UFRJ INJC

REPERCUSSÕES DO CONSUMO PROLONGADO DE FRUTOSE SOBRE O EFEITO ANOREXÍGENO CENTRAL DA INSULINA

Viviane Wagner Ramos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição (PPGN), do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de **mestre em Nutrição Humana**.

Orientadora: Kelse Tibau de Albuquerque

Rio de Janeiro

Fevereiro-2014

Ramos, Viviane Wagner
Repercussões do consumo prolongado de frutose sobre o efeito anorexígeno central da insulina / Viviane Wagner Ramos. -- Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Nutrição, 2014.
xv, 83 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Kelse Tibau de Albuquerque

Dissertação (mestrado) – UFRJ, Instituto de Nutrição, Programa de Pós-graduação em Nutrição, 2014.

Referências bibliográficas: f. 46 – 59.

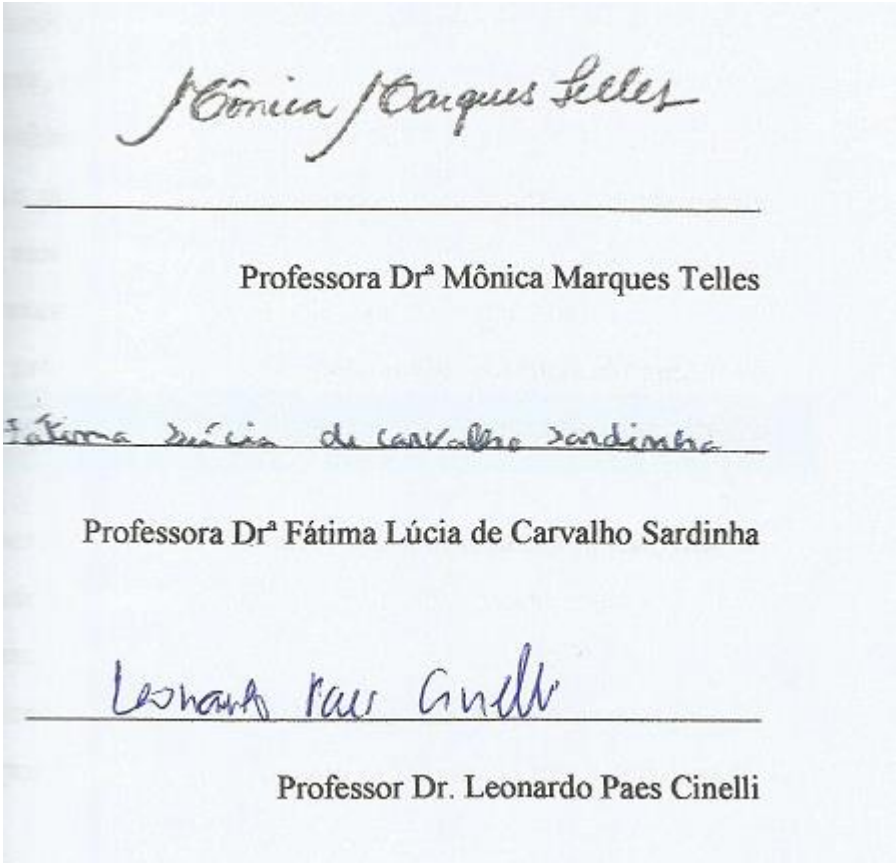
1. Bebidas - efeitos adversos. 2. Frutose - efeitos adversos. 3. Obesidade - etiologia. 4. Frutose - metabolismo. 5. Tecido Adiposo. 6. Peso Corporal. 7. Frutose - administração & dosagem. 8. Insulina - administração & dosagem. 9. Resistência à Insulina. 10. Modelos Animais de Doenças. 11. Ratos Wistar. 12. Nutrição - Tese. I. Albuquerque, Kelse Tibau de. II.

REPERCUSSÕES DO CONSUMO PROLONGADO DE FRUTOSE SOBRE O EFEITO ANOREXÍGENO CENTRAL DA INSULINA

Viviane Wagner Ramos

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO DO INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO **GRAU DE MESTRE EM NUTRIÇÃO HUMANA**.

Examinada por:



RIO DE JANEIRO, RJ-BRASIL

FEVEREIRO-2014

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, a toda espiritualidade e guias de luz que sempre me acompanham, me iluminam e me incentivam a seguir o meu caminho, no campo da alimentação e nutrição que se configura como uma essência do meu ser.

À minha mãe, Roseli, por todo amor, força e incentivo. Pela vida que me deste, por ter trabalhado arduamente para eu estudar, me graduar e estar nesse momento finalizando este mestrado. Por me ensinar a correr atrás do que desejo, a ter paciência (tarefa árdua) e por tudo mais que não caberia nesse documento. E aos meus irmãos, Juliana, Bárbara e Lucas pelo amor, paciência e incentivo.

A minha avó Ieda, que mesmo distante sempre me incentivou em toda essa caminhada e a todos meus familiares que sempre ficaram felizes com as minhas conquistas e pelo apoio de sempre, em especial minha tia Cacaia.

À minha orientadora Professora Kelse Tibau de Albuquerque por ter acreditado em mim para desenvolver esse projeto, por todo apoio e dedicação, principalmente naquelas horas que batia a ansiedade e o desespero. Por sempre me passar a tranquilidade necessária e pelo exemplo de competência e profissionalismo.

Aos meus amigos mais próximos que entenderam minha ausência durante todo esse período e em nenhum momento me abandonaram e colaboraram para meus momentos de distração.

Aos meus amigos de laboratório: Leandro (me ensinou praticamente tudo que sei com toda paciência, generosidade e carinho), Elisaldo (meu incentivador para continuar e não desistir, além do bom humor e carinho de sempre), Gustavo e Tassia.

Aos meus colegas de trabalho do Hospital de Rio das Ostras e do Hospital Estadual de Barra de São João por todo incentivo quando tudo parecia não se encaixar.

Resumo da dissertação apresentada ao PPGN/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de **mestre em Nutrição Humana**.

REPERCUSSÕES DO CONSUMO PROLONGADO DE FRUTOSE SOBRE O EFEITO ANOREXÍGENO CENTRAL DA INSULINA

Viviane Wagner Ramos

Fevereiro/2014

Orientadora: Kelse Tibau de Albuquerque

Resumo

A crescente prevalência de obesidade no mundo coincide com a elevação da ingestão de frutose pela população, veiculada principalmente em refrigerantes e bebidas adoçadas. O consumo aumentado deste carboidrato associa-se a desordens metabólicas que podem comprometer o sistema nervoso central. A insulina age no hipotálamo inibindo a ingestão alimentar, e tendo em vista as evidências científicas que associam o consumo deste carboidrato a prejuízos aos sistemas que regulam a ingestão alimentar, hipotetizamos que consumo durante 8 semanas de solução de frutose a 20% é capaz de alterar a ação anorexígena hipotalâmica da insulina e sinalizar a contribuição deste monossacarídio no desenvolvimento da obesidade por interferência no controle hipotalâmico da ingestão alimentar. Para isso, ratos *Wistar* aos 30 dias de vida, foram divididos nos grupos controle (C) e frutose (F). Ambos os grupos foram tratados com livre acesso a ração comercial e água (C) ou solução de frutose (F). Durante este período foi avaliada a ingestão alimentar, hídrica e energética de 24h e o ganho de massa corporal Aos 90 dias de vida foi analisado no hipotálamo a resposta anorexígena à insulina, o teor do receptor de insulina (IR), do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) e das formas fosforiladas das proteínas IR (p-IR) e Akt (p-Akt). Verificamos que não houve diferença significativa na massa corporal entre os grupos e o consumo de ração do grupo frutose foi menor, contudo este apresentou maior consumo energético na maior parte das semanas. Diferentemente do grupo C, os ratos F não responderam a ação anorexígena central da insulina, bem como apresentaram teores hipotalâmicos maiores das proteínas IR, IRS-1 e p-Akt. Os resultados confirmam a hipótese de que o

tratamento crônico com solução de frutose a 20% é capaz de modificar a ação anorexígena hipotalâmica da insulina em ratos *Wistar*. Contudo, o aumento no teor de importantes proteínas da via insulínica sugere uma adaptação compensatória com vistas a manter a funcionalidade e atividade satisfatória da via, o que não foi sustentado pelo teor do p-IR, o qual de certa forma parece contribuir na limitada atividade da via, considerando a ação deficitária da insulina no hipotálamo promovida pelo consumo de frutose.

Palavras-chave: frutose, sinalização insulínica, hipotálamo, ingestão alimentar, receptor de insulina, proteína Akt.

REPERCUSSIONS OF PROLONGED CONSUMPTION OF FRUCTOSE ON THE CENTRAL ANOREXIGENIC ACTION OF INSULIN

Viviane Wagner Ramos

February/2014

Advisor: Kelse Tibau de Albuquerque

Abstract

The increasing in prevalence of obesity in the world coincides with increasing of fructose intake by the population, conveyed mainly soft drinks. The consumption of this carbohydrate is associated with metabolic disorders that can compromise the central nervous system. Insulin acts in the hypothalamus inhibiting food intake, and in view of the scientific evidence linking the consumption of carbohydrate to damage the systems that regulate food intake, we hypothesized that consumption of fructose during 8 weeks is able to change hypothalamic anorexigenic action of insulin and the contribution of this sugar in the development of obesity. For this, Wistar rats at 30 days old were divided into control (C) and fructose (F) groups. Both groups were treated with free access to commercial chow and water (C) or 20% fructose solution (F). During this period, the 24h food and liquid intake were evaluated, as the energy and body mass gain. At 90 days old, we analyzed the hypothalamic response to insulin infusion, the content of the insulin receptor (IR), the insulin receptor substrate 1 (IRS -1) and phosphorylated forms of the IR (IR - p) and Akt (p -Akt) protein. We found that there was no significant difference in body mass between groups. However, the food intake of the fructose group was lower, but it showed higher energy consumption in most weeks. Unlike group C, F rats did not respond to central anorexigenic action of insulin, and had higher hypothalamic levels of IR, IRS-1 and p-Akt proteins. The results support the hypothesis that chronic treatment with a solution of 20% fructose is able to modify the hypothalamic anorexigenic action of insulin in rats, but the increase in the levels of important proteins in insulin pathway suggests a compensatory adjustment in order to maintain satisfactory functionality and activity of the cascade, which has not been

supported by the content of p-IR, which seems to contribute somewhat limited activity in the pathway, the insulin deficient in the hypothalamus promoted by the action of fructose consumption.
Keywords: fructose, insulin signaling, hypothalamus, food intake, insulin receptor, p-Akt,

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13

2. REVISÃO DE LITERATURA 14

2.1 Frutose: caracterização química, biológica e implicações à saúde. 14

2.2 Regulação da ingestão alimentar e ação da insulina 21

3. HIPÓTESE 25

4. OBJETIVOS 26

3.1 Objetivo geral 26

3.2 Objetivos específicos 26

5. MATERIAL E MÉTODOS 27

5.1 Questões éticas 27

5.2 Animais e condições experimentais 27

5.3 Grupos experimentais 27

5.4 Consumo alimentar, hídrico e energético, massa corporal e glicemia 27

5.5 Resposta alimentar à infusão intracerebroventricular (icv) de insulina 28

5.6 Quantificação do receptor de insulina (IR) e do substrato do receptor de insulina (IRS-1) 28

5.7 Avaliação da ativação inicial e final da cascata de insulina 28

5.8 Análise estatística 30

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 31

Artigo: Ingestão prolongada de frutose inibe a resposta anorexígena hipotalâmica da insulina em ratos 32

7. CONCLUSÃO 55

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 56

9. ANEXO 61

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Revisão de literatura

Figura 1. Metabolismo hepático da frutose. 17

Figura 2. Sinalização da insulina no Sistema nervoso central. 23

Figura 3. *Cross-talk* molecular entre insulina e leptina no controle da ingestão alimentar. 24

Resultados

Figura 1. Ganho de massa corporal semanal (A) e acumulado (B) dos grupos controle e frutose. 38

Figura 2. Consumo de ração (A), hídrico (B) e energético total (C) dos grupos controle e frutose. 39

Figura 3. Consumo de ração dos grupos controle (A) e frutose (B) após infusão intracerebroventricular de salina e insulina. 41

Figura 4. Teor hipotalâmico do receptor de insulina (IR), do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) e das formas fosforiladas do receptor de insulina (p-IR) e da proteína Akt (p-Akt) dos grupos controle e frutose. 43

ABREVIATURA E SIGLAS

11βHSD1	11 beta hidroxiesteróde desidrogenase tipo 1
α-MSH	Hormônio estimulador de melanócito
ADP	Adenosina difosfato
AgRP	Proteína relacionada à Agouti
Akt	Proteína Kinase B
AP	Antero posterior
ATP	Adenosina trifosfato
ARC	Núcleo arqueado
C	Controle
CART	Transcrito regulado por anfetamina e cocaína
ChREBP	Carbohydrate response element binding protein
DMH	Núcleo dorsomedial
DV	Dorsoventral
F	Frutose
FOXO 1	Forkhead box protein 1
GLP-1	Glucagon like peptide 1
GLUT-2	Glucose transporter 2
GLUT-4	Glucose transporter 4
GLUT-5	Glucose transporter 5
H6PDH	Hexose 6 fosfato desidrogenase
HFSC	High fructose corn syrup
ICV	Intracerebroventricular
IR	Receptor de insulina
IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
L	Lateral
LHA	Área lateral hipotalâmica
NAFLD	Doença hepática não alcoólica gordurosa
NFkβ	Fator nuclear kappa beta
NPY	Neuropeptídeo Y
p-Akt	Proteína Kinase B fosforilada
PI3K	Fosfatidilinositol quinase 3
p-IR	Receptor de insulina fosforilado
p-IRS 1	Substrato do receptor de insulina fosforilado
POF	Pesquisa de orçamento familiar
POMC	Pró-ópio-melanocortina
PFA	Área periformical
PVN	Núcleo paraventricular
SNC	Sistema nervoso central
SREBP 1C	Sterol receptor element-binding protein-1c
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VET	Valor energético total

VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VMH	Núcleo ventromedial

1. INTRODUÇÃO

A crescente prevalência mundial de obesidade coincide com a elevação do consumo de frutose pela população, veiculada principalmente em refrigerantes ou *soft drinks*. A ingestão aumentada deste carboidrato associa-se a modificações metabólicas semelhantes às decorrentes de dietas hiperlipídicas, razão pela qual tem sido alvo de grande investigação. A seu respeito, já foi descrita ação orexígena bem como associação a alterações do metabolismo endócrino, envolvidas no controle da ingestão alimentar e da massa corporal, capazes de favorecer a gênese da obesidade.

