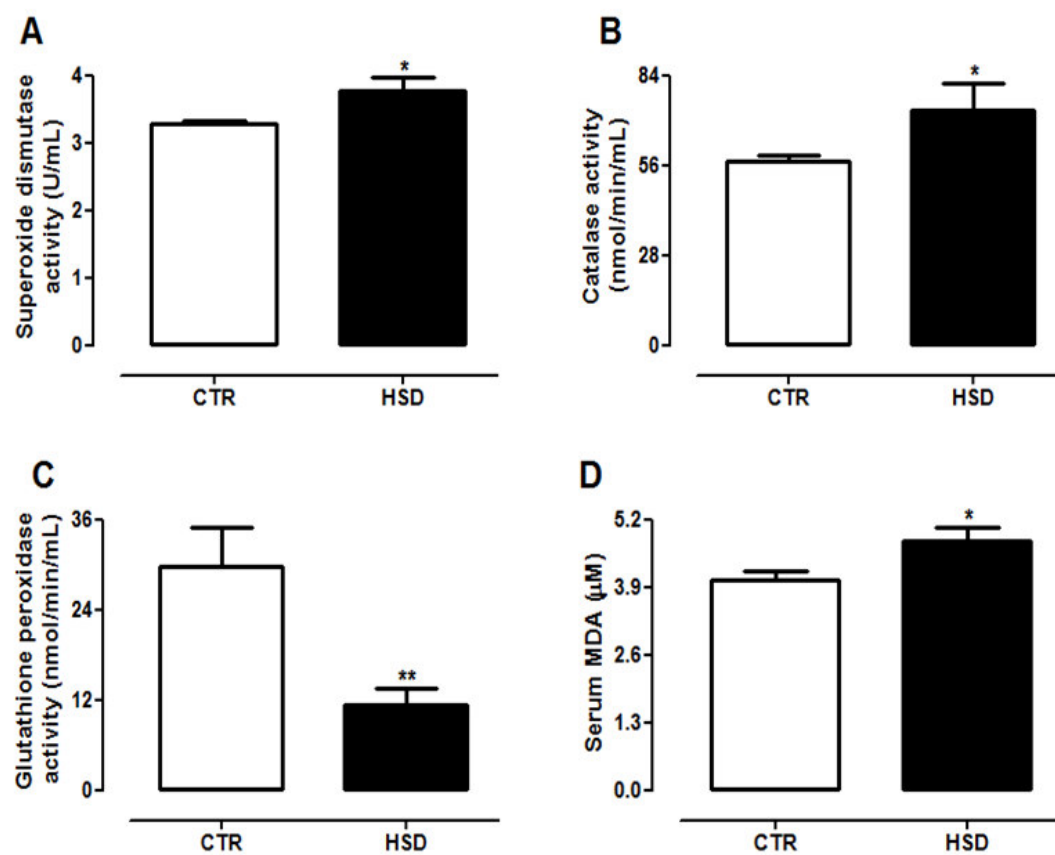
Figure 6. Expression of cell death and senescence markers in hippocampus.

Relative mRNA expression of anti-apoptotic marker Bcl2 (**A**), and pro-apoptotic markers Chop (**B**) and Caspase 3 (**C**); Calpain presence inferred by PARP-1 protein expression (**D**); and relative mRNA expression of senescence markers p53 (**E**) and p21 (**F**) assessed in hippocampus of rats fed a standard chow (CTR, $n = 7$) and high-sucrose diet (HSD, $n = 7$) until 6-months-old from weaning, and middle-aged (20-months-old) animals fed a standard chow (OLD, $n = 7$). Gene expressions were normalized to the relative levels of GAPDH and results are expressed as the fold change values of $2^{-\Delta\Delta CT}$ and protein expression are expressed as a relative density normalized by anti- β -Actin. Bars represent mean $\pm$ SEM (One-way ANOVA Newman Keuls). $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ when compared to CTR; $^{+}p < 0.05$, $^{++}p < 0.01$ when compared to OLD; and $^{#}p < 0.05$ when compared to HSD.

Figure 1.



628 **Figure 2.**

635 **Figure 3.**

636

637

638

639

640

641

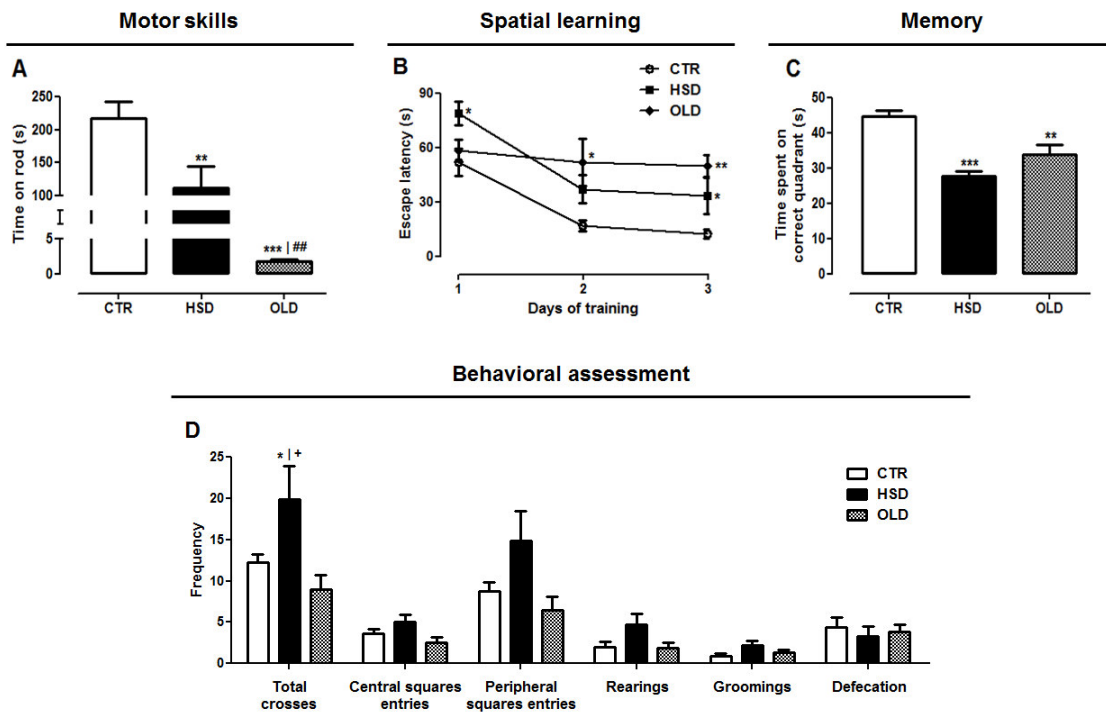
642

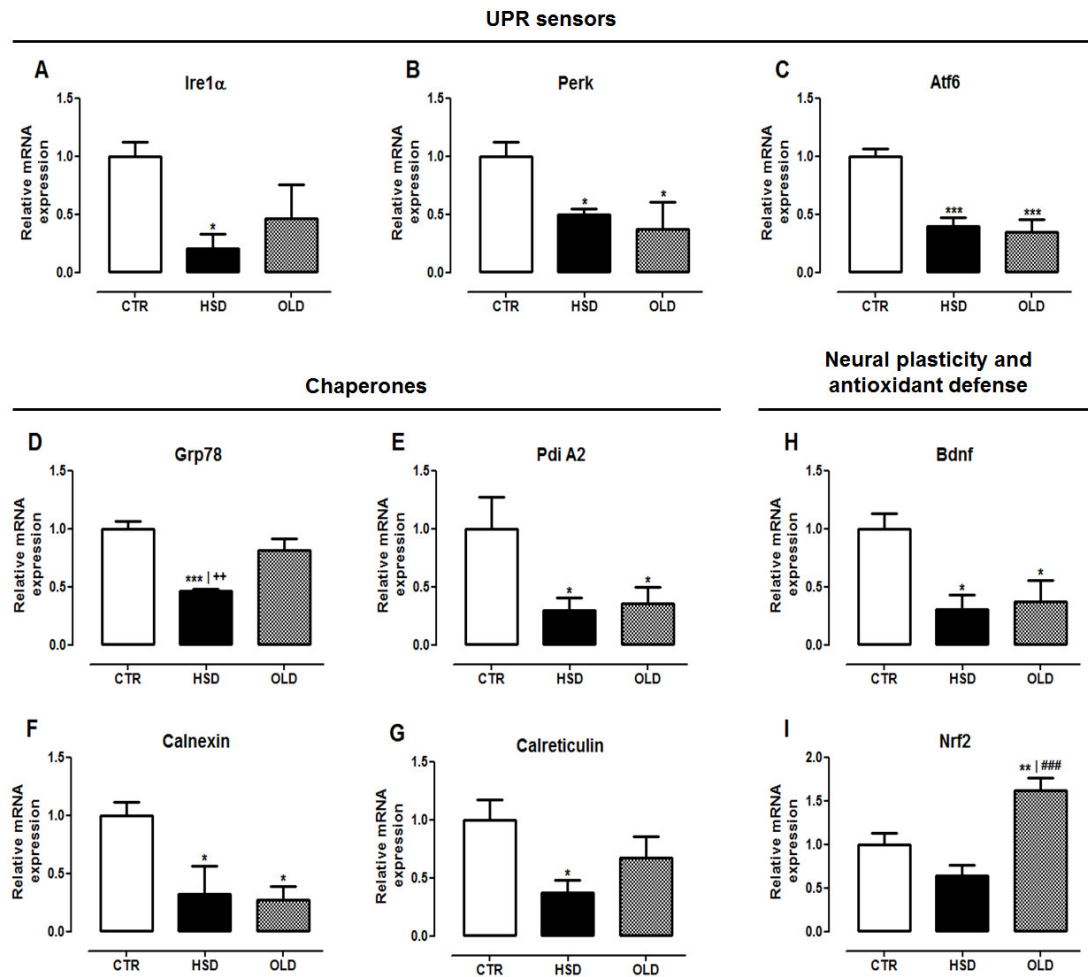
643

644

645

646 **Figure 4.**



659 **Figure 5.**

660

661

662

663

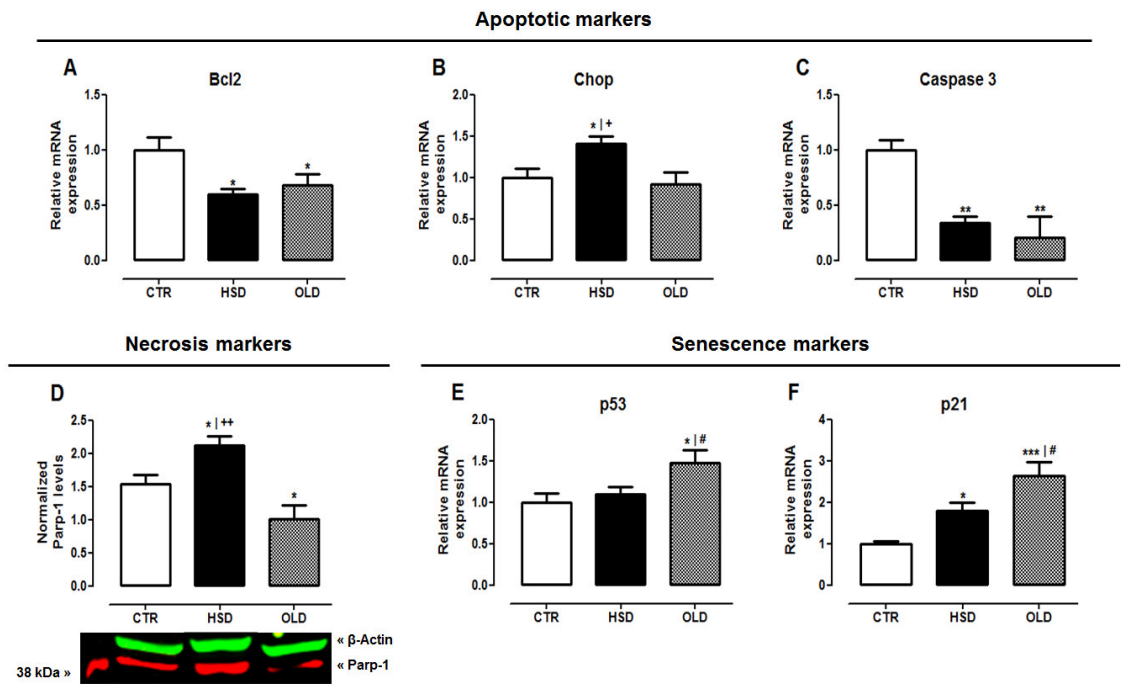
664

665

666

667

Figure 6.