A insulina, importante por seus diversos efeitos sistêmicos periféricos, incluindo a regulação do metabolismo de macronutrientes, bem como por sua ação no sistema nervoso central (SNC), é um dos hormônios que pode ser afetado pelo consumo excessivo de frutose. Já foi sugerido que este monossacarídeo inclui-se entre os fatores causais de resistência à insulina nos tecidos adiposo, hepático e muscular. Por outro lado, os efeitos da frutose na homeostase do hormônio no SNC estão pouco claros, sobretudo se este glicídio seria capaz de alterar a sua ação anorexígena hipotalâmica e comprometer o consumo alimentar.

Neste trabalho, ratos machos *Wistar* foram tratados durante 8 semanas com solução de frutose a 20%, após o que foi avaliado o efeito desta ingestão crônica do carboidrato sobre o consumo alimentar e ganho de massa corporal dos animais. Em seguida, com o objetivo de identificar se a frutose atua no hipotálamo no mecanismo de regulação da ingestão alimentar, comprometendo a ação anorexígena da insulina, foi conduzido experimento destinado a avaliar a resposta alimentar à infusão intracerebroventricular (icv) deste hormônio. Na etapa subsequente, buscou-se identificar alterações na via de sinalização da insulina, por meio da quantificação de proteínas que participam dos passos iniciais desta via [receptor de insulina (IR) e substrato do receptor de insulina 1 (IRS1)]. A avaliação da atividade da cascata de sinalização, por meio da quantificação das formas fosforiladas das proteínas IR e proteína-quinase B (Akt) constituiu a etapa final do estudo, observando-se teores aumentados da fosforilação da proteína Akt em resposta ao tratamento. Estes resultados sugerem que a frutose atua no SNC, interferindo em processos de regulação da ingestão alimentar, mediados pela insulina, comprometendo etapas da via hipotalâmica de sinalização deste hormônio e permitem supor que a ingestão

prolongada de frutose pode, de fato, contribuir para o desenvolvimento de desordens capazes de conduzir à obesidade.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Frutose: caracterização química, biológica e implicações na saúde

A frutose ou levulose (C6H12O6) é um monossacarídeo, quimicamente formado por seis átomos de carbono, unidos em ligações covalentes simples, apresentando um grupamento carbonila no final da cadeia, sendo considerada uma cetohexose. É encontrado na natureza na forma livre ou como componente natural da sacarose, rafinose, estaquiose e inulina, além de estar presente nas frutas e contribuir com 50% do teor total de carboidratos presentes no mel de abelha (Barreiros *et al.*, 2005; Barclay *et al.*, 2012).

No início do século XX, as principais fontes alimentares de frutose da população eram naturais, porém nos últimos anos 30 anos, a indústria vem contribuindo de forma significativa para o aumento de sua ingestão (Bray *et al.*, 2004), especialmente em razão da utilização do "xarope de milho rico em frutose" (HFSC), adicionado a muitos alimentos, que possui características vantajosas para esse seguimento, como o poder edulcorante, umectante, o desenvolvimento de cor e aroma, a depressão do ponto de congelação e a estabilidade osmótica (Hanover e White, 1993).

A sacarose e o HFSC são amplamente utilizados para adoçar as bebidas consumidas pela população no mundo, em especial as bebidas carbonatadas (Bray *et al.*, 2004). A facilidade de manuseio do HFSC e o seu custo reduzido, desencadeou aplicação industrial em alta escala, resultando em maior acesso para o consumo da população.

Dados relativos ao consumo de frutose pela população norte americana mostram valores crescentes há algumas dezenas de décadas. Em 1900, a ingestão diária, essencialmente por meio de frutas e vegetais, era estimada em torno de 15 g 4% do valor energético total (VET). No período que antecede a Segunda Guerra Mundial, alcançava 24g e, ao final da década de 1990 atingia valores estimados em 55g, ou 10% do VET, entretanto, a população adolescente já consumia quantidades superiores do carboidrato (72,8g/dia), representando 12,1% do seu VET(Vos *et al.*, 2008).

No Brasil, apesar da escassez de informações sistemáticas acerca da ingestão de frutose, estima-se consumo de 4,3 g/dia do monossacarídeo livre, e de 27,5 g/dia, proveniente da sacarose (Barreiros *et al.*, 2005). Porém, segundo dados da Pesquisa de

Orçamento Familiar 2008 (IBGE, 2009) a projeção é de que esse valor pode ser ainda maior, considerando que refrigerantes representam o 5º produto alimentício mais consumido pelos brasileiros.

Embora a frutose tenha a mesma fórmula e massa molecular que a glicose, do ponto de vista fisiológico, ambas são processadas de formas distintas. A captação celular da glicose é regulada por diversos transportadores difundidos nos tecidos, e é facilitada pela liberação da insulina, que estimula a translocação do transportador GLUT 4 nos tecidos Samuel, 2010). De outro modo, os dois mecanismos envolvidos na absorção da frutose incluem o transporte facilitado, com baixa capacidade, e o outro, dependente de transportador, sendo o GLUT 5, aquele que apresenta especificidade para a molécula.

A frutose é primariamente metabolizada no fígado (Figura 1) e sua internalização no hepatócito é mediada também pelo transportador GLUT 2, não havendo gasto de energia ou necessidade de estímulo da insulina. A fosforilação da frutose em frutose-1-fosfato ocorre pela ação da frutoquinase, levando a formação de duas pentoses, a di-hidroxicetona e a gliceraldeído. Esta enzima não é regulatória e, portanto, pode favorecer a formação de produtos lipogênicos. De forma semelhante, a glicose é fosforilada por duas vezes antes do acesso à via da frutose, até o seu desdobramento em di-hidroxicetona e gliceraldeído, entretanto, seu metabolismo depende da enzima limitante fosfofrutoquinase, que é inibida por ATP e citrato, dificultando o acúmulo de intermediários ricos em carbono para entrar no ciclo de Krebs (Barreiros *et al*., 2004; Johnson *et al*., 2009; Samuel, 2011).

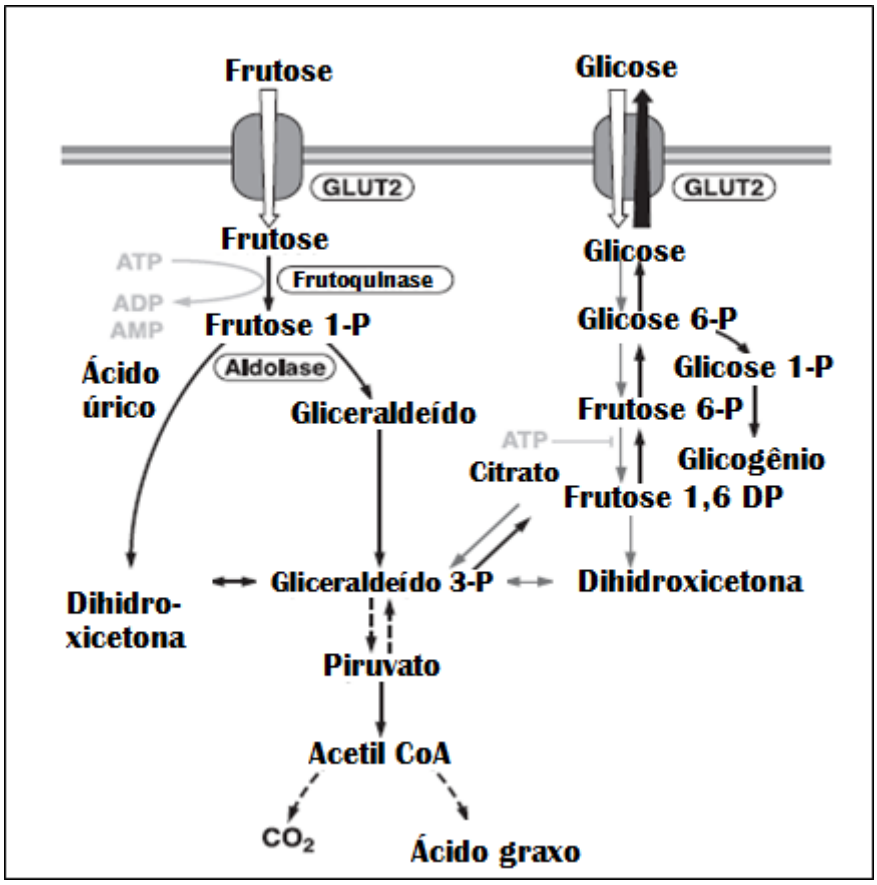


Figura 1. Metabolismo hepático da frutose (Tappy e Lê, 2010)

A frutose já foi indicada para tratamento de diabéticos por não estimular a secreção de insulina, mas não há consenso para sua utilização, visto que seu consumo crônico tem sido associado a desordens metabólicas (Ludwig, 2013).

Diferentes investigações têm demonstrado que a ingestão de frutose, na forma pura ou em misturas de carboidratos, em diferentes concentrações e períodos de tempo, imprime riscos à saúde tanto do organismo humano (Akhavan e Anddeson, 2007; Teff *et al*., 2009), quanto de roedores (Djordjevic et al., 2013).

A utilização de teores de frutose considerados muito elevados (≥ 50%) nos modelos experimentais empregados tem sido alvo de críticas, na medida em que não representaria o consumo usual da população. Do mesmo modo, a fonte de frutose oferecida, também é questionada, tendo em vista que humanos geralmente consomem frutose associada à glicose, conforme se encontra no açúcar, no HFSC e no mel (White, 2013). Contudo, a utilização de frutose livre, comparada a sua presença em misturas, se demonstra mais prejudicial à saúde (Sheludiakova *et al.*, 2012).

Dentre as desordens metabólicas associadas ao consumo elevado de frutose, figuram entre aquelas mais observadas: hipertriacilglicerolemia, hiperuricemia, hiperinsulinemia, esteatose hepática, comprometimento vascular, resistência periférica à insulina e aumento de adiposidade visceral, podendo ocorrer ou não elevação (substitui somente para evitar repetir o termo "aumento") do consumo alimentar e da massa corporal (Wiernsperger *et al.*, 2010). Recentemente, evidências científicas têm sinalizado para o envolvimento da frutose em alterações no SNC. A este respeito, já foram descritos prejuízos na neurogênese, resistência central à insulina e comprometimento do sistema central de regulação da ingestão alimentar e, por esta razão, também se atribui à ingestão aumentada de frutose, participação no desenvolvimento da obesidade (Convit, 2005; Messie, 2005, Ross *et al.*, 2009).

Parte dos avanços na epidemiologia da obesidade vem sendo atribuída à elevação paralela do consumo de frutose, veiculada essencialmente em produtos contendo HFSC e açúcar refinado, contudo, esta relação é, atualmente, alvo de intenso debate científico (Bray, 2013).

Frutose em excesso pode guardar relação com o estabelecimento da obesidade por estar envolvida na desregulação de vias metabólicas do tecido adiposo e favorecer a lipogênese *de novo*. Ratos tratados por 9 semanas com solução de frutose a 10% apresentaram aumento na expressão das enzimas 11-beta-HSD1 (*11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1*) e H6PDH (*hexose-6-phosphate dehydrogenase*) e nos teores de corticosterona no tecido adiposo. Embora estes animais não tenham apresentado excesso de adiposidade corporal, o conteúdo aumentado de triacilgliceróis plasmáticos e de ácidos graxos livres sinalizam condições propícias para o estabelecimento da obesidade em longo prazo (Bursac *et al.*, 2013).

O aumento na taxa de lipogênese *de novo*, decorrente do consumo elevado de frutose, pode ampliar a disponibilidade de ácidos graxos, por efeito direto sobre a síntese destes compostos. A frutose estimula fatores de transcrição SREBP 1c e ChREBP, responsáveis pela ativação de genes que codificam enzimas envolvidas na via lipogênica (Tappy e Lê, 2010; Samuel, 2011; Dekker *et al.*, 2010). Além disso, age, indiretamente, aumentando os teores hepáticos de malonil-CoA, levando à inibição da oxidação de ácidos graxos, bloqueando a transferência destes lipídeos para o interior da mitocôndria assim como a via da palmitoil-transferase. Ambos os mecanismos contribuem para ampliação da esterificação ou re-esterificação de ácidos graxos, maior síntese de triacilgliceróis, caracterizando a hipertriacilglicerolemia induzida pela frutose

Barreiros *et al.*, 2005; Basciano *et al.*, 2005), aumento dos teores hepáticos de VLDL, resistência à insulina nos tecidos adiposo e hepático (Tappy e Lê, 2010; Samuel, 2011; Stanhope, 2012) e depósito de gordura no tecido adiposo visceral (Ludwig, 2013). Quando este quadro se conjuga com estresse oxidatixo ou deficiência de nutrientes antioxidantes, pode ocorrer fibrose hepática, com consequente desenvolvimento de cirrose, caracterizando a doença hepática gordurosa não alcoólica (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD*) (Lim *et al.*, 2010).

Foi observado que ratos Wistar alimentados com ração enriquecida com frutose, por um período de 28 dias, apresentaram menor teor de fosforilação do IR e do IRS-1, tanto hepático como muscular, demonstrando que prejuízos nos passos iniciais da cascata de sinalização da insulina podem justificar a resistência ao hormônio causada por este carboidrato (Bezerra *et al*., 2000).

A sobrecarga de frutose também tem sido associada ao risco cardiovascular aumentado. A molécula de ADP, formada após a fosforilação da frutose em frutose-1-fosfato, é metabolizada, levando à formação de ácido úrico. Este composto inibe a biodisponibilidade de óxido nítrico, um modulador chave na função vascular (Nagawa *et al.*, 2006; Tappy e Lê, 2010), contribuindo para a hipertensão e disfunção endotelial (Ludwig, 2013).

Há consenso acerca do fato de que as doenças crônicas são acompanhadas por processos inflamatórios assim como a inflamação pode preceder o futuro desenvolvimento destas enfermidades. Contudo, independente do agente iniciante, a relação entre o processo inflamatório e resistência à insulina é bidirecional, ou seja, qualquer estado inflamatório crônico induz à resistência ao hormônio, e esta, por sua vez, acentua a inflamação (Volp *et al*., 2008).

Neste contexto, consumo aumentado de frutose está relacionado a um estado pró-inflamatório, podendo ser responsável por aumentar a produção de fator de necrose tumoral-α (TNF-α) e *c-Jun amino terminal kinase* (JNK) (Mille e Adeli, 2008). Ratos suplementados por duas semanas com solução de frutose ou glicose a 10% apresentaram redução na quantidade de receptores ativados por proliferador de peroxissomo-alfa (PPAR-α) e aumento da ativação do fator de transcrição nuclear kappa-beta (NF-kβ), somente no grupo frutose (Roglans et al., 2007). O TNF-α colabora para a desregulação da via de sinalização da insulina por favorecer a fosforilação em serina do IRS-1, mediada pela ativação da JNK e NF-kβ (Dekker *et al.*, 2010) .