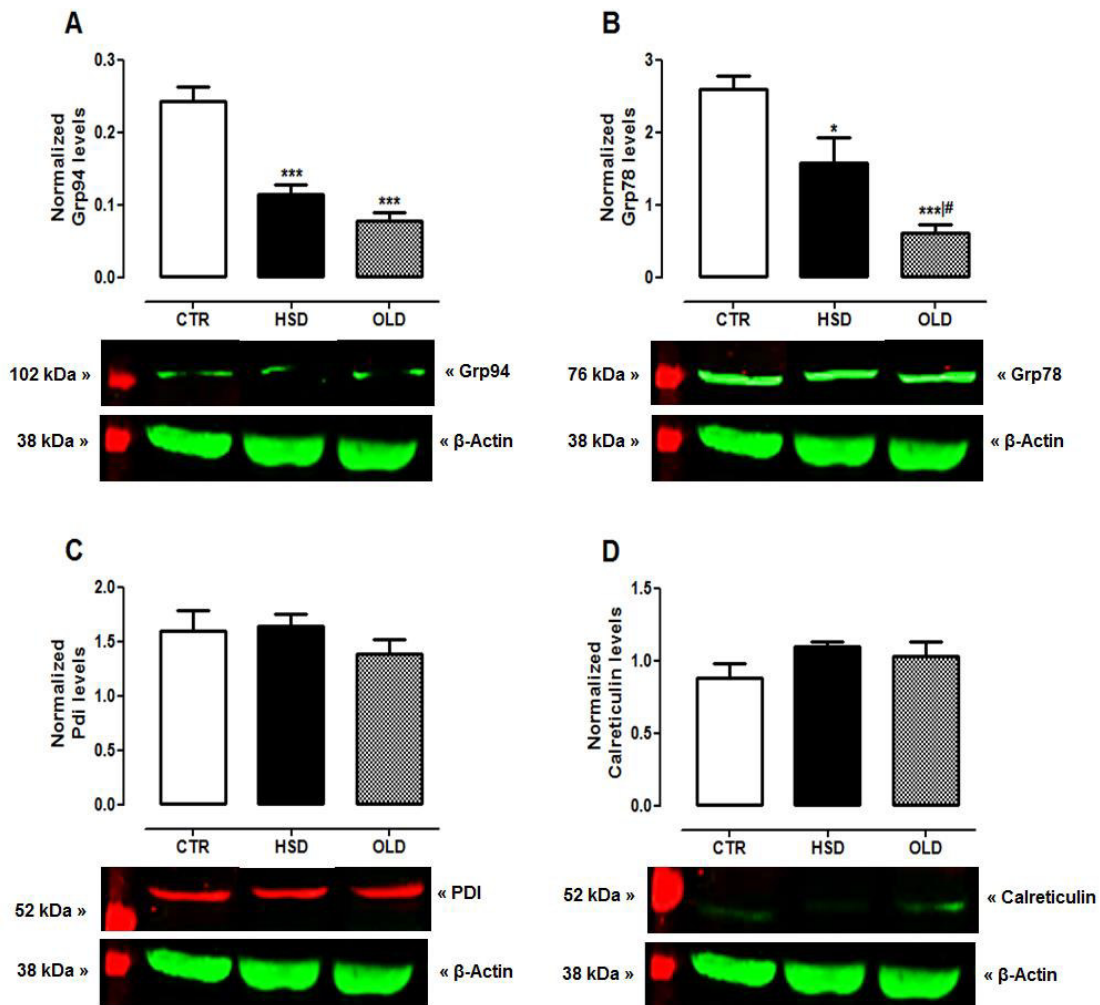
SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table 1. Primers sequence

Genes*	Foward primer	Reverse primer	Amplicon	GenBank n°
Gapdh	5'-GAGACAGCCGCATCTTCTTGT-3'	5'-CGACCTTCACCATCTTGTCTATGA-3'	62	NM_017008.4
Ire1α	5'-GGATGTGAGTGACCGAATAGAAAA-3'	5'-TCCAAGTCCCGCACGAT-3'	60	NM_001191926.1
Perk	5'-GGCTGGTGAGGGATGGTAAA-3'	5'-TTGGCTGTGTAACCTTGTGTCATCA-3'	64	NM_031599.2
Atf6	5'-TTCTCTGATGGCCGTGCAT-3'	5'-TGAAGATGACCCACAGAACCAA-3'	65	NM_001107196.1
Grp78	5'-AAAGAAGGTCACCCATGCAGTT-3'	5'-GCCGCTGTGCATCATTGA-3'	59	NM_013083.2
Pdi A2	5'-GCACCTGGTCACAGAATTCAAC-3'	5'-TGAGGATCCTGGCTGCAAA-3'	62	NM_001105775.2
Calnexin	5'-TGCGGTGGTGCCTACGT-3'	5'-GGAGTCTTGTCTGTGGAATTGATC-3'	74	NM_172008.2
Calreticulin	5'-GCCAGACACTGGTGGTACAGTTC-3'	5'-AATATCGACTGTGGGGGCG-3'	60	NM_022399.2
Bdnf	5'-CACTTTTGAGCACGTGATCGA-3'	5'-AGAAGGTTCCGGCCCAACG-3'	59	NM_001270630.1
Nrf2	5'-CCCATTGAGGGCTGTGATCT-3'	5'-GCCTTCAGTGTGCTTCTGGTT-3'	60	NM_031789.2
Bcl2	5'-GGGATGCCTTTGTGGAACATATG-3'	5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAGA-3'	62	NM_016993.1
Chop	5'-TGGCACAGCTTGCTGAAGAG-3'	5'-TCAGGCGCTCGATTCCT-3'	54	NM_001109986.1
Caspase 3	5'-TTTGCGCCATGCTGAAACT-3'	5'-ACGAGTGAGGATGTGCATGAAT-3'	59	NM_012922.2
p53	5'-AAGACCAAGAAGGGCCAGTCTA-3'	5'-CAATGATCAAGAAAGTGGGGC-3'	61	NM_030989.3
p21	5'-CCTCCGCTGGGAACGTT-3'	5'-GCATAACTTCTGCTCAAGCACG-3'	56	NM_031550.1

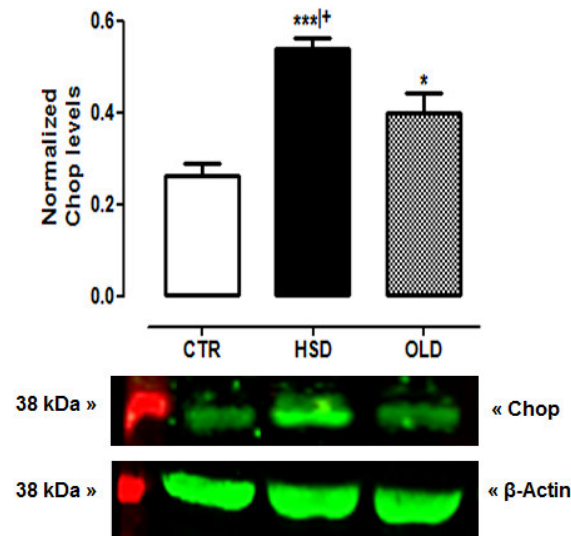
* Gapdh: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Ire1α: Inositol-requiring enzyme 1 alpha; Perk: Protein kinase RNA-like ER kinase; Atf6: Activating transcription factor 6; Grp78: Glucose regulated protein 78; Pdi A2: Protein disulfide isomerase family A, member 2; Calnexin; Calreticulin; Bdnf: Brain derived neurotrophic factor; Nrf2: Nuclear factor, erythroid derived 2, like 2; Bcl2: B-cell CLL/lymphoma 2; Chop: C/EBP-homologous protein; Caspase 3: caspase 3; p53: Tumor protein p53; p21: Cyclin dependent kinase inhibitor 1A.

Supplemental Figure 1.



Supplemental Figure 1. Protein expression of luminal ER-chaperones in hippocampus. Protein expression of Grp94 (A), Grp78 (B), Pdi (C) and Calreticulin (D) assessed in hippocampus of rats fed a standard chow (CTR, n = 7) and high-sucrose diet (HSD, n = 7) until 6-months-old from weaning, and middle-aged (20-months-old) animals fed a standard chow (OLD, n = 7). Proteins expressions are expressed as a relative density normalized by anti- β -Actin. Bars represent mean $\pm$ SEM (One-way ANOVA Newman Keuls). *p < 0.05, ***p < 0.001 when compared to CTR; and #p < 0.05 when compared to HSD.

Supplemental Figure 2.



Supplemental Figure 2. Protein expression of Chop in hippocampus. Protein expression of Chop assessed in hippocampus of rats fed a standard chow (CTR, n = 7) and high-sucrose diet (HSD, n = 7) until 6-months-old from weaning, and middle-aged (20-months-old) animals fed a standard chow (OLD, n = 7). Proteins expressions are expressed as a relative density normalized by anti-β-Actin. Bars represent mean ± SEM (One-way ANOVA Newman Keuls). *p < 0.05, ***p < 0.001 when compared to CTR; and +p < 0.05 when compared to OLD.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estresse do retículo endoplasmático tem sido extensivamente estudado como uma condição relacionada a distintas condições patológicas intimamente relacionadas ao acúmulo de proteínas mal enoveladas, como doenças neurodegenerativas, disfunções metabólicas, neoplasias e cardiopatias, e até no processo de envelhecimento natural (Brown e Naidoo, 2012; Park e Ozcan, 2013).

É importante ressaltar que os estudos desta natureza ainda são relativamente recentes e alguns intermediários de sinalização da UPR ainda são desconhecidos. Até mesmo a atuação de alguns dos marcadores primários de sinalização como o Atf6, ainda são menos conhecidos (Hetz, 2012). O papel da UPR também na manutenção de condições fisiológicas em diversos sistemas ainda é pouco estudado. Entender estes mecanismos se torna essencial para o conhecimento da gênese e progressão destas patologias e desenvolvimento de intervenções terapêuticas adequadas.

Em conjunto, os dados aqui apresentados reforçam os efeitos deletérios relacionados ao consumo precoce e sustentado de açúcares de adição. Até onde sabemos este trabalho originalmente demonstra que a SM induzida por dieta rica em sacarose perturba a homeostase do RE de células do hipocampo, instaurando a condição de ERE, provavelmente relacionada ao estresse oxidativo e glicolipototoxicidade. A manutenção desta condição estressora de forma crônica culminaria em morte celular precoce, aceleração do processo de envelhecimento neuronal e subsequentes prejuízos funcionais motores e cognitivos.

Apesar do sucesso em estabelecermos que disfunções metabólicas levam a prejuízos neurofuncionais, tendo o ERE como uma condição intermediária conectando as distintas morbididades. A partir de nossas conclusões, sugere-se em próximos trabalhos a avaliação das consequências da retirada desta dieta, se reverteriam ou amenizariam o quadro, assim como o efeito de estratégias terapêuticas que combatam os efeitos deletérios do ERE.

REFERÊNCIAS

ABISAMBRA, J. F. et al. Tau accumulation activates the unfolded protein response by impairing endoplasmic reticulum-associated degradation. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 22, p. 9498-9507, 2013. ISSN 0270-6474.

AHIMA, R. S. Connecting obesity, aging and diabetes. **Nature medicine**, v. 15, n. 9, p. 996-997, 2009. ISSN 1078-8956.

ALBERTI, K. G. M.; ZIMMET, P.; SHAW, J. The metabolic syndrome-a new worldwide definition. **The Lancet**, v. 366, n. 9491, p. 1059, 2005. ISSN 0140-6736.

AMERI, K.; HARRIS, A. L. Activating transcription factor 4. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 40, n. 1, p. 14-21, 2008. ISSN 1357-2725.

ARAKI, K.; NAGATA, K. Protein folding and quality control in the ER. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 11, p. a007526, 2011. ISSN 1943-0264.

BACK, S. H. et al. Translation attenuation through eIF2 α phosphorylation prevents oxidative stress and maintains the differentiated state in β cells. **Cell metabolism**, v. 10, n. 1, p. 13-26, 2009. ISSN 1550-4131.

BASCIANO, H.; FEDERICO, L.; ADELI, K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. **Nutrition & metabolism**, v. 2, n. 1, p. 5, 2005. ISSN 1743-7075.

BELAL, C. et al. The homocysteine-inducible endoplasmic reticulum (ER) stress protein Herp counteracts mutant α -synuclein-induced ER stress via the homeostatic regulation of ER-resident calcium release channel proteins. **Human molecular genetics**, v. 21, n. 5, p. 963-977, 2012. ISSN 0964-6906.

BERNALES, S.; SOTO, M. M.; MCCULLAGH, E. Unfolded protein stress in the endoplasmic reticulum and mitochondria: a role in neurodegeneration. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 4, 2012.

BIRKENFELD, A. L. et al. Influence of the hepatic eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) endoplasmic reticulum (ER) stress response pathway on insulin-mediated ER stress and hepatic and peripheral glucose metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 42, p. 36163-36170, 2011. ISSN 0021-9258.

BOTEZELLI, J. D. et al. Fructose-rich diet leads to reduced aerobic capacity and to liver injury in rats. **Lipids in health and disease**, v. 11, n. 1, p. 78, 2012. ISSN 1476-511X.

BOUMAN, L. et al. Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress. **Cell Death & Differentiation**, v. 18, n. 5, p. 769-782, 2011. ISSN 1350-9047.

BRAVO, R. et al. Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 44, n. 1, p. 16-20, 2012. ISSN 1357-2725.

BRAVO, R. et al. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. **International review of cell and molecular biology**, v. 301, p. 215, 2013.

BRODSKY, J. L.; SKACH, W. R. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: Recent lessons from yeast and mammalian cell systems. **Current opinion in cell biology**, v. 23, n. 4, p. 464-475, 2011. ISSN 0955-0674.

BROWN, M. K.; NAIDOO, N. The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases. **Frontiers in physiology**, v. 3, 2012.

CAMPISI, J. Aging, cellular senescence, and cancer. **Annual review of physiology**, v. 75, p. 685-705, 2013. ISSN 0066-4278.

CHAUDHARI, N. et al. A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, 2014.

COLLA, E. et al. Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of α -synucleinopathy in vivo. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 10, p. 3306-3320, 2012. ISSN 0270-6474.

COLLA, E. et al. Accumulation of toxic α -synuclein oligomer within endoplasmic reticulum occurs in α -synucleinopathy in vivo. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 10, p. 3301-3305, 2012. ISSN 0270-6474.

COOPER, C. David Barker (1938-2013). **Nature**, v. 502, n. 7471, p. 304, Oct 17 2013. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24132283> >.

COSTA-MATTIOLI, M. et al. Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2 α kinase GCN2. **Nature**, v. 436, n. 7054, p. 1166-1173, 2005. ISSN 0028-0836.