Ademais, a diminuição do PPAR-α reduz a oxidação de ácidos graxos e aumenta o teor de lipídeos disponíveis e a hipertriacilglicerolemia (Miller e Adeli, 2008).

Apesar da dieta rica em frutose levar a alterações bem conhecidas nos sistemas periféricos, ainda é controverso o efeito deste carboidrato sobre a regulação central da ingestão alimentar e a capacidade de suscitar mudanças na expressão de neuropeptídios hipotalâmicos que, subsequentemente, podem levar à obesidade.

Normalmente, o cérebro utiliza a glicose como fonte de carbono para produção de energia (Leloup *et al.*, 1994), porém há evidências moleculares e bioquímicas de que a frutose pode desempenhar papel neuroenergético Funari *et al.*, 2005; Shu *et al.*, 2006; Funari *et al.*, 2007). De fato, o cérebro expressa genes requeridos para o metabolismo da frutose (Funari *et al.*, 2005), como o gene do transportador GLUT 5, encontrado em células *purkinjes* do cerebelo, tendo sido demonstrado que, em curto prazo, a ingestão de frutose promoveu aumento da expressão de GLUT 5 no cérebro de ratos (Shu *et al.*, 2006). Essas evidências reforçam a ideia de que este transportador constitui mecanismo de condução da frutose ao SNC e que o tecido cerebral é alvo de efeitos diretos da ação da frutose.

Há indícios de que a frutose é capaz de provocar mudanças no metabolismo energético, afetando hormônios envolvidos no controle da ingestão alimentar. Acredita-se que, desta forma, a frutose pode agir no SNC como um nutriente potencialmente orexígenos (Miller *et al.*, 2002).

Lindqvist, Baelemans e Erlanson-Albertsson (Lindquivist *et al.*, 2008) relataram aumento nos teores séricos de grelina e leptina de ratos, após 2 semanas de tratamento com solução a 23% de frutose. Entretanto, apesar da elevação da leptinemia, foi verificada menor saciedade, evidenciando redução da efetividade desta adipocina anorexígena. As alterações no conteúdo de grelina e leptina não foram exclusivas para a frutose. O consumo excessivo de glicose e sacarose também induziu aumentos séricos semelhantes em ambos os hormônios. Interessantemente, Shapiro *et al.*, (2008) evidenciaram, em ratos, que o consumo crônico de dieta contendo 60% de frutose causa resistência à leptina, antes mesmo da manifestação de alterações na massa corporal e de aumento do conteúdo sérico de insulina, leptina e glicose, atestando os efeitos deletérios deste carboidrato .

Burmeister *et al*. (2013) encontraram que a frutose estimula a ingestão de alimentos, ao alterar a ação central do GLP-1R *(Glucagon-Like Peptide-1 Receptor)*, ativado pela GLP-1 *(Glucagon-Like Peptide-1)*, que possui importante efeito incretina, e

não diminui os teores de grelina (Page *et al.*, 2013). Desta forma, estes mecanismos também estariam envolvidos nos efeitos da frutose sobre a atividade da insulina no SNC e o consumo alimentar.

Em humanos, Teff *et al.*,(2004) observaram que a ingestão de bebidas contendo frutose juntamente com a refeição resulta, em curto prazo, na redução do conteúdo circulante de insulina e leptina e aumento no de grelina, o que contribui substancialmente para a elevação da energia ingerida e o ganho de massa corporal. Por outro lado, se o consumo de dieta rica em frutose promove, a curto prazo, redução das concentrações de leptina e insulina, como resultado da ingestão crônica deste monossacarídeo, se estabelece hiperleptinemia e hiperinsulinemia, com prováveis repercussões na homeostase energética (Havel, 2005).

2.2 Regulação da ingestão alimentar e ação da insulina

O organismo é dotado de um complexo sistema fisiológico que mantém a massa corporal relativamente constante, apesar das variações diárias da ingestão alimentar e do gasto energético. Com a perda de massa, adaptações fisiológicas resultam em aumento da fome e diminuição da energia consumida, enquanto respostas opostas são deflagradas quando há elevação da massa corpora (Schwartz *et al.*, 2000; Boguszewski *et al.*, 2010).

Este circuito que controla a ingestão alimentar é fundamental para a homeostase de energia e funciona por meio de múltiplas interações entre órgãos periféricos, incluindo tecido adiposo, tireóide, músculos, intestino e gônadas e o SNC, influenciadas por fatores comportamentais, sensoriais, autonômicos, nutricionais e endócrinos (Boguszewski *et al.*, 2010; Lopez *et al.*, 2010).

Em resposta à ingestão alimentar, as concentrações de nutrientes circulantes aumentam, dando início a uma série de mudanças no perfil endócrino que alcançam o cérebro e estabelecem um circuito de comunicação por meio de neuropeptídeos. Esses hormônios podem ser categorizados em dois sistemas: o primeiro, ativado em curto prazo, estimula sinais relacionados às refeições, como a grelina e colecistoquinina. O segundo, desencadeado em longo prazo, inclui hormônios cuja liberação na circulação é proporcional à quantidade de gordura corporal, como a leptina e insulina (Stanley *et al.*, 2005; Lopez *et al.*, 2010).

O hipotálamo constitui área do SNC com ação fundamental no controle da ingestão alimentar e da massa corporal. Morfologicamente pode ser dividido em seis regiões:

núcleo arqueado (ARC), núcleo paraventricular (PVN), núcleo dorsomedial (DMH), núcleo ventromedial (VMH), área lateral hipotalâmica (LHA) e área periformical (PFA). O ARC e o núcleo do trato solitário, no tronco encefálico, são os principais locais de convergência e integração dos sinais periféricos e centrais de regulação de ingestão alimentar e gasto energético (Schwartz *et al.*, 2000; Stanley *et al.*, 2005; Boguszewski *et al.*, 2010).

No hipotálamo há duas populações de neurônios que promovem tanto efeitos anabólicos/orexígenos, como efeitos catabólicos/anorexígenos. Dentre os neuropeptídios orexígenos conhecidos estão o neuropeptídeo Y (NPY), proteína relacionada à *Agouti* (AgRp), hormônio concentrador de melanina, hipocretina 1 e 2 (ou orexina a e b), galanina e noradrenalina. Os neuropeptídios anorexígenos incluem o hormônio estimulante de melanócitos (*melanocyte-stimulating hormone,* MSH), hormônio liberador de corticotropina, hormônio liberador de tireotropina, transcrito regulado por anfetamina e cocaína (CART), urocortina, ocitocina, neurotensina, serotonina, entre outros (Schwartz *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2010).

A insulina é um hormônio anabólico, produzido pelas células beta do pâncreas, secretado em resposta ao aumento dos teores circulantes de glicose e aminoácidos e, proporcionalmente, à adiposidade corporal. O hormônio age em vários tecidos periféricos, como fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, promovendo: ampliação da captação de glicose, principalmente em tecido muscular e adiposo, aumento da síntese de proteínas, bloqueio da produção hepática de glicose, lipólise e proteólise, participando ativamente na homeostase de energia (Carvalheira *et al.*, 2002; Pauli *et al.*, 2009).

Adicionalmente aos seus efeitos periféricos, a insulina também age no SNC promovendo ação anorexígena, e consequente controle da homeostase energética. Para iniciar a sinalização intracelular e exercer seus efeitos no hipotálamo o hormônio se liga a uma proteína específica transmembrana, o receptor de insulina que possui característica e atividade quinase intrínseca e está amplamente distribuída no cérebro, principalmente nas áreas hipotalâmicas envolvidas com a ingestão alimentar (Ghaseni *et al.*, 2013).

O IR é composto por quatro subunidades, sendo duas alfas e duas betas, e sua ativação resulta na fosforilação, em resíduos de tirosina, de diversos substratos, incluindo IRS-1 e IRS-2. A fosforilação das proteínas IRS cria sítios de ligação para outra proteína citosólica, denominada fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K), que ativa a

fosforilação da proteína quinase B ou Akt (Kin e Feldman, 2012). A PI3-K é um dímero composto por uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). A ligação dos sítios fosforilados das proteínas IRS ao domínio SH2 da subunidade p85 da PI3-K ativa o domínio catalítico associado (Carvalheira *et al.*, 2002)(Figura 2).

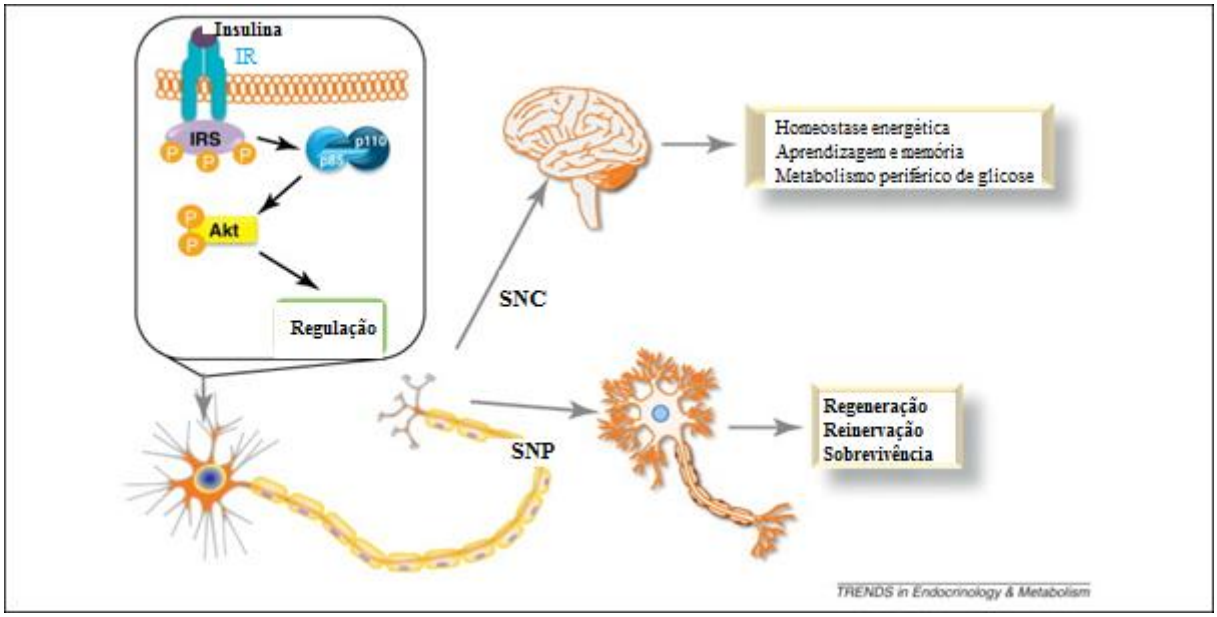


Figura 2. Sinalização da insulina no Sistema Nervoso Central e sistema nervoso periférico (PNS) (Kim e Feldman, 2012).

A insulina regula a ingestão de alimentos por meio da via IRS-PI3K que, em condições normais, ativa a fosforilação da proteína AKT que, consequentemente, degrada e inativa o fator de transcrição FOXO1, resultando em aumento da transcrição de neuropeptídeos anorexígenos e pró-termogênicos (Kim *et al.*, 2006; Belgardt e Bruning, 2010; Nazarians-Armavil *et al.*, 2013). Desta forma, é descrito que a insulina age suprimindo o NPY/AgRP, enquanto o CART e o POMC - pró-hormônio que origina o MSH e corticotrofina - são ativados por estes hormônios, sendo, então, desencadeados seus efeitos anorexígenos (Schwartz *et al.*, 2000; Porte *et al.*, 2005).

Os fatores de transcrição FOXO pertencem à família *Forkhead Box*, que controlam funções intrínsecas da célula, como divisão celular, diferenciação e sobrevivência. Em mamíferos, os membros dessa família são FOXO 1, 3, 4 e 6 e, do ponto de vista fisiológico, a ação do FOXO1 no núcleo das células hipotalâmicas está relacionada à transcrição de neuropeptídeos orexigênicos e antitermogênicos (Kim e Feldman, 2012).

Os hormônios anorexígenos insulina e leptina se integram na ativação de diferentes vias neuropeptídicas e esta interface denomina-se *cross-talk* molecular. Ambos os hormônios parecem exercer papel autorregulador sobre seus próprios efeitos fisiológicos (Figura 3). Desajustes nestes complexos mecanismos de regulação neural da homeostase energética estão relacionados à obesidade (Schwartz *et al.*, 2000; Belgardt e Bruning, 2010).

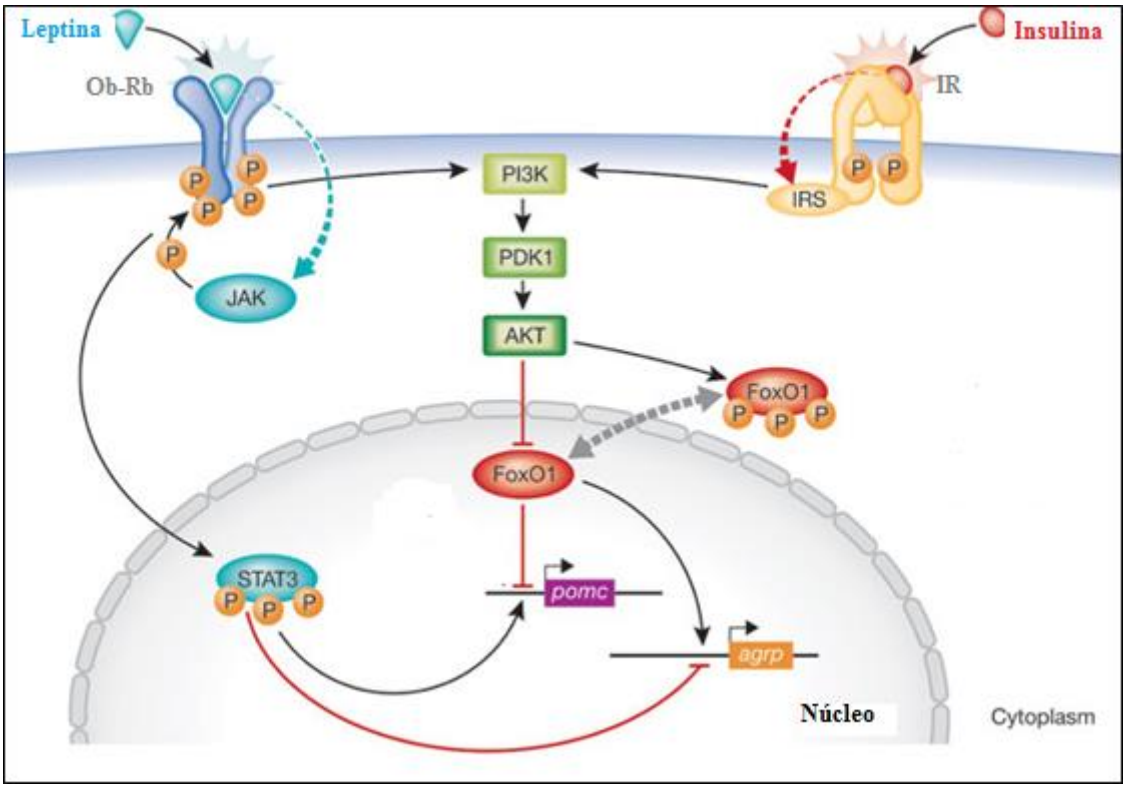


Figura 3. *Cross–talk* molecular entre insulina e leptina no controle da ingestão alimentar (Varela e Hovath, 2012).