COSTA-MATTIOLI, M. et al. eIF2 α phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short-to long-term synaptic plasticity and memory. **Cell**, v. 129, n. 1, p. 195-206, 2007. ISSN 0092-8674.

CUANALO-CONTRERAS, K.; MUKHERJEE, A.; SOTO, C. Role of protein misfolding and proteostasis deficiency in protein misfolding diseases and aging. **International journal of cell biology**, v. 2013, 2013. ISSN 1687-8876.

DE MOURA, R. F. et al. Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. **British journal of nutrition**, v. 101, n. 08, p. 1178-1184, 2009. ISSN 1475-2662.

DUENNWALD, M. L.; LINDQUIST, S. Impaired ERAD and ER stress are early and specific events in polyglutamine toxicity. **Genes & development**, v. 22, n. 23, p. 3308-3319, 2008. ISSN 0890-9369.

EGAWA, N. et al. The endoplasmic reticulum stress sensor, ATF6 α , protects against neurotoxin-induced dopaminergic neuronal death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 10, p. 7947-7957, 2011. ISSN 0021-9258.

ELLGAARD, L.; HELENIUS, A. Quality control in the endoplasmic reticulum. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 4, n. 3, p. 181-191, 2003. ISSN 1471-0072.

ERICKSON, R. R.; DUNNING, L. M.; HOLTZMAN, J. L. The effect of aging on the chaperone concentrations in the hepatic, endoplasmic reticulum of male rats: the possible role of protein misfolding due to the loss of chaperones in the decline in physiological function seen with age. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 61, n. 5, p. 435-443, 2006. ISSN 1079-5006.

FARG, M. A. et al. Mutant FUS induces endoplasmic reticulum stress in amyotrophic lateral sclerosis and interacts with protein disulfide-isomerase. **Neurobiology of aging**, v. 33, n. 12, p. 2855-2868, 2012. ISSN 0197-4580.

FAVERO, T. G.; ZABLE, A. C.; ABRAMSON, J. J. Hydrogen peroxide stimulates the Ca²⁺ release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 43, p. 25557-25563, 1995. ISSN 0021-9258.

FENG, Y.-X. et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Activates PERK-eIF2 α and Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress. **Cancer discovery**, v. 4, n. 6, p. 702-715, 2014. ISSN 2159-8274.

FLAMMENT, M. et al. New insights into ER stress-induced insulin resistance. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 8, p. 381-390, 2012. ISSN 1043-2760.

GAO, Y. et al. PERK is required in the adult pancreas and is essential for maintenance of glucose homeostasis. **Molecular and cellular biology**, v. 32, n. 24, p. 5129-5139, 2012. ISSN 0270-7306.

GAVILAN, M. P. et al. Cellular environment facilitates protein accumulation in aged rat hippocampus. **Neurobiology of aging**, v. 27, n. 7, p. 973-982, 2006. ISSN 0197-4580.

GREK, C.; TOWNSEND, D. Protein disulfide isomerase superfamily in disease and the regulation of apoptosis. **Endoplasmic reticulum stress in diseases**, v. 1, n. 1, 2014. ISSN 2300-4266.

HAN, J. et al. ER stress signalling through eIF2 α and CHOP, but not IRE1 α , attenuates adipogenesis in mice. **Diabetologia**, v. 56, n. 4, p. 911-924, 2013. ISSN 0012-186X.

HARDING, H. P. et al. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. **Molecular cell**, v. 7, n. 6, p. 1153-1163, 2001. ISSN 1097-2765.

HATORI, M. et al. Light-dependent and circadian clock-regulated activation of sterol regulatory element-binding protein, X-box-binding protein 1, and heat shock factor pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 12, p. 4864-4869, 2011. ISSN 0027-8424.

HAYASHI, A. et al. The role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced XBP1 splicing during brain development. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 47, p. 34525-34534, 2007. ISSN 0021-9258.

HAYASHI, A. et al. Attenuated BDNF-induced upregulation of GABAergic markers in neurons lacking Xbp1. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 376, n. 4, p. 758-763, 2008. ISSN 0006-291X.

HEBERT, D. N.; MOLINARI, M. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. **Physiological reviews**, v. 87, n. 4, p. 1377-1408, 2007. ISSN 0031-9333.

HETZ; MOLLEREAU, B. Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. **Nat Rev Neurosci**, v. 15, n. 4, p. 233-49, Apr 2014. ISSN 1471-0048 (Electronic) 1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24619348> >.

HETZ, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 13, n. 2, p. 89-102, 2012. ISSN 1471-0072.

HETZ, C.; CHEVET, E.; HARDING, H. P. Targeting the unfolded protein response in disease. **Nature reviews Drug discovery**, v. 12, n. 9, p. 703-719, 2013. ISSN 1474-1776.

HINDS, J. W.; MCNELLY, N. A. Dispersion of cisternae of rough endoplasmic reticulum in aging CNS neurons: a strictly linear trend. **American Journal of Anatomy**, v. 152, n. 3, p. 433-439, 1978. ISSN 1553-0795.

HOLLIEN, J. et al. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. **The Journal of cell biology**, v. 186, n. 3, p. 323-331, 2009. ISSN 0021-9525.

HOLTZ, W. A.; O'MALLEY, K. L. Parkinsonian mimetics induce aspects of unfolded protein response in death of dopaminergic neurons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 19367-19377, 2003. ISSN 0021-9258.

HOOZEMANS, J. J. et al. The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus. **The American journal of pathology**, v. 174, n. 4, p. 1241-1251, 2009. ISSN 0002-9440.

HUH, W. J. et al. XBP1 controls maturation of gastric zymogenic cells by induction of MIST1 and expansion of the rough endoplasmic reticulum. **Gastroenterology**, v. 139, n. 6, p. 2038-2049, 2010. ISSN 0016-5085.

HUSSAIN, S. G.; RAMAIAH, K. V. Reduced eIF2 α phosphorylation and increased proapoptotic proteins in aging. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 355, n. 2, p. 365-370, 2007. ISSN 0006-291X.

IWAKOSHI, N. N. et al. Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. **Nature immunology**, v. 4, n. 4, p. 321-329, 2003.

IWAWAKI, T.; AKAI, R.; KOHNO, K. IRE1 α disruption causes histological abnormality of exocrine tissues, increase of blood glucose level, and decrease of serum immunoglobulin level. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e13052, 2010. ISSN 1932-6203.

JACOBSON, J.; DUCHEN, M. R. Mitochondrial oxidative stress and cell death in astrocytes—requirement for stored Ca^{2+} and sustained opening of the permeability transition pore. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 6, p. 1175-1188, 2002. ISSN 0021-9533.

KANAREK, R. B.; ORTHEN-GAMBILL, N. Differential effects of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate-induced obesity in rats. **J Nutr**, v. 112, n. 8, p. 1546-54, Aug 1982. ISSN 0022-3166 (Print)
0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7047694> >.