Pouco tem sido avaliado em relação aos efeitos da frutose sobre a homeostase da insulina no âmbito do sistema nervoso central. Algumas evidências relacionaram o consumo excessivo de frutose a alterações na homeostase deste hormônio, por meio de avaliações cognitivas. Ratos alimentados com doses elevadas de frutose apresentaram maior déficit de memória (Convit, 2005; Messier, 2005), tendo sido relatada associação positiva entre resistência à insulina e diminuição, em longo prazo, de neurônios do hipocampo, possivelmente em razão do papel chave da insulina na plasticidade sináptica neuronal (Mielke *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 2009).

3. HIPÓTESE

Neste trabalho acredita-se que a frutose por sua habilidade em ultrapassar a barreira hematoencefálica, age no sistema nervoso central configurando-se como uma substância orexígena. E esse efeito pode ser, em partes, por atenuar a ação anorexígena da insulina hipotalâmica.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar se o consumo prolongado de frutose altera a ação anorexígena hipotalâmica da insulina em ratos machos *Wistar*.

4.2 Objetivos específicos

i. Avaliar a ingestão alimentar e massa corporal;

i.i Investigar a resposta alimentar à infusão intracerebroventricular de insulina;

i.i.i Quantificar o teor hipotalâmico do receptor de insulina (IR), do substrato do receptor de insulina 1 (IRS1) e das formas fosforiladas das proteínas IR e proteína-quinase B (Akt).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Questões éticas

O presente protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob o número de referência Macaé14, como parte de um projeto "guarda-chuva" intitulado "Efeitos dos diferentes componentes da dieta e atividade física sobre sistemas que regulam a ingestão alimentar" (Anexo 1).

5.2 Animais e condições experimentais

Ratos Wistar, recém-desmamados (30 dias), foram distribuídos em gaiolas coletivas, com cinco animais por gaiola, e mantidos por 8 semanas no biotério do Laboratório de Nutrição experimental, sob ciclo de luz de 12 horas (6h às 18h), temperatura constante (24 + 1°C) e livre acesso a água ou solução aquosa a 20% de frutose e ração comercial Nuvilab®, até eutanásia, aos 90 dias de vida.

5.3 Grupos experimentais

Para este estudo, a partir dos 30 dias de vida animais foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos experimentais, a saber: **grupo controle (C)**, animais que receberam, ao longo de 8 semanas, ração comercial e água filtrada *ad libitum* e **grupo frutose (F)**, animais que receberam, ao longo de 8 semanas, ração comercial e solução de frutose 20% *ad libitu.m*

5.4 Consumo alimentar, hídrico e energético de 24h, massa corporal e glicemia

A estimativa do consumo alimentar bem como da ingestão de água e de frutose dos grupos experimentais foi estabelecida, durante as 8 semanas de tratamento, com base na avaliação da diferença de peso entre a quantidade oferecida e a sobra de ração ou frutose, após 24 horas.

Para a quantificação da ingestão média de energia (kcal/dia) foi considerado o consumo de ração e da frutose, utilizando-se os fatores de conversão de energia para lipídeos (9 kcal/g), proteínas e carboidratos - incluindo a frutose (4 kcal/g). Durante todo o período de coleta dos dados, os ratos foram mantidos em gaiolas individuais.

A massa corporal foi avaliada durante as 8 semanas de tratamento e estimado o ganho de peso final dos grupos.

Para a dosagem da glicose foi empregado método enzimático, utilizando-se kit comercial com limite de detecção de 0,41mg/dL (Glicose PAP Liquiform, Labtest Diagnóstica). Foram pipetados 2µL de amostra do soro de cada animal e 200µL de reagente nas placas de micro ensaio. Após incubação a 37°C durante 15 minutos, a leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplacas (Asys Expert 96, Cambrige, Reino Unido) a 505nm e os resultados foram expressos em mg/dL.

5.5 Resposta alimentar à infusão intracerebroventricular (icv) de insulina

Aos três meses de idade os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânula icv. O procedimento foi realizado em aparelho estereotáxico, com os animais (para evitar repetir "ratos") profundamente anestesiados com a mistura ketamina/xilazina (1:1) (67/13 mg/kg de massa corporal, i.p.) e a implantação de cânula guia (21 G; 1,7 cm) no ventrículo cerebral lateral esquerdo, obedeceu as seguintes coordenadas: antero posterior (AP) -1,3mm; Lateral (L) + 2 mm e dorsoventral (DV) -3,4 mm; a partir do bregma (Paxinos e Watson, 2005).

Após a cirurgia os animais receberam dose única de antibiótico (0,2 g/kg de massa corporal) e permaneceram no biotério em gaiolas individuais com livre acesso a água ou solução de frutose e ração, durante um período de 6 dias.

No sétimo dia pós-operatório, os animais previamente jejuados por um período de 6 horas, pesados e, em seguida, receberam infusãode 5 µL de veículo (solução salina 0,9%) ou 5 µL de insulina regular (Humana recombinante, Biobrás, Minas Gerais, Brasil), diluída em veículo, correspondente a uma dose de 20 mU . As infusões foram realizadas sempre ao final do ciclo claro (17-18 h), e em seguida, foi oferecida quantidade conhecida de ração e o consumo avaliado após 12 e 24 horas, a partir da infusão[57]. Todos os ratos receberam ambas as infusões, sendo controles de si mesmo.

5.6 Quantificação hipotalâmica do receptor de insulina (IR) e do substrato do receptor de insulina I (IRS1)

O hipotálamo de cada rato foi retirado e rapidamente homogeneizado em 1 mL de tampão de extração de proteínas (Trizma base 100 mM, pH 7,5; Aprotinina 0,1 mg/mL; PMSF 2 mM; Ortovanadato de sódio 10 mM; Fluoreto de sódio 100 mM; Pirofosfato de sódio 10 mM e EDTA 10 mM). Em seguida, as amostras foram

adicionadas de 100 µL de Triton X-100 10%, mantidas em gelo por 30 minutos e centrifugadas a 12.000 rpm/ 20 minutos a 4° C. Os sobrenadantes foram coletados e mantidos em freezer a -80°C até a realização da eletroforese.

No dia do experimento foi realizada a dosagem de proteínas totais utilizando kit de reagentes do ácido bicinconínico (BCA, Bioagency, São Paulo, Brasil) (Lowry *et al*, 1951). A quantidade de amostra, normalizada por concentração proteica (50 µg), foi adicionada de 25 µL de tampão Laemmeli (Azul de bromofenol 0,01 %; Fosfato de sódio 50 mM; Glicerol 25 %; SDS 1 %) contendo DTT (200 mM).

As proteínas do tecido foram extraídas e separadas por eletroforese. Após esta etapa, as amostras foram transferidas, a 100 V por 90 minutos sob refrigeração, para membrana de nitrocelulose (RPN303E; GE Healthcare, São Paulo, Brasil). As membranas foram bloqueadas a 4°C, *overnight*, em 5 mL de solução composta de solução basal (Trizma base 100 mM; EDTA 1 mM; Triton X-100 0,5%) e albumina a 1-3%.

No dia seguinte, após duas lavagens de 5 minutos com solução basal, a membrana foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente, com os anticorpos anti-IR (1:1000; #3025; Cell Signalling, Boston, Estados Unidos), ou anti-IRS1 (1:1000; #2382; Cell signaling, Boston, Estado Unidos), diluídos em solução de bloqueio. Após 3 lavagens de 10 minutos com solução basal a membrana foi incubada com anticorpo secundário associado a peroxidase (anti-rabbit; A0545, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) por 1 hora, seguida de 3 lavagens de 10 minutos com solução basal e preparada para revelação.

Para identificação, as proteínas foram impressas em filme de raio-X (28-9068-37; GE Healthcare, São Paulo, Brasil) por reação de quimioluminescência com reagente ECL (RPN2232; GE Healthcare, São Paulo, Brasil) e comparadas ao peso molecular de proteína padrão (1610324-Bio-rad, São Paulo, Brasil).). As bandas das proteínas de interesse foram quantificadas por densitometria, utilizando-se o *software* Image J (NIH Image, Bethesda, Maryland, EUA).

5.7 Avaliação da ativação inicial (IR-tyr) e final (Akt-ser) da cascata de sinalização da insulina

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânula guia e, após sete dias de recuperação cirúrgica, os ratos em jejum de 12 horas foram levemente anestesiados com ketamina/xilazina (33/6,5 mg/ Kg) e receberam

infusão icv de insulina (20 mU, controle positivo)[59] diluída em 10 µL do veículo ou receberam 10 µL do próprio veículo (controle negativo). Para a garantia da ativação da via insulínica, 13 minutos após a infusão da insulina, os ratos foram decapitados em guilhotina e o hipotálamo rapidamente retirado, homogeneizado em 1mL de tampão de extração de proteína gelado e seguiu-se o protocolo de *Western blotting,* conforme descrito anteriormente. Foram avaliadas as proteínas fosforiladas IR-tyr 1162/1163 (1:1000; sc-25103; Santa Cruz Biotechnology**,** Dallas, Estados Unidos) e Akt-ser 473 (1:1000; #9271; Cell Signalling, Boston, Estados Unidos), utilizando-se anticorpos contra estas proteínas. Em seguida, as membranas foram reincubadas com anticorpo secundário associado à peroxidase (anti-rabbit; A0545, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

5.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e utilizou-se o teste t' Student empregando o pacote SPSS (versão 20.0). Foi adotado o nível de significância de $p<0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão deste estudo estão apresentados no artigo científico, a ser submetido ao periódico *Nutrition* (ISSN:0899-9007. Los Angeles, Calif.).

INGESTÃO PROLONGADA DE FRUTOSE INIBE A RESPOSTA ANOREXÍGENA HIPOTALÂMICA DA INSULINA EM RATOS

Ramos VW, Albuquerque KT.

Laboratório de Nutrição Experimental, Universidade Federal do Rio de Janeiro– Campus UFRJ-Macaé, Brasil. 50 Aloísio da Silva Gomes, 27930-560 - Macaé – Rio de Janeiro, Brasil.

Corresponding Author: Drª Kelse T de Albuquerque. Adress: 50 Aloísio da Silva Gomes, 27930-560 - Macaé – Rio de Janeiro, Brasil. E-mail: kelsealbuquerque@macae.ufrj.br

Resumo

O consumo aumentado de frutose associa-se a desordens metabólicas que podem comprometer o sistema nervoso central. A insulina age no hipotálamo inibindo a ingestão alimentar e, tendo em vista as evidências científicas que relacionam o consumo deste carboidrato a prejuízos aos sistemas que regulam a ingestão alimentar, hipotetizamos que consumo de solução de frutose a 20% durante 8 semanas é capaz de alterar a ação anorexígena hipotalâmica da insulina e confirmar a contribuição deste monossacarídio no desenvolvimento da obesidade por interferência no controle hipotalâmico da ingestão alimentar. Para isso, ratos *Wistar* aos 30 dias de vida, foram aleatoriamente alocados nos grupos controle (C) e frutose (F). Ambos os grupos foram tratados com livre acesso à ração comercial e água (C) ou solução de frutose (F). Durante este período foi avaliada a ingestão alimentar, hídrica e energética de 24h e o ganho de massa corporal. Aos 90 dias de vida foi analisado no hipotálamo a resposta anorexígena à insulina, o teor do receptor de insulina (IR), do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) e das formas fosforiladas das proteínas IR (p-IR) e Akt (p-Akt). Verificamos que não houve diferença significativa na massa corporal entre os grupos e o consumo de ração do grupo F foi menor durante o período, contudo, o seu consumo energético foi maior. Diferentemente do grupo C, os ratos F não responderam a ação

anorexígena central da insulina, bem como apresentaram teores hipotalâmicos elevados das proteínas IR, IRS-1 e p-Akt, entretanto, não foi verificada diferença no teor do p-IR. Os resultados confirmam a hipótese de que o tratamento crônico com solução de frutose a 20% é capaz de modificar a ação anorexígena hipotalâmica da insulina em ratos *Wistar*, contudo, o aumento no teor de importantes proteínas da via de sinalização do hormônio sugere adaptação compensatória com vistas a manter a funcionalidade e atividade satisfatória da via, o que não foi sustentado pelo teor do p-IR, sugerindo que este possa, entre outros fatores ainda não conhecidos, estar envolvido na limitada atividade da via.
Palavras-chave: frutose, sinalização insulínica, hipotálamo, ingestão alimentar, ratos.

Introdução

O aumento do consumo de frutose nos últimos anos se deu paralelo à elevação da prevalência mundial da obesidade [1,2]. Esta relação tem despertado interesse sobre as repercussões deste monossacarídeo na saúde, de maneira que a elucidação dos mecanismos envolvidos no seu metabolismo torna-se importante.

A ingestão de alimentos palatáveis e de alta concentração energética constitui hábito alimentar típico entre adolescentes em diferentes países [3]. Estudo realizado com jovens brasileiros apontou frequente e expressivo consumo de bebida açucarada, especialmente suco de fruta industrializado e refrigerante não dietético [4]. Estes podem contribuir para prejuízos metabólicos importantes em razão da expressiva presença de frutose, que tem sido relacionada a alterações sistêmicas periféricas [5,6]. Nos últimos anos, outras evidências têm sugerido que o elevado consumo de frutose constitui determinante de desordens que podem comprometer a funcionalidade do sistema nervoso central [7,8].