KANAZAWA, M. et al. Effects of a high-sucrose diet on body weight, plasma triglycerides, and stress tolerance. **Nutr Rev**, v. 61, n. 5 Pt 2, p. S27-33, May 2003. ISSN 0029-6643 (Print)
0029-6643 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12828189> >.

KANEKURA, K. et al. Characterization of amyotrophic lateral sclerosis-linked P56S mutation of vesicle-associated membrane protein-associated protein B (VAPB/ALS8). **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 40, p. 30223-30233, 2006. ISSN 0021-9258.

KANETO, H. et al. Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic β -cell dysfunction and insulin resistance. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 38, n. 5, p. 782-793, 2006. ISSN 1357-2725.

KAUR, J. A comprehensive review on metabolic syndrome. **Cardiology research and practice**, v. 2014, 2014. ISSN 2090-8016.

KHARROUBI, I. et al. Free fatty acids and cytokines induce pancreatic β -cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor- κB and endoplasmic reticulum stress. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 5087-5096, 2004. ISSN 0013-7227.

KIKUCHI, H. et al. Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 15, p. 6025-6030, 2006. ISSN 0027-8424.

KIM, D. S.; HAHN, Y. The acquisition of novel N-glycosylation sites in conserved proteins during human evolution. **BMC bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 29, 2015. ISSN 1471-2105.

KLEIZEN, B.; BRAAKMAN, I. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. **Current opinion in cell biology**, v. 16, n. 4, p. 343-349, 2004. ISSN 0955-0674.

LAKHAN, S. E.; KIRCHGESSNER, A. The emerging role of dietary fructose in obesity and cognitive decline. **Nutrition journal**, v. 12, n. 1, p. 114, 2013. ISSN 1475-2891.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling at a glance. **Journal of cell science**, v. 122, n. 20, p. 3589-3594, 2009. ISSN 0021-9533.

LEE, A. H. et al. XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands. **The EMBO journal**, v. 24, n. 24, p. 4368-4380, 2005. ISSN 0261-4189.

LEE, A. H. et al. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. **Science**, v. 320, n. 5882, p. 1492-6, Jun 13 2008. ISSN 1095-9203 (Electronic)
0036-8075 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18556558> >.

LEE, D. Y. et al. Activation of PERK signaling attenuates Abeta-mediated ER stress. **PloS one**, v. 5, n. 5, p. e10489, 2010. ISSN 1932-6203.

LEE, J. H. et al. Induction of the unfolded protein response and cell death pathway in Alzheimer's disease, but not in aged Tg2576 mice. **Experimental & molecular medicine**, v. 42, n. 5, p. 386-394, 2010. ISSN 1226-3613.

LEITMAN, J. et al. ER stress-induced eIF2-alpha phosphorylation underlies sensitivity of striatal neurons to pathogenic huntingtin. **PloS one**, v. 9, n. 3, 2014. ISSN 1932-6203.

LI, K. et al. MicroRNA-214 suppresses gluconeogenesis by targeting activating transcriptional factor 4. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc. M114. 633990, 2015. ISSN 0021-9258.

LIN, J. H. et al. Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability. **PLoS One**, v. 4, n. 1, p. e4170, 2009. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19137072> >.

LIPSON, K. L. et al. Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. **Cell metabolism**, v. 4, n. 3, p. 245-254, 2006. ISSN 1550-4131.

LIPSON, K. L.; GHOSH, R.; URANO, F. The role of IRE1 α in the degradation of insulin mRNA in pancreatic β -cells. **PloS one**, v. 3, n. 2, p. e1648, 2008. ISSN 1932-6203.

LIU, S. Y. et al. Polymorphism- 116C/G of Human X-box-Binding Protein 1 Promoter is Associated with Risk of Alzheimer's Disease. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 19, n. 4, p. 229-234, 2013. ISSN 1755-5949.

MAIUOLO, J. et al. Selective activation of the transcription factor ATF6 mediates endoplasmic reticulum proliferation triggered by a membrane protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 19, p. 7832-7837, 2011. ISSN 0027-8424.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **The American journal of pathology**, v. 146, n. 1, p. 3, 1995.

MALHOTRA, J. D.; KAUFMAN, R. J. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Seminars in cell & developmental biology*, 2007, Elsevier. p.716-731.

MARTINON, F. et al. TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. **Nature immunology**, v. 11, n. 5, p. 411-418, 2010. ISSN 1529-2908.

MARTINON, F.; GLIMCHER, L. H. Regulation of innate immunity by signaling pathways emerging from the endoplasmic reticulum. **Current opinion in immunology**, v. 23, n. 1, p. 35-40, 2011. ISSN 0952-7915.

MCKEITH, I.; MOSIMANN, U. Dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 10, p. S15-S18, 2004. ISSN 1353-8020.

MORENO, J. A. et al. Sustained translational repression by eIF2 [agr]-P mediates prion neurodegeneration. **Nature**, v. 485, n. 7399, p. 507-511, 2012. ISSN 0028-0836.

NAIDOO, N. et al. Aging impairs the unfolded protein response to sleep deprivation and leads to proapoptotic signaling. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 26, p. 6539-6548, 2008. ISSN 0270-6474.

NIWA, M. et al. A role for presenilin-1 in nuclear accumulation of Ire1 fragments and induction of the mammalian unfolded protein response. **Cell**, v. 99, n. 7, p. 691-702, 1999. ISSN 0092-8674.

NOBLE, E. E. et al. The lighter side of BDNF. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 300, n. 5, p. R1053-R1069, 2011. ISSN 0363-6119.

NOVOA, I. et al. Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. **The EMBO journal**, v. 22, n. 5, p. 1180-1187, 2003. ISSN 0261-4189.

NUSS, J. E. et al. Decreased enzyme activities of chaperones PDI and BiP in aged mouse livers. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 365, n. 2, p. 355-361, 2008. ISSN 0006-291X.

OKADA, T. et al. Distinct roles of ATF6 and PERK in transcription during the mammalian unfolded protein response. **Biochem J**, v. 366, p. 585-594, 2002.

OZCAN, L. et al. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. **Cell metabolism**, v. 9, n. 1, p. 35-51, 2009. ISSN 1550-4131.

ÖZCAN, U. et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. **Science**, v. 306, n. 5695, p. 457-461, 2004. ISSN 0036-8075.

ÖZCAN, U. et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1137-1140, 2006. ISSN 0036-8075.

PALZKILL, T. et al. Selection of functional signal peptide cleavage sites from a library of random sequences. **Journal of bacteriology**, v. 176, n. 3, p. 563-568, 1994. ISSN 0021-9193.

PANZA, F. et al. Metabolic syndrome and cognitive impairment: current epidemiology and possible underlying mechanisms. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 21, n. 3, p. 691-724, 2010. ISSN 1387-2877.

PARK, S. W.; OZCAN, U. Potential for therapeutic manipulation of the UPR in disease. *Seminars in immunopathology*, 2013, Springer. p.351-373.