A frutose está presente em diferentes produtos dietéticos. Xarope de milho, sacarose, refrigerantes, frutas e derivados, cereais e produtos lácteos representam seus principais veículos alimentares, sendo o seu consumo na forma de *soft drinks* [7,9] considerado problema de saúde pública [10], associado a desordens como a síndrome metabólica, resistência periférica à insulina e doenças cardiovasculares.

De maneira interessante, as investigações começam a revelar o metabolismo da frutose no sistema nervoso central, no entanto, apesar de já ter sido demonstrada a

relação da frutose com déficit de memória [11], ainda pouco se conhece sobre os mecanismos fisiológicos e bioquímicos que efetivamente se modificam pela ação deste carboidrato no cérebro. Sugere-se que a frutose alcança o sistema nervoso central através da barreira hematoencefálica [12] e parece atuar no sistema de regulação da ingestão alimentar [13,14], estimulando o consumo de alimentos.

A alteração nos teores de triacilgliceróis, induzida pela frutose, afetou o hipocampo, contribuindo para o déficit de memória e diminuição da sinalização da insulina nesta região do cérebro [7]. Além disso, recentemente atribuiu-se ao consumo de frutose, prejuízos na gênese neuronal do núcleo do trato solitário em ratos [15], o que pode comprometer a homeostase energética.

Burmeister *et al* [16] verificaram que a frutose pode estimular a ingestão alimentar por promover prejuízos na ação central do receptor do peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), reforçando as evidências de que este monossacarídeopode contribuir para aumentar a prevalência da obesidade e demonstrando que, de fato, o seu consumo excessivo altera a funcionalidade hipotalâmica.

A frutose, quando infundida intracerebroventricular, levou à resposta alimentar orexígena em ratos [13], depletou os teores de ATP e de malonil-CoA hipotalâmicos [14]. Tomados juntos, estes trabalhos reforçam a hipótese de que a frutose age no sistema nervoso central inibindo mecanismos anorexígenos de regulação da ingestão.

Considerado carboidrato lipogênico, a frutose altera fatores de saciedade no cérebro e induz resistência à leptina [17]. Recentemente foi demonstrado que o consumo prolongado de frutose em solução a 10%, induziu resistência à insulina no hipocampo, sem prejuízos da plasticidade, porém em concentrações da ordem de 60%, produziu danos estruturais e aumento na sinalização dos glicocorticoides [18]. Este resultado, associado ao aumento da expressão de GLUT5 em cérebro de ratos, promovido pela frutose, sugere que os glicoreceptores participam do mecanismo de utilização da frutose como fonte alternativa de energia para o cérebro [19], tendo em vista que neurônios cerebrais são reconhecidamente capazes de utilizar este carboidrato [12].

Contudo, pouco tem sido avaliado em relação aos efeitos da frutose sobre a homeostase da insulina no hipotálamo. Assim, sustentando a condução científica de que a frutose age no cérebro nos mecanismos de regulação da energia, hipotetizamos que o consumo prolongado de frutose seria capaz de alterar a ação anorexígena central e comprometer proteínas da via de sinalização insulínica no hipotálamo de ratos.

Material e métodos

Desenho experimental

Machos Wistar, 30 dias de vida, foram mantidos no Biotério, sob ciclo de luz e temperatura controlados, aleatoriamente distribuídos em gaiolas coletivas (5 ratos) e tratados por 8 semanas com livre acesso a ração comercial e água (grupo Controle, C) ou solução de frutose 20% (grupo Frutose, F). A solução de frutose foi a única fonte hídrica oferecida ao grupo F e teve como objetivo reproduzir uma das principais fontes de frutose utilizadas pela população (bebidas adoçadas). Os protocolos do estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

.

Ingestão alimentar, massa corporal e glicemia

Para avaliar a ingestão alimentar e de frutose, no período de 24h, e a massa corporal semanal, os ratos foram mantidos em gaiolas individuais e ambas as ingestões foram medidas pela diferença entre a oferta e a sobra de ração ou frutose. A ingestão energética foi estimada considerando 9 kcal/g de lipídios e 4 kcal/g de proteína e carboidrato provenientes do consumo da ração e da solução de frutose a 20%.

Para a dosagem da glicose foi utilizado método enzimático (Glicose PAP Liquiform, Labtest Diagnóstica).

Infusão intracerebroventricular (icv) de insulina

Para a injeção de insulina ou veículo (salina 0,9%) os animais, após anestesia com ketamina/xilazina (66,7/13 mg/Kg, i.p.), foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de uma cânula guia (21G; 1,7 cm) no ventrículo lateral esquerdo hipotalâmico, segundo as coordenadas: Antero Posterior: -1,3 mm, Lateral: +2,0 mm e Dorso Ventral: -3,4 mm [20]. Para prevenir infecções os animais receberam dose única de anti-inflamatório. No 7º dia pós-operatório, em jejum de 6 h, os ratos receberam, através da cânula guia, dose do veículo (5 µL) ou de insulina regular (20 mU) (humana recombinante, Biobrás, Minas Gerais, Brasil) diluída em 5 µL de veículo. Todos os ratos receberam ambas as infusões, sendo controles de si mesmo. Após as infusões,

quantidade conhecida de ração foi introduzida na gaiola e a ingestão medida após 12 e 24 horas.

Western blotting

A quantificação do receptor (IR) e do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e das formas fosforiladas do IR e Akt foi realizada em extrato total de hipotálamo. Para a ativação da cascata de sinalização da insulina, os ratos receberam através de uma cânula guia intracerebroventricular dose de insulina (20 mU). Após 13 minutos da infusão, os ratos foram decapitados e o hipotálamo retirado e homogeneizado em 1 mL de tampão de extração de proteína contendo inibidores de proteases e adicionado de 100 µL de Triton X-100 10%, mantido em gelo por 30 minutos e centrifugado a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O teor proteico dos extratos foi determinado com kit BCA (Bioagency, São Paulo, Brasil) e alíquotas de 50 µg de proteína foram adicionadas de tampão Laemmeli, aquecidas em banho-maria a 100°C por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida a 10%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (RPN303E; GE Healthcare, São Paulo, Brasil) a 100 V por 90 minutos e bloqueadas *overnight* a 4°C. As membranas foram incubadas por 2 h com anticorpo primário anti-IR (1:1000; #3025; Cell Siganalling, Boston, Estados Unidos), ou anti-IRS1 (1:1000; #2382; Cell signaling, Boston, Estado Unidos), IR-tyr 1162/1163 (1:1000; sc-25103; Santa Cruz Biotechnology**,** Dallas, Estados Unidos) e Akt-ser 473 (1:1000; #9271; Cell Signalling, Boston, Estados Unidos) e durante 1 h com anticorpo secundário (anti-rabbit; A0545, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). As proteínas identificadas comparativamente ao padrão de peso molecular compatível (1610324-Bio-rad, São Paulo, Brasil) foram impressas em filme de raio-X (28-9068-37; GE Healthcare, São Paulo, Brasil) por reação de quimiluminescência com reagente ECL (RPN2232; GE Healthcare, São Paulo, Brasil) e as bandas quantificadas por densitometria no software Image "J" (NIH Image, Bethesda, Maryland, EUA).

Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando-se o Software SPSS 20.0 e aplicado o teste *t'Student,* considerando o nível de significância $p<0,05$.

Resultados

Avaliação da ingestão, massa corporal e glicemia

Os grupos iniciaram o tratamento com massas corporais equivalentes e, após oito semanas, não foi verificada diferença significativa, tanto semanal (Figura 1, painel A), quanto no ganho de massa final (Figura 1, painel B) entre os grupos. O grupo F consumiu significativamente menor quantidade de ração durante as oito semanas (Figura 2, painel). Quanto ao consumo hídrico, apesar da tendência ao maior consumo do grupo F comparado ao C, essa diferença somente se mostra significativa nas duas últimas semanas (Figura 2, painel B), em contrapartida, o consumo energético total apresentou-se elevado na maior parte do período avaliado, exceto nas semanas 2 e 4 (Figura 2, painel C), demonstrando que, de fato, houve tendência ao maior consumo de frutose e que este pode estar contribuindo para o valor energético total (VET) ingerido.

Nas duas últimas semanas do tratamento, constatamos aumento de cerca de 65% (semana 7) e 52% (semana 8) no consumo de solução de frutose, em relação ao controle hídrico, imprimindo incremento de mais de 30% no VET. Não foi observada diferença significativa na glicemia entre os grupos, embora o grupo F tenha apresentado valores séricos 8% maiores quando comparado ao grupo C (C=96,24mg/dL±3,71; F=104,72mg/dL±5,53).

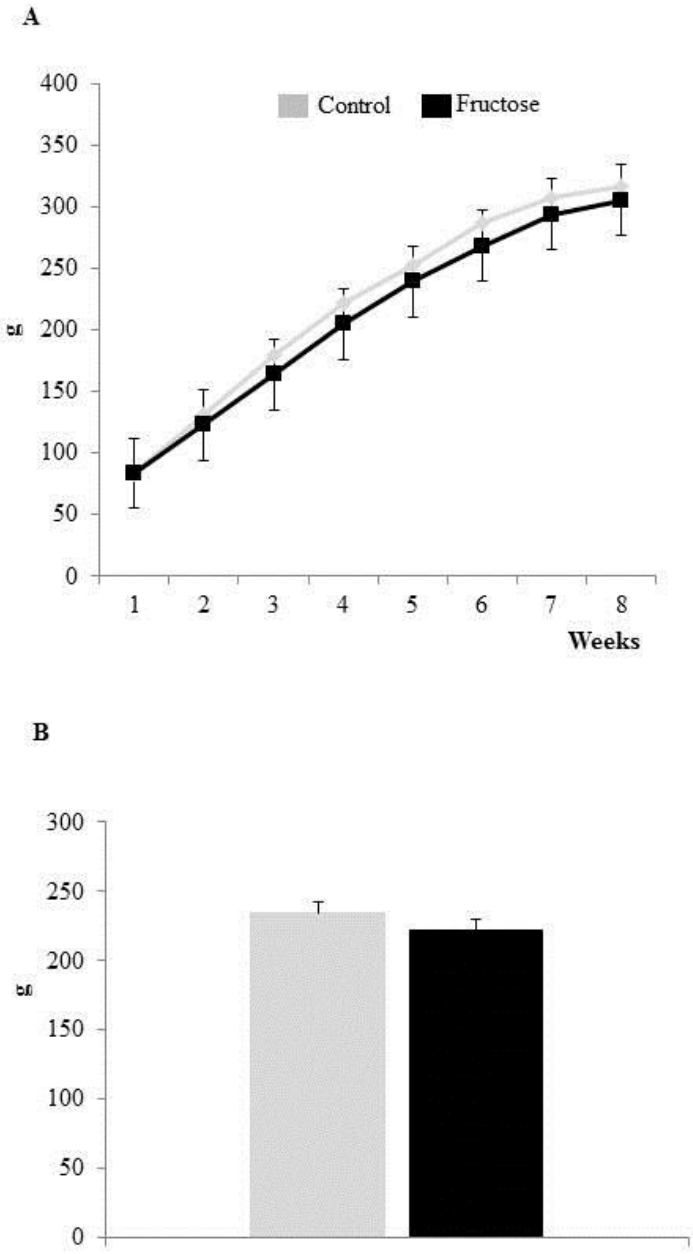


Figure 1. Weekly body mass Gain (A) and cumulative (B) of control groups and fructose.

(n) = 12.

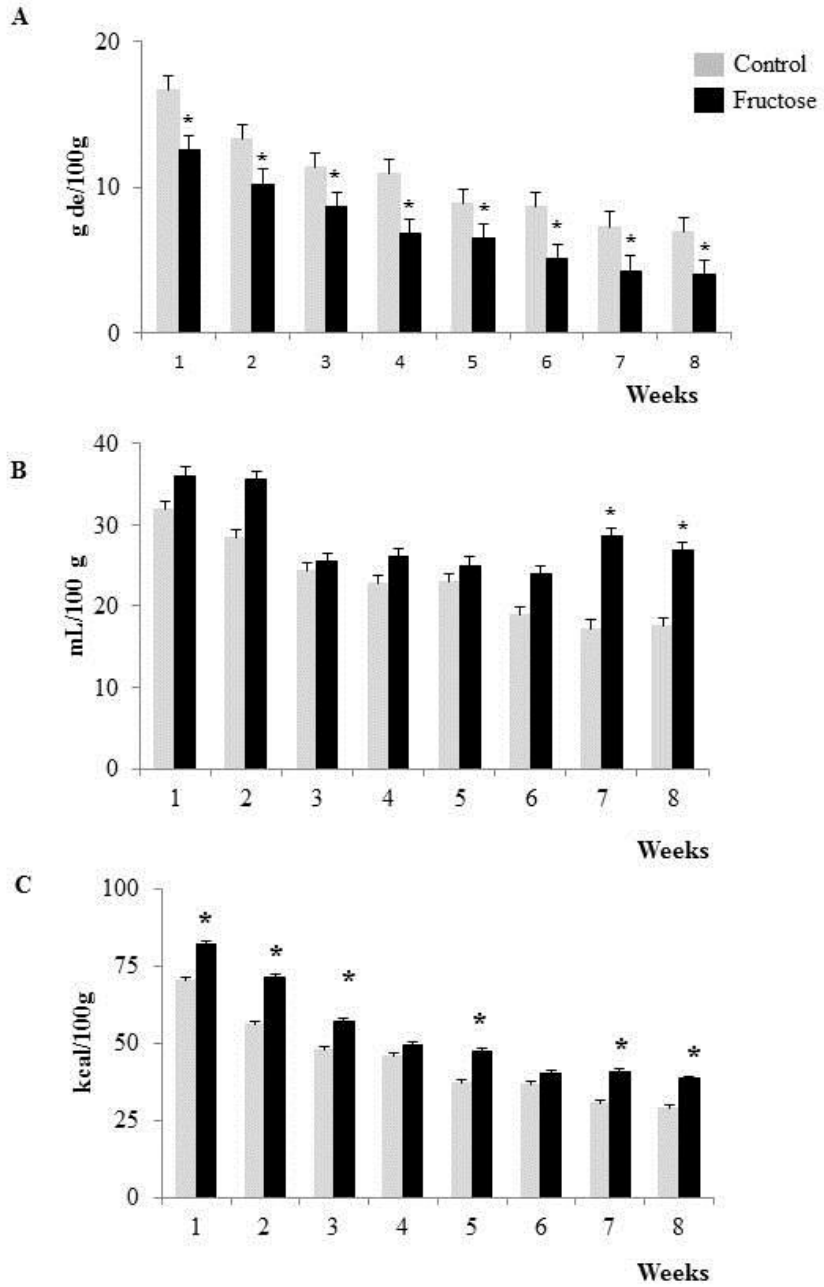


Figure 2. Food (A), water (B) and energetic[1] (C) intake of the control and fructose groups.