PARK, S. W. et al. Sarco (endo) plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2b is a major regulator of endoplasmic reticulum stress and glucose homeostasis in obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 45, p. 19320-19325, 2010. ISSN 0027-8424.

PARK, S. W. et al. The regulatory subunits of PI3K, p85 [alpha] and p85 [beta], interact with XBP-1 and increase its nuclear translocation. **Nature medicine**, v. 16, n. 4, p. 429-437, 2010. ISSN 1078-8956.

PFAFFENBACH, K. T. et al. Linking endoplasmic reticulum stress to cell death in hepatocytes: roles of C/EBP homologous protein and chemical chaperones in palmitate-mediated cell death. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 298, n. 5, p. E1027-E1035, 2010. ISSN 0193-1849.

PICARD, F.; GUARENTE, L. Molecular links between aging and adipose tissue. **International Journal of Obesity**, v. 29, p. S36-S39, 2005. ISSN 0307-0565.

POGGIOLINI, I.; SAVERIONI, D.; PARCHI, P. Prion protein misfolding, strains, and neurotoxicity: an update from studies on mammalian prions. **International journal of cell biology**, v. 2013, 2013. ISSN 1687-8876.

QIU, Y. et al. A crucial role for RACK1 in the regulation of glucose-stimulated IRE1 α activation in pancreatic β -cells. **Science signaling**, v. 3, n. 106, p. ra7, 2010.

RABEK, J. P.; BOYLSTON III, W. H.; PAPACONSTANTINOU, J. Carbonylation of ER chaperone proteins in aged mouse liver. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 305, n. 3, p. 566-572, 2003. ISSN 0006-291X.

RAHIMI, N. The ubiquitin-proteasome system meets angiogenesis. **Molecular cancer therapeutics**, v. 11, n. 3, p. 538-548, 2012. ISSN 1535-7163.

RAJAWAT, Y. S.; BOSSIS, I. Autophagy in aging and in neurodegenerative disorders. **HORMONES-ATHENS-**, v. 7, n. 1, p. 46, 2008. ISSN 1109-3099.

REIMOLD, A. M. et al. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. **Nature**, v. 412, n. 6844, p. 300-307, 2001. ISSN 0028-0836.

RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 8, n. 7, p. 519-529, 2007. ISSN 1471-0072.

RUTKOWSKI, D. T. et al. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. **PLoS Biol**, v. 4, n. 11, p. e374, 2006.

RUTKOWSKI, D. T.; KAUFMAN, R. J. A trip to the ER: coping with stress. **Trends in cell biology**, v. 14, n. 1, p. 20-28, 2004. ISSN 0962-8924.

_____. That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. **Trends in biochemical sciences**, v. 32, n. 10, p. 469-476, 2007. ISSN 0968-0004.

RYU, E. J. et al. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 24, p. 10690-10698, 2002. ISSN 0270-6474.

SALVADÓ, L. et al. Targeting endoplasmic reticulum stress in insulin resistance. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 26, n. 8, p. 438-448, 2015. ISSN 1043-2760.

SANTOS, C. X. et al. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 10, p. 2409-2427, 2009. ISSN 1523-0864.

SCHEUNER, D. et al. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. **Molecular cell**, v. 7, n. 6, p. 1165-1176, 2001. ISSN 1097-2765.

SCHINTU, N. et al. Progressive dopaminergic degeneration in the chronic MPTPp mouse model of Parkinson's disease. **Neurotoxicity research**, v. 16, n. 2, p. 127-139, 2009. ISSN 1029-8428.

SCHNEEBERGER, M. et al. Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance. **Cell**, v. 155, n. 1, p. 172-187, 2013. ISSN 0092-8674.

SCHRÖDER, M. Endoplasmic reticulum stress responses. **Cellular and molecular life sciences**, v. 65, n. 6, p. 862-894, 2008. ISSN 1420-682X.

SERRANO-POZO, A. et al. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 1, n. 1, p. a006189, 2011. ISSN 2157-1422.

SHAH, O. J.; WANG, Z.; HUNTER, T. Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. **Current Biology**, v. 14, n. 18, p. 1650-1656, 2004. ISSN 0960-9822.

SHEN, X.; ZHANG, K.; KAUFMAN, R. J. The unfolded protein response—a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 28, n. 1, p. 79-92, 2004. ISSN 0891-0618.

SHIM, J. et al. The unfolded protein response regulates glutamate receptor export from the endoplasmic reticulum. **Molecular biology of the cell**, v. 15, n. 11, p. 4818-4828, 2004. ISSN 1059-1524.

SURH, Y.-J. et al. Role of Nrf2-mediated heme oxygenase-1 upregulation in adaptive survival response to nitrosative stress. **Archives of pharmacal research**, v. 32, n. 8, p. 1163-1176, 2009. ISSN 0253-6269.

SUZANNE, M.; WANDS, J. R. Alzheimer's disease is type 3 diabetes—evidence reviewed. **Journal of diabetes science and technology**, v. 2, n. 6, p. 1101-1113, 2008. ISSN 1932-2968.

SYNTICHAKI, P.; TAVERNARAKIS, N. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 8, p. 672-684, 2003. ISSN 1471-003X.

TANG, T.-S. et al. Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1, 4, 5) triphosphate receptor type 1. **Neuron**, v. 39, n. 2, p. 227-239, 2003. ISSN 0896-6273.

TAPPY, L. et al. Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. **Nutrition**, v. 26, n. 11-12, p. 1044-9, Nov-Dec 2010. ISSN 1873-1244 (Electronic) 0899-9007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20471804> >.

THAYANIDHI, N. et al. α -Synuclein delays endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi transport in mammalian cells by antagonizing ER/Golgi SNAREs. **Molecular biology of the cell**, v. 21, n. 11, p. 1850-1863, 2010. ISSN 1059-1524.

TORRES, M. et al. Prion protein misfolding affects calcium homeostasis and sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15658, 2010. ISSN 1932-6203.

TUNCMAN, G. et al. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 28, p. 10741-10746, 2006. ISSN 0027-8424.

TZANETAKOU, I. P. et al. "Is obesity linked to aging?": adipose tissue and the role of telomeres. **Ageing research reviews**, v. 11, n. 2, p. 220-229, 2012. ISSN 1568-1637.

UEHARA, T. et al. S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 513-517, 2006. ISSN 0028-0836.

USUI, M. et al. Atf6 α -null mice are glucose intolerant due to pancreatic β -cell failure on a high-fat diet but partially resistant to diet-induced insulin resistance. **Metabolism**, v. 61, n. 8, p. 1118-1128, 2012. ISSN 0026-0495.

VIDAL, R. L. et al. Targeting the UPR transcription factor XBP1 protects against Huntington's disease through the regulation of FoxO1 and autophagy. **Human molecular genetics**, v. 21, n. 10, p. 2245-2262, 2012. ISSN 0964-6906.

WAGNER, M.; MOORE, D. D. Endoplasmic reticulum stress and glucose homeostasis. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 14, n. 4, p. 367-373, 2011. ISSN 1363-1950.

WALTER, P.; RON, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. **Science**, v. 334, n. 6059, p. 1081-1086, 2011. ISSN 0036-8075.

WANG, K. K. Calpain and caspase: can you tell the difference? **Trends in neurosciences**, v. 23, n. 1, p. 20-26, 2000. ISSN 0166-2236.

WANG, S.; KAUFMAN, R. J. The impact of the unfolded protein response on human disease. **J Cell Biol**, v. 197, n. 7, p. 857-867, 2012. ISSN 0021-9525.

WANG, Y. et al. The CREB coactivator CRTC2 links hepatic ER stress and fasting gluconeogenesis. **Nature**, v. 460, n. 7254, p. 534-537, 2009. ISSN 0028-0836.

WEI, Y. et al. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 291, n. 2, p. E275-E281, 2006. ISSN 0193-1849.

WIJESEKERA, L. C.; LEIGH, P. N. Amyotrophic lateral sclerosis. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 4, n. 1, p. 3, 2009. ISSN 1750-1172.

WOEHLBIER, U.; HETZ, C. Modulating stress responses by the UPRosome: a matter of life and death. **Trends in biochemical sciences**, v. 36, n. 6, p. 329-337, 2011. ISSN 0968-0004.

XU, K.; ZHU, X.-P. Endoplasmic reticulum stress and prion diseases. **Reviews in the Neurosciences**, v. 23, n. 1, p. 79-84, 2012. ISSN 2191-0200.

YAMASHIMA, T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. **Progress in neurobiology**, v. 62, n. 3, p. 273-295, 2000. ISSN 0301-0082.

YANG, H. et al. Huntingtin interacts with the cue domain of gp78 and inhibits gp78 binding to ubiquitin and p97/VCP. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8905, 2010. ISSN 1932-6203.

YOO, B. C. et al. Overexpressed protein disulfide isomerase in brains of patients with sporadic Creutzfeldt–Jakob disease. **Neuroscience letters**, v. 334, n. 3, p. 196-200, 2002. ISSN 0304-3940.

YOON, S. O. et al. JNK3 perpetuates metabolic stress induced by A β peptides. **Neuron**, v. 75, n. 5, p. 824-837, 2012. ISSN 0896-6273.

YOSHIDA, H. ER stress and diseases. **Febs Journal**, v. 274, n. 3, p. 630-658, 2007. ISSN 1742-4658.

ZHANG, K. et al. The unfolded protein response sensor IRE1 α is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 2, p. 268-281, 2005. ISSN 0021-9738.

ZHONG, N.; RAMASWAMY, G.; WEISGRABER, K. H. Apolipoprotein E4 domain interaction induces endoplasmic reticulum stress and impairs astrocyte function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 40, p. 27273-27280, 2009. ISSN 0021-9258.

ZHOU, A.-X. et al. C/EBP-homologous protein (CHOP) in vascular smooth muscle cells regulates their proliferation in aortic explants and atherosclerotic lesions. **Circulation research**, p. CIRCRESAHA. 114.305602, 2015. ISSN 0009-7330.

ZHOU, Y. et al. Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1-FoxO1 interaction. **Nature medicine**, v. 17, n. 3, p. 356-365, 2011. ISSN 1078-8956.

ANEXOS

- **Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO	
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	
PARECER CONSUBSTANCIADO INICIAL	Nº do parecer: 20
PROJETO DE PESQUISA	Registro da CEUA: 20/14 Nº do Protocolo: 23115.009595/2014-81 Data de entrada no CEUA: 03/07/14 Parecer: APROVADO COM RECOMENDAÇÕES

I – Identificação

Título do projeto: CARACTERIZAÇÃO DO IMPACTO DA SÍNDROME METABÓLICA SOBRE O SURGIMENTO E A PROGRESSÃO DE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO, ENVELHECIMENTO E SENESCÊNCIA DE CÉLULAS NEURONAIS EM RATOS.		
Identificação da equipe executora: Ms. Bruno Araújo Serra Pinto (coordenador), Dr. Antonio Marcus de A. Paes (colaborador), Dr. Antonio Carlos Romão Borges (colaborador), Dr. Francisco Rafael M. Laurindo (colaborador), Dra. Silma Regina F. Pereira (colaborador), Ms. Karla Frida T. Flister (colaborador), Ms. Lucas Martins França (colaborador)		
Instituição onde será realizado: Universidade Federal do Maranhão		
Área temática:	Multicêntrico: Não	Data de recebimento: 04/07/14
Cooperação estrangeira: não		Data de devolução 05/09/2014

II – Objetivos:

Caracterizar o impacto síndrome metabólica sobre o surgimento e a progressão de marcadores de estresse oxidativo, envelhecimento e senescência de células neuronais em ratos.

III – Sumário do projeto: O projeto apresenta uma proposta de avaliar o papel do estresse oxidativo oriundo da síndrome metabólica sobre o aparecimento de marcadores moleculares de envelhecimento ou senescência.

Serão utilizados 40 animais, ratos, Wistar, machos. Será realizada a indução de obesidade pela injeção subcutânea de L-glutamato. Os animais serão acompanhados por um anos, desde o nascimento. Em intervalos pré-determinados (30, 90, 360 dias), serão realizados testes de função motora e cognitiva, além de análises morfométricas, bioquímicas e hormonais. Essas dosagens serão realizadas em amostra de sangue, e tecido nervoso.

IV – Comentário do relator frente à resolução Nº 779 - CONSEPE e complementares em particular sobre: O projeto é conciso e segue as normas da resolução No 779 – CONSEPE. Os animais estarão sob condições de estresse controladas. No entanto, não há descrição de metodologias desnecessárias ou que não se encaixam no escopo ético da pesquisa animal. Além disso, e a metodologia de eutanásia está dentro das normas éticas seguidas pela Universidade Federal do Maranhão.

V – Pendências

Não se aplica.

VI – Recomendações:

-Revisar o texto da metodologia, com o propósito de deixá-lo mais claro em relação aos grupos e aos tempos para cada experimento. Uma sugestão é seguir a sequência apresentada na tabela do cronograma.

-Especificar o destino da carcaça dos animais a serem utilizados

VII – Parecer consubstanciado do CEUA

O projeto apresentado é de grande relevância para a sociedade atual, pois visa o estudo e esclarecimento dos efeitos provenientes da síndrome metabólica. É um projeto de longo prazo, com diversas metodologias a serem executadas, devendo apresentar acompanhamento constante das comissões de pesquisa. Os resultados esperados, se alcançados, trarão novos conhecimentos sobre a obesidade e suas consequências. Uma vez que obedece as normas éticas para sua execução, o presente projeto está **Aprovado com recomendações** pela CEUA.

São Luís, _10_/_Setembro/_2014_



Prof. Dra. Lucilene Amorim Silva
Presidente da CEUA / UFMA