* p<0,05. vs. Control. n = 12. [1] Corresponds to the energy of chow and fructose.

Resposta alimentar à infusão intracerebroventricular de insulina

Ao avaliar o efeito da frutose sobre a ação anorexígena central da insulina, verificamos que após a infusão icv do hormônio, o grupo controle manteve, ao final de 24 h, sua efetiva ação anorexígena (Figura 3, painel A), enquanto no grupo frutose, o consumo de 24 h não foi reduzido (Figura 3, painel B), demonstrando comprometimento da resposta hipotalâmica ao hormônio.

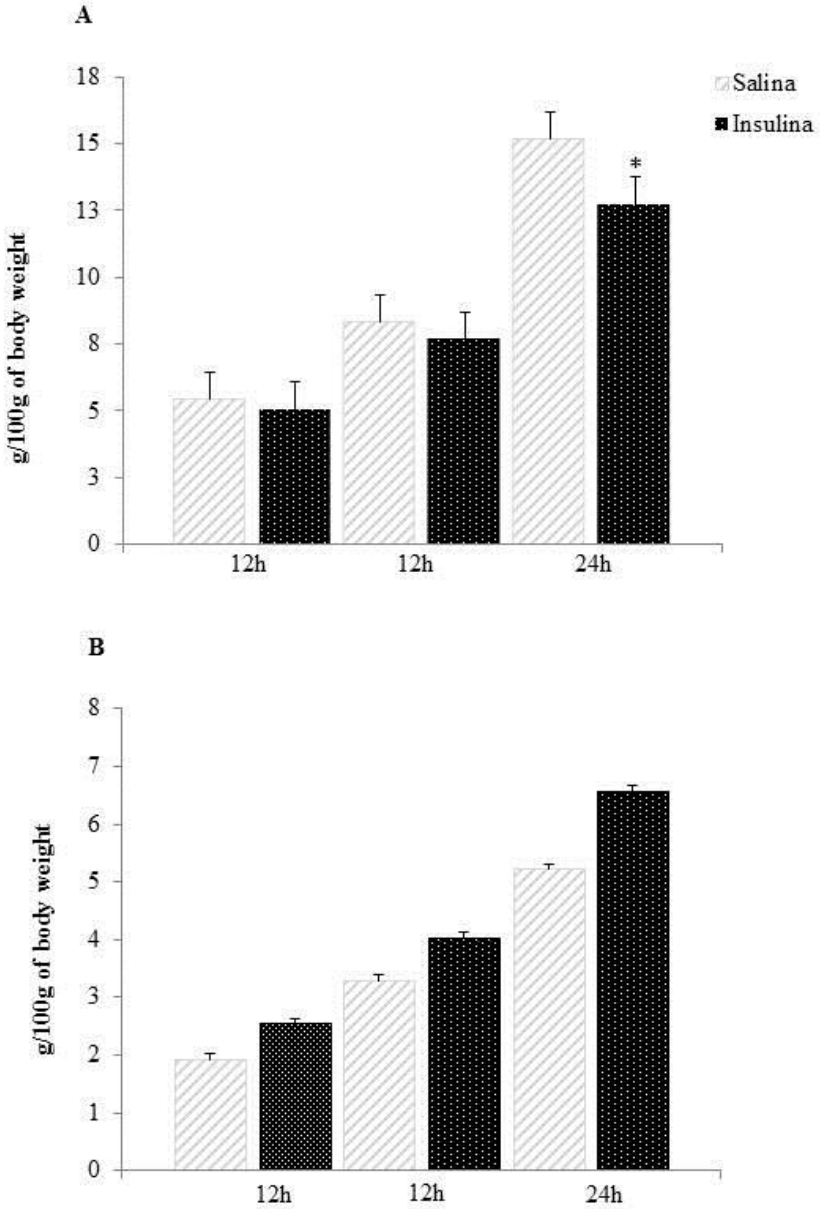


Figure 3. Food intake of control (A) and fructose (B) groups after intracerebroventricular infusion of saline and insulin.

*p<0,05. vs. Saline. n= 17-21 .

Avaliação do teor hipotalâmico de proteínas da via insulínica

Ao avaliar o teor de proteínas e a atividade da via insulínica no hipotálamo, foram observados, no grupo frutose, teores aumentados do IR, IRS-1 e da forma fosforilada da proteína Akt (4%, 37% e 18%, respectivamente) em relação ao controle. Não observamos alteração no teor da forma fosforilada do receptor de insulina (p-IR; 7%) (Figura 4).

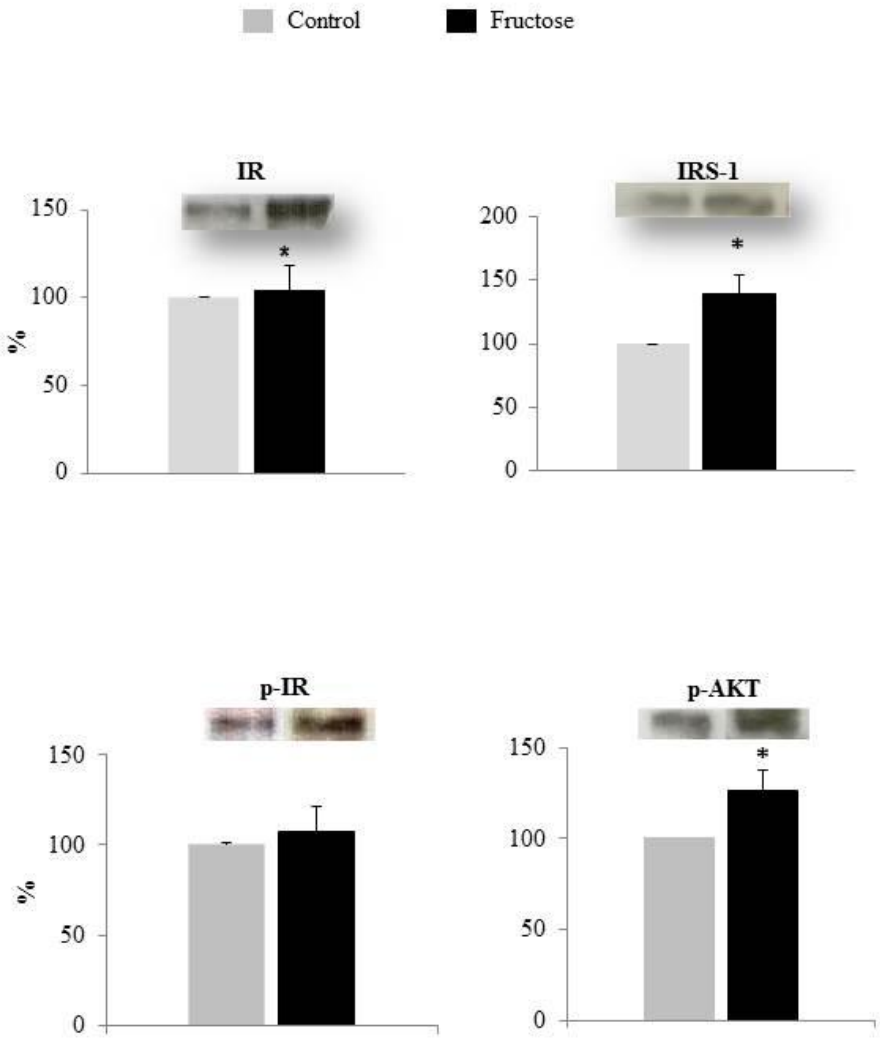


Figure 4. Hypothalamic content of insulin receptor (IR), of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and of phosphorylated forms of insulin receptor (p-IR) and the protein Akt (p-Akt) of control groups and fructose.

*p<0,05. vs. control. n = 8-11.

Discussão

No presente estudo foi estabelecida a hipótese de que o consumo prolongado de solução de frutose a 20% por ratos *Wistar* seria capaz de inibir a ação anorexígena hipotalâmica da insulina e, dessa forma, associar o monossacarídeo ao desenvolvimento da obesidade, por alterar mecanismo de regulação central da ingestão alimentar.

A frutose parece interferir nos processos de controle da homeostase energética, porém não diretamente no consumo alimentar e na massa corporal. De qualquer modo, a alteração destes parâmetros é ainda controversa e neste estudo não foi verificada diferença entre os grupos. Nossos resultados sinalizam ineficiência no metabolismo da frutose em contribuir com energia efetiva [2] e resultar em ganho de massa corporal, muito embora seja estimado que, como carboidrato, a frutose possa contribuir com 4 kcal/g.

Este resultado corrobora com o estudo de Dai e Mcneil [21] que não encontraram aumento progressivo na massa corporal entre os grupos C e F, mesmo num tratamento de 14 semanas. Entretanto, estudos utilizando solução de frutose a 10 e 20% encontraram associação positiva entre a ingestão deste monossacarídeo por longos períodos e ganho de massa corporal em hamster [22,23].

Embora não tenha sido verificado neste estudo alteração na massa corporal, se reconhece que a frutose promove rompimento no complexo mecanismo de regulação do peso corporal e balanço de energia, podendo ser por aumento na ingestão ou por diminuição do gasto energético [24]. O consumo alimentar do grupo F apresentou-se de forma peculiar, de modo que a ingestão de ração foi significativamente menor durante todo o tratamento, entretanto, o VET foi maior durante o mesmo período.

Do ponto de vista da concentração de energia molecular, a frutose se equivale à glicose, mas não é um carboidrato utilizado diretamente por células extra-hepáticas para esta finalidade, visto que esses outros tecidos não expressam enzimas chaves para os passos catabólicos iniciais da produção de energia a partir da frutose [25]. Assim, a baixa eficiência energética da frutose pode ser a razão do tratamento não ter contribuído para ganho de massa corporal. Neste sentido, concordamos com Sievenpiper *et al* [26] que concluíram que doses elevadas de frutose disponibilizam excesso de calorias que constitui o efetivo fator determinante da promoção, ou não, de aumento da massa corporal.

A ingestão alimentar é modulada por estruturas límbico-corticais do cérebro que estabelecem mecanismos de *feedback* com o hipotálamo, os quais estão relacionados ao valor hedônico do alimento [27]. Neste contexto, é possível considerar que o consumo de frutose, em função da palatabilidade, pode levar a alterações nos mecanismos de fome e saciedade e dos sinais de recompensa [28] de maneira direta, e motivar a ingestão de energia, independente da necessidade calórica. Além disso, o consumo de frutose leva à resistência à leptina e insulina, que são hormônios implicados na modulação da resposta hedônica à ingestão alimentar e de outros estímulos de prazer [27].

Vários estudos têm investigado o efeito da frutose em misturas como xarope de milho ou sacarose. Em nosso estudo utilizamos frutose pura, em solução aquosa a 20%, como única fonte de líquido oferecida aos ratos tratados com frutose, enquanto o grupo controle consumiu apenas água, e não uma solução contendo outro produto edulcorante. Há diferentes formas de oferta de frutose e de períodos de tratamento aplicado nos estudos e, por isso, existe dificuldade de comparação entre resultados.

Tem sido sugerido que a frutose pura pode ter um aproveitamento absortivo e metabólico diferente das misturas contendo, além da frutose, glicose e polímeros deste, como no caso do xarope de milho, levando a pensar que a oferta de frutose pura poderia ser promotora de ganho de massa corporal por um mecanismo que facilita sua biodisponibilidade. Porém, se por um lado Bocarsly *et al.* [29] atribuíram efeito obesogênico ao xarope de milho, por outro, Ackroff e Sclafani [30] não consideram a palatabilidade deste açúcar ou da sacarose fator promotor de ganho de peso.

A frutose em solução estimulou a ingestão de líquidos, já que o grupo controle consumiu menos água, e este comportamento contribuiu para aumento do consumo calórico, mesmo com menor ingestão de ração. Esses resultados são sugestivos de que a frutose pura parece agir nos mecanismos de recompensa. Por outro lado, já foi demonstrado que a frutose aumenta os teores séricos de grelina [28], hormônio orexígeno que pode ter contribuído para maior ingestão da solução de frutose, confirmado pela maior ingestão de líquido do grupo controle. Esta análise parece ser de consenso com outros estudos que identificam o poder edulcorante da frutose como um estímulo ao consumo em humanos [1] e ratos [30].

Os resultados obtidos com a frutose purificada, e não na forma de xarope de milho, não corroboram com Ackroff *et al.* [31] que atribuíram a palatabilidade da solução aos polissacarídios presentes no xarope de milho, e não especificamente à

frutose deste composto, que contém 55% de frutose, 42% de glicose e 3% de polissacarídios [32]. De qualquer modo, a palatabilidade do xarope de milho e da sacarose provavelmente não justifica diferença no ganho de massa corporal em resposta a estes edulcorantes [30], mas outros pesquisadores estabelecem claramente que soluções concentradas de açúcares, quando oferecidas em livre acesso, como neste estudo, contribuem para a obesidade em ratos [32,33].

O depósito de frutose na forma de gordura é bastante ineficiente comparado com os lipídios, que o faz a um custo energético muito baixo, contudo, o aumento do consumo pode acentuar a deposição de gordura. Além disso, a suscetibilidade do açúcar em induzir obesidade, varia com a concentração e o tipo de açúcar [34].

De todas as formas, os estudos apontam que a ingestão de frutose, em ratos, promove acúmulo maior de gordura corporal comparado com água e outros tipos de bebida adoçada [22], além de aumentar o tamanho dos adipócitos [36]. No nosso laboratório, Batista *et al*. [35] não verificaram diferença na massa corporal entre os grupos submetidos ao mesmo protocolo experimental do presente, entretanto, a massa adiposa total dos depósitos viscerais foi significativamente maior no grupo frutose, demonstrando que o monossacarídeo puro pode contribuir para a obesidade.

É descrito o envolvimento dos endocanabinóides na regulação do consumo de alimentos palatáveis, particularmente açúcares, em modelo de ingestão de frutose semelhante ao empregado nesta investigação. Após consumo, por uma semana, de solução contendo 23% de frutose pura não foi verificado ganho de massa corporal, porém, diferentemente de dados do nosso laboratório, não foi observado aumento da adiposidade. É possível que essa diferença se justifique pelo tempo de tratamento. Interessantemente, o estudo também mostrou que diferentes açúcares, oferecidos na forma líquida, afetam enzimas envolvidas na degradação e síntese de endocanabinóides no hipotálamo, e que este efeito prediz obesidade [37].

A glicose sérica foi avaliada como uma medida de controle, mas não foi observada diferença entre os grupos e, embora a insulina circulante não tenha sido determinada, há a possibilidade de ocorrer aumento compensatório para manter a euglicemia, muito embora não seja bem estabelecido se a ingestão elevada de frutose de fato leva à resistência. A resposta glicêmica frente à frutose tem sugerido resistência insulínica [18], mas o que se observa são dados ainda contraditórios.

Estudo com humanos, corroborando com nossos dados em ratos, demonstrou que a ingestão de frutose comparada à glicose, não promoveu aumento sistêmico dos

teores de glicose [38], embora investigação anterior em ratos e humanos tenha sinalizado que o consumo elevado de frutose provoca alterações metabólicas periféricas que conjugam para a resistência à insulina [39]. Entretanto, parece que a frutose não estimula a secreção pancreática do hormônio pelas células beta e, em quantidades baixas ou moderadas, exerce efeito hepático benéfico, como ativação da glicoquinase, aumento da captação de glicose e da glicose-6-fosfato e da ativação da glicogênio sintase, resultando em aumentada síntese e deposição deste substrato [40]. Tomados juntos estes efeitos conjugam para melhorar o controle glicêmico.

A frutose promove mudanças bioquímicas e alteração na plasticidade sináptica mediadas pela insulina, sendo sugerido que o Sistema Nervoso Central (SNC) pode estar susceptível à resistência à insulina induzida pela dieta [41]. De fato, tanto em ratos, quanto em hamster, foi demonstrado prejuízo neuronal na região do hipocampo que pode estar relacionado à resistência sistêmica à insulina promovida pelo consumo elevado de frutose [41,42]. Contudo, Tappy [2] não considera que modestas mudanças na glicemia e insulinemia, observadas após ingestão de dieta rica em frutose por várias semanas, tornem a frutose *per se* responsável pelas alterações na homeostase da glicose, mas também não descarta a hipótese de que longas exposições à frutose poderiam sim, estar associadas com resistência à insulina, secundária ao aumento da gordura corporal.

O hipotálamo, juntamente com outras regiões do cérebro, está envolvido na regulação da ingestão alimentar e, nesta região, são integrados sinais periféricos e neurais que controlam a homeostase energética. Pesquisadores demonstraram que o controle deste neurocircuito diminui com exposição aguda à dieta rica em frutose [43] e, apesar do conhecimento acerca do papel da insulina nos mecanismos de regulação da ingestão alimentar, ainda não está claro o efeito da frutose sobre a insulina hipotalâmica.

Assim, buscando entender a relação da frutose como agente facilitador da obesidade, demonstrou-se neste estudo que a frutose interfere na ação hipotalâmica da insulina, inibindo seu efeito anorexígeno em resposta à infusão intracerebroventricular do hormônio. Sabe-se que a administração de insulina diretamente no hipotálamo reduz o consumo alimentar e, em contraste, a inibição da sinalização deste hormônio no cérebro tem efeito orexígeno [44], correspondendo ao que foi observado no presente estudo.

Este resultado pode significar resistência central à insulina, contudo, também é possível que mecanismos paralelos, como a via da leptina, associada ao fator de

transcrição FOXO 1, possam estar alterados pela ação da frutose e dificultar a ação da insulina por perda do efeito integrado de efetores anorexígenos, somado à menor sensibilidade central à insulina.

De todo modo, investigamos algumas proteínas da via de sinalização da insulina a fim de identificar possíveis alterações que expliquem a inibição da ação anorexígena observada. Verificamos que o teor hipotalâmico tanto do receptor (IR) quanto do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) aumentaram, assim como da forma fosforilada da proteína Akt (p-Akt).

Estudo no córtex cerebral e hipocampo de hamster, alimentados com 60% de frutose por seis semanas, resultou em redução significativa dos teores de fosforilação do IR, do IRS-1 e dos resíduos serina-treonina da proteína Akt, em resposta à insulina [41]. Apesar dos resultados demonstrarem o potencial das dietas ricas em frutose, de comprometer significantemente a via de sinalização da insulina nestas regiões do cérebro, é importante enfatizar que a frutose parece afetar de forma distinta as regiões do cérebro envolvidas no comportamento alimentar [45]. Assim, é possível que hipotálamo tratado com frutose seja menos sensível à insulina, justificando o comportamento diferenciado. Além disso, comparativamente a outros, o presente estudo diferiu no tempo de tratamento e na concentração da solução de frutose oferecida, e parece que estes fatores são determinantes para as respostas observadas.

Nossos resultados permitem confirmar que a oferta de frutose pura a 20% exerceu efeito na sensibilidade hipotalâmica à insulina e este evento parece conduzir a via de sinalização do hormônio, pelo menos temporariamente, para um estado compensatório, demonstrado pelo aumento no teor das proteínas avaliadas, representando tentativa de manutenção da sua atividade. Notadamente, o aumento dos teores de IR não foi acompanhado pelo aumento de sua fosforilação, podendo ser atribuído, em parte, à este aspecto da resposta observada, a perda da efetividade da resposta anorexígena à insulina hipotalâmica, demonstrada nos resultados com a infusão icv do hormônio.

Adicionalmente, a não avaliação da fosforilação em resíduo de treonina da proteína Akt nos permite inferir que é possível que a proteína não tenha sido de fato ativada conjugando para a limitação da ação anorexígena central da insulina. Por outro lado, a reduzida secreção de insulina é considerada um benefício do consumo de frutose

em relação à glicose [46], mas pode ter estimulado aumento na síntese de proteínas da via de maneira a minimizar os prejuízos à homeostase energética do SNC.

Bezerra *et al*.[47], trabalhando com ratos *Wistar* durante 4 semanas com ração contendo 60% de frutose, não encontraram diferenças nos teores de IR e IRS-1 no fígado e músculo desses animais, entretanto, identificaram redução da fosforilação do IR no fígado e, redução mais marcante, da fosforilação do IRS-1, no fígado e músculo. Corroborando com esses achados, Mahfouz *et al*. [48], utilizando ração enriquecida também com 60% de frutose, encontraram teores hepáticos e cardíacos de IRS-1 reduzidos. Todavia, ratos alimentados com ração comercial e solução de frutose a 10% apresentaram aumento da expressão de IRS-1 após 3 semanas de tratamento [36]. Tomados juntos, estes resultados permitem supor que a concentração de frutose representa fator determinante da ação deste carboidrato sobre as proteínas da via de sinalização da insulina em diferentes tecidos.

Concentrações circulantes elevadas de insulina, mantidas por longos períodos, podem levar à resistência à insulina [49]. Neste sentido, por acreditarmos que neste estudo tenha ocorrido hiperinsulinemia, como forma de manter a euglicemia nos ratos, é pertinente ponderarmos que a resistência pode ter provocado prejuízo ao hipotálamo e, assim, ter limitado a resposta à insulina, com redução da atividade das proteínas da sua via de sinalização. Possivelmente, o aumento destas proteínas traduz a tentativa de equacionar o prejuízo na sinalização, mas a resposta pode ter ficado limitada pela menor sensibilidade à insulina. Contudo, estudo *in vitro* mostrou elevada fosforilação da Akt em células beta tratadas com 10% de frutose [50], embora não tenha sido revelado o resíduo fosforilado, o que faz diferença na ativação da via de sinalização da insulina.

A proteína PTB 1 constitui fosfatase envolvida na desativação do p-IR e p-IRS-1. Hamsters tratados com dieta enriquecida com frutose apresentaram concentrações elevadas dessa proteína no córtex e hipocampo [41]. Embora no presente estudo, p-IRS-1, tampouco PTB 1, tenham sido avaliadas, é possível supor ocorrência de resistência neural à insulina em razão de defosforilação destas importantes proteínas da cascata de sinalização do hormônio.

Assim como a insulina, a leptina age no SNC inibindo a resposta orexígena, resultando na redução da ingestão alimentar e controle da homeostase energética e tem sido descrito que a frutose promove resistência à leptina. Foi observado em ratos, alimentados durante seis meses com dieta rica em frutose, redução da fosforilação do fator de transcrição STAT3 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3) [51].

Considerando o papel desse fator na ativação da POMC e que, por sua vez, a produção de α-MSH pelos neurônios POMC é necessária para a ação anorexígena da insulina, é possível que a via da leptina esteja afetando a ação da insulina.

Além disso, atividade serina quinase de JNK (c-Jun N-terminal kinase) também pode agir sobre os substratos do receptor de insulina IRS-1 e IRS-2 [52]. Esses substratos, uma vez fosforilados em serina pela JNK, impedem a fosforilação em resíduo de tirosina pelo receptor de insulina, o que contribui para resistência à transdução do sinal da insulina através desta via.

Dentro de uma perspectiva de reflexão e de novas investigações especulamos, com base em evidências científicas recentes, a existência de associação do fator de transcrição FOXO 1 com a alteração da resposta anorexígena à insulina promovida pela ingestão de frutose.

FOXO 1 representa efetor *downstream* da sinalização da insulina, expresso em neurônios AgRP e POMC [53]. A supressão da atividade do FOXO 1 hipotalâmico é necessária para a resposta anorexígena da insulina, estabelecendo nova via pela qual a insulina age nos neurônios desta região cerebral e controla a ingestão alimentar [54].

Foi demostrado que diminuição na expressão do fator de transcrição FOXO 1, nos núcleos das células hipotalâmicas, reduz a ingestão energética e, em roedores, a expressão aumentada de FOXO 1 no hipotálamo induz hiperfagia [55].

Assim, considerando que este fator é fosforilado pela Akt e a que via PI3K/Akt/FOXO 1 media os efeitos da insulina [54], é possível supor que menor atividade da via pode limitar as ações do fator de transcrição. Sugerimos que a ingestão de frutose, de fato, determina prejuízos na via de sinalização insulínica, podendo ter levado à estimulo da expressão de FOXO 1, tendo como consequência a ativação de genes AgRP/NPY e supressão de POMC, com decorrente promoção de resposta orexígena. Contudo, são necessários estudos relacionando frutose e FOXO1 para elucidar os mecanismos de ação deste carboidrato sobre o fator de transcrição.

Concluímos que há necessidade de mais estudos que comprovem o potencial da frutose pura como fator isolado capaz de interferir na massa corporal, visto que os resultados a esse respeito ainda são. Contudo, demonstramos que a frutose em solução a 20% compromete a sinalização da insulina, tendo em vista que inibe a resposta anorexígena hipotalâmica à infusão intracerebroventricular aguda do hormônio e desencadeia ajustes no teor de várias proteínas da via. Sendo este o primeiro trabalho a apresentar esta análise, mais estudos são necessários a fim de caracterizar os

mecanismos envolvidos na inefetividade hipotalâmica da insulina em resposta à ingestão de frutose.

Referências

1. Ackroff K, Manza L, Sclafani A. The rat's preference for sucrose, polycose e their mixture. Appetite 1993; 21:69-80.
2. Ackroff K, Sclafani A. Rats' preferences for high fructose corn syrup vs. sucrose and sugar mixtures. Physiol Behav 2011; 102:548-552.
3. Agrawal R, Pinilla FG. Metabolic syndrome in the brain: deficiency in omega-3 fatty acid exacerbates dysfunctions in insulin receptor signalling and cognition. J Physiol 2012; 590:2485-2499.
4. Barros CMMR, Lessa RQ, Grechi MP *et al.* Substition of driking water by fructose solution induces hyperinsulinemia and hyperglycemia in hamsters. Clinics 2007; 62(3):327-334.
5. Basciano H, Frederico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. Nutr Metab 2005; 2:1-14.
6. Batista LO, Telles MM, Ramos VW *et al.* Effect of Fructose consumption on galanin orexins systems and regulation of food intake. Br J Nutr.[*in press]*, 2014.
7. Bezerra RMN, Ueno M, Silva MS *et al.* A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats. J Nutr 2000; 130:1531-1535.
8. Bocarsly ME, Powell ES, Avena NM *et al.* High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: increased body weight, body fat and triglyceride levels. Pharmacol Biochem Behav 2010; 97:101-106.
9. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. Am J Clin Nutr 2004; 79:537-543.
10. Brown CM, Dulloo AG, Yepuri G *et al.* Fructose ingestion acutely elevates blood pressure in healthy young humans. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2008; 294: R730-R737.
11. Burmeister MA, Ayala J, Drucker DJ *et al.* Central glucagon-like peptide 1 receptor-induced anorexia requires glucose metabolism-mediated suppression of AMPK and is impaired by central fructose. Am J Physiol Endocrinol Metab 2013; 304: E677-E685.

12. Carvalheira JBC, Siloto RMP, Ignacchitti I *et al.* Insulin modulates leptina-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. FEBS Lett 2001; 500:119-124.
13. Cha SH, Wolfgang M, Tokutakes Y *et al.* Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl–CoA and food intake. PNAS 2008; 44:16871-16875.
14. Cholerton B, Baker LD, Craft S *et al*., 2013. Insulin, cognition, and dementia. Eur J Pharmacol 2013; 719:170-179.
15. Dai S, Msneill JH. Fructose induced hypertension in rats is concentration and duration dependent. J Pharmacol Toxicol Methods 1995; 33(2):101-107.
16. Dekker MK, Su Q, Baker C *et al.* Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis and the metabolic syndrome. Am J Physiol Endocrinol Metab 2010; 299:E685-E694.
17. Djordjevic A, Bursać B, Veličković N *et al.* The impact of different fructose loads on insulin sensitivity, inflammation, and PSA-NCAM-mediated plasticity in the hippocampus of fructose-fed male rats. Nutr Neurosci 2013. [Epub ahead of print].
18. Erejuwa OO, Sulaiman SA, Wahab MSA. Fructose might contribute to the hypoglycemic effect of honey. Molecules 2012; 17:1900-1915.
19. Erlanson-Albertsson C, Lindqvist A. Fructose affects enzymes involved in the synthesis and degradation of hypothalamic endocannabinoids. Regul Pept 2010; 161:87-91.
20. Estima CCP, Philippi ST, Araki EL *et al.* Consumo de bebidas e refrigerantes de uma escolar pública. Rev Paul Pediatr 2011; 29(1):41-45.
21. Funari VA, Crandall JE, Tolan DR. Fructose metabolism in the cerebellum. Cerebellum 2007; 6:130-140.
22. Glendinning JI, Breinager L, Kyrillou E *et al.* Differential effects of sucrose and fructose on dietary obesity in four mouse strains. Physiol Behav 2010; 101:331-343.
23. Goran MI, Dumke K, Bouret SG *et al.* The obesogenic effect of high fructose exposure during early development. Nat Rev Endocrinol 2013; 9:494-500.
24. Gross DN, van den Heuvel APJ, Birnbaum MJ. The role of FoxO in the regulation of metabolism. Oncongene 2008; 27(16):2320-2336.
25. Hanover LM, White JS. Manufacturing, composition, and applications of fructose. Am J Clin Nutr 1993; 58: 724S-732S.
26. Jéquier E, Tappy L. Regulation of body weight in humans. Physiol Rev 1999; 79(2):451-480.

27. Jungens H, Castañeda TR, Schürmann A *et al*. Consuming Fructose-sweetened Beverages Increases Body Adiposity in Mice. Obes Res 2005; 13(7):1146-1156.
28. Kim M-S, Park YK, Jang P-G *et al.* Role of hypothalamic FoxO 1 in the regulation of food intake and energy homeostasis. Nat Neurosci 2006; 9:901-906.
29. Lee HL, Giraud J, Davis R *et al.* c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Mediates Feedback Inhibition of the Insulin Signaling Cascade. J Biol Chem 2003; 278(5):2896-2902.
30. Li J-M, Wang W, Fan C-Y *et al.* Quercetin preserves β-cell mass and function in fructose-induced hyperinsulinemia through modulating pancreatic Akt/FoxO1 activation. Evid Based Complement Alternat Med. [Epub 2013].
31. Light HR, Tsanzi E, Gigliotti J *et al.* The type of caloric sweetener added to water influences weight gai, fat mass, and reproduction in growing Sprague-Dawley female rats. Exp Biol Med 2009; 234:651-661.
32. Lindqvist A, Baelemans A, Earlanson-Albertsson C. Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. Regul Peptides 2008; 150:26-32.
33. Lustig R. Fructose: metabolic, hedonic and societal parallels with ethanol. J Am Diet Assoc 2010; 110:1307-1321.
34. Mahfouz MH, Ghanem HM, Mohamed MA. Modulation of Insulin Receptor Substrate-1 and Some Inflammatory Variables in Hyperinsulinemic Rats Treated with Cinnamon Extract. Am J Biochem Biotechnol 2010; 6: 11-18.
35. Mayes PA. Intermediary metabolism of fructose. Am J Clin Nutr 1993; 58:754S-765S.
36. Mielke JG, Taghibiglou C, Liu L *et al.* A biochemical and functional characterization of diet-induced brain insulin resistance. J Neurochem 2005; 93:1568-1578.
37. Miller CC, Martin RJ, Whitney MLL *et al.* Intracerebroventricular injection of fructose stimulates feeding in rats. Nutr Neurosci 2002; 5:359-362.
38. Newcomer JW. Metabolic syndrome and mental illness. Am J Manag Care 2007; 13:S170-S177.
39. Page KA, Chan O, Arora J *et al.* Effects of fructose vs glucose on regional cerebral blood flow in brain regions involved with appetite and reward pathways. JAMA 2013; 309:63-70.
40. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5 ed. Sydney: Elsevier Academic Press. 2005.
41. Plum L, Belgardt B, Brüning JC. Central insulin action in energy and glucose homeostasis. J Clin Invest 2006; 116(7):1761-1766.

42. Purnell JQ, Fair D. Fructose ingestion and cerebral, metabolic, and satiety responses. JAMA 2013; 309:1-2.
43. Rafati A, Anvari E, Noorafshan A. High fructose solution induces neuronal loss in the nucleus of the solitary tract of rats. Folia Neuropathol 2013; 51(3): 214-221.
44. Ross AP, Bartness TJ, Mielke JG *et al.* A high fructose diet impairs spatial memory in male rats. Neurobiol Learn Mem 2009; 92: 410-416.
45. Ross AP, Bartness TJ, Mielke JG *et al.* A high fructose diet impairs spatial memory in male rats. Neurobiol Learn Mem 2009; 92(3):410-416.
46. Samuel VT. Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance. Trends Endocrinol Metabol 2011; 22(2):60-65.
47. Sasaki T, Kitamura T. Roles of FoxO1 and Sirt1 in the central regulation of food intake. Endocrine J 2010; 57:939-946.
48. Sclafani A, Nissenbaum JW. Taste preference thresholds for polycose, maltose, and sucrose in rats. Neurosci Biobehav Rev 1987; 11:187-195.
49. Shu HJ, Isenberg K, Cormier RJ *et al.* Expression of fructose sensitive glucose transporter in the brains of fructose-fed rats. Neuroscience 2006; 140(3):889-895.
50. Sievenpiper JL, de Souza RJ, Mirrahimi A *et al.* Effect of fructose on body weight in controlled feeding trials: a systematic review and meta-analysis. Ann Intern Med 2012; 156:291-304.
51. Stanhope KL. Role of Fructose-Containing Sugars in the Epidemics of Obesity and Metabolic Syndrome. Annu Rev Med 2012; 63:329-343.
52. Tappy L. Q&A: 'toxic' effects of sugar: should we be afraid of fructose? BMC Biol 2012; 10:42-48.
53. Vogt MC, Brüning JC. CNS insulin signaling in the control of energy homeostasis and glucose metabolism – from embryo to old age. Trends Endocrinol Metab 2013; 24:76-83.
54. WHO. Health behaviour in school-aged children (Hbsc) study : international report from the 2009/2010 Survey. Geneva. 2012.
55. Zubiria MG, Fariña JP, Moreno G *et al.* Excess fructose intake-induced hypertrophic visceral adipose tissue results from unbalanced precursor cell adipogenic signals. FEBS 2013; 280: 5864-5874.

7. CONCLUSÕES

A ingestão prolongada de solução de frutose a 20% por ratos *Wistar*:

- Não promoveu diferença significativa no ganho de massa corporal, no consumo de ração e na glicemia;
- Estimulou o consumo hídrico (solução de frutose);
- Inibiu a resposta anorexígena da insulina, após infusão hipotalâmica do hormônio;
- Promoveu aumento nos teores das seguintes proteínas da via insulínica: receptor de insulina ($IR^{Tyr\ 1163\text{-}1164}$), substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) e da forma fosforilada da proteína Akt ($p\text{-}Akt^{Ser473}$).

Em conjunto, os resultados do presente estudo permitem concluir que a ingestão crônica de frutose em solução aquosa a 20% promoveu desordens na via da insulina, de forma a interromper a atividade anorexígena central do hormônio, sendo possível inferir que, se a frutose *per se* não contribui diretamente para o desenvolvimento da obesidade, por não alterar a massa corporal, o seu consumo prolongado, ao prejudicar a funcionalidade da via de sinalização da insulina no hipotálamo, pode associar-se a este desfecho, possivelmente em razão da resistência à ação central do hormônio e, provavelmente também, periférica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akhavan T, Anddeson GH. Effects of glucose-to-fructose ratios in solutions on subjective satiety, food intake, and satiety hormones in young men. Am J Clin Nutr. 2007; 86:1354-1363.
2. Albuquerque KT, Sardinha FLC, Telles MM *et al*. Intake of trans fatty acid–rich hydrogenated fat during pregnancy and lactation inhibits the hypophagic effect of central insulin in the adult offspring. Nutrition. 2006; 22:820-829.
3. Barclay T, Ginic-Markovic M, Cooper PD *et al*. The Chemistry and sources of fructose and their effect on its utility and health implications. J Excipients and Food Chem. 2012; 3(2):67-82.
4. Barreiros RC, Bossolan G, Trindade CEP. Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. Rev Nutr. 2005; 18(3):377-389.
5. Basciano H, Frederico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. Nutr Metab. 2005; 2(5):1-14.
6. Belgardt BF, Bruning JC. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. Ann N Y Acad Sci. 2010; 1212:97-113.
7. Bezerra RMN, Ueno M, Silva MS *et al*. A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats. J Nutr. 2000; 130:1531-1535.
8. Boguszewski CL, Paz-filho G, Velloso LA. Neuroendocrine body weight regulation: integration between fat tissue, gastrointestinal tract, and the brain. Pol J Endocrinol. 2010; 61(2):194-206.
9. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. Am J Clin Nutr. 2004; 79:537-543.
10. Bray GA. Energy and fructose from beverages sweetened with sugar or high-fructose corn syrup pose a health risk for some people. Adv Nutr. 2013; 4:220-225.
11. Burmeister MA, Ayala J, Drukker DJ *et al*. Central glucagon-like peptide 1 receptor-induced anorexia requires glucose metabolism-mediated suppression of AMPK and is impaired by central fructose. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2013; 304:E677-E685.

12. Bursac BN, Djordjevic AD, Vasiljevic AD *et al*. Fructose consumption enhances glucocorticoid action in rat visceral adipose tissue. J Nutr Biochem. 2013; 24:1166-1672.
13. Carvalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. Arq Bras Endocrinol Metab. 2002; 46(4):419-425.
14. Convit A. Links between cognitive impairment in I nsulin resistance: an explanatory model. Neurobiol Aging. 2005; 26:31S1-35S1.
15. Dekker MK, Su Q, Baker C *et al*. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis and the metabolic syndrome. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010; 299:E685-E694.
16. Djordjevic A, Bursać B, Veličković N *et al*. The impact of different fructose loads on insulin sensitivity, inflammation, and PSA-NCAM-mediated plasticity in the hippocampus of fructose-fed male rats. Nutr Neurosci. [Epub 2013].
17. Funari VA, Crandall JE, Tolan DR. Fructose metabolism in the cerebellum. Cerebellum. 2007; 6:130-140.
18. Funari VA, Herrera VLM, Freeman D *et al*. Genes required for fructose metabolism are expressed in Purkinje cells in the cerebellum. Mol Brain Res. 2005; 142:115-122.
19. Ghasemi R, Haeri A, Dargahi L *et al*. Insulin in the brain: sources, localization and functions. Mol Neurobiol. 2013; 47:145-171.
20. Hanover LM, White JS. Manufacturing, composition, and applications of fructose. Am J Clin Nutr. 1993; 58(5):724S-732S.
21. Havel PJ. Dietary fructose: implication for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. Nutr Rev. 2005; 63(5):133-157.
22. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de orçamento familiares 2008-2009. Disponível em <http://www.ibge.gov.br> Acesso: 10/05/2012.
23. Johnson RJ, Perez-Pozo SE, Sautin YY *et al*. Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? Endocr Rev. 2009; 30(1):96-116.
24. Kim B, Feldman EL. Insulin resistance in nervous system. Trends Endocrinol Metabol. 2012; 23(3):133-140.
25. Kim M-S, Park YK, Jang P-G *et al*. Role of hypothalamic FoxO 1 in the regulation of food intake and energy homeostasis. Nat Neurosci. 2006; 9:901-906.

26. Leloup C, Arluison M, Lepetiti N *et al*. Glucose transporter 2 (GLUT2): expression in specific brain nuclei. Brain Res. 1994; 638(2):221-226.
27. Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A *et al*. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2010; 7(5):251-264.
28. Lindqvist A, Baelemans A, Erlanson-Albertsson C. Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. Regul Peptides. 2008; 150:26-32.
29. López M, Tovar S, Vazquez MJ *et al*. Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. Proc Nutr Soc. 2010; 66:131-155.
30. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL *et al*. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193:265-275.
31. Ludwig DS. Examining the health effects of fructose. JAMA. 2103; 310:1-2.
32. Messier C. Impact of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes on cognitive aging. Neurobiol Aging. 2005; 26:26S1-30S1.
33. Mielke IG, Taghibiglou C, Liu L *et al*. A biochemical and functional characterization of diet induced brain insulin resistance. J Neurochem. 2005; 93:1568-1578.
34. Miller A, Adeli K. Dietary fructose and the metabolic syndrome. Curr Opin Gastroenterol. 2008; 24:204-209.
35. Miller CC, Martin RJ, Whitney MLL *et al*. Intracerebroventricular injection of fructose stimulates feeding in rats. Nutr Neurosci. 2002; 5:359-362.
36. Nagawa TN, Hu H, Zharikov S *et al*. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. Am J Physiol Renal Physiol. 2006; 290: F625-F631.
37. Nazarians-Armavil A, Menchella JA, Belsham DD. Cellular insulin resistance disrupts leptin-mediated control of neuronal signaling and transcription. Mol Endocrinol. 2013; 27:990-1003.
38. Page KA, Cha O, Arora J *et al*. Effects of fructose vs glucose on regional cerebral blood flow in brain regions involved with appetite and reward pathways. JAMA. 2013; 309(1):63-70
39. Pauli JR, Cintra DE, Souza CT *et al*. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. Arq Bras Endocrinol Metab. 2009; 53(4):300-408.
40. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5 ed. Sydney: Elsevier Academic Press. 2005.

41. Porte D, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin signaling in the central nervous system. Diabetes. 2005; 54:1264-1276.
42. Roglans N, Vilá L, Alegret M *et al*. Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPAR_ activity in fructose-fed rats. Hepatology. 2007; 45(3):778-788.
43. Ross AP, Bartness TJ, Mielke JG *et al*. A high fructose diet impairs spatial memory in male rats. Neurobiol Learn Mem**.** 2009; 92:410-416.
44. Samuel VT. Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance. Trends Endocrinol Metabol. 2011; 22(2):60-65.
45. Sardinha FLC, Telles MM, Albuquerque KT *et al*. Gender difference in the effect of intrauterine malnutrition on the central anorexigenic action of insulin in adult rats. Nutrition. 2006; 22:1152-1161.
46. Schwartz MW, Woods SC, Porte D *et al*. Central nervous system control of food intake. Nature. 2000; 404:661-671.
47. Shapiro A, Mu W, Roncal C *et al*. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008; 295: R1370-R1375.
48. Sheludiakova A, Rooney K, Boakes RA. Metabolic and behavioural effects of sucrose and fructose/glucose drinks in the rat. Eur J Nutr. 2012; 51:445-454.
49. Shu HJ, Isenberg K, Cormier RJ *et al*. Expression of fructose sensitive glucose transporter in the brains of fructose-fed rats. Neuroscience. 2006; 140:889-895.
50. Stanhope KL. Role of fructose-containing sugars in the epidemics of obesity and metabolic syndrome. Annu Rev Med. 2012; 63:329-343.
51. Stanley S, Wynne K, Mcgowan B *et al*. Hormonal regulation of food intake. Physiol Rev. 2005; 85:1131-1158.
52. Tappy L, Lê K-A. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. Physiol Rev. 2010; 90:23-46.
53. Teff KL, Elliot SS, Tchop M *et al*. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89(6):2963-2972.
54. Teff KL, Grudziak J, Townsend RR *et al*. Endocrine and metabolic effects of consuming fructose- and glucose-sweetened beverages with meals in obese men and women: influence of insulin resistance on plasma triglyceride responses. J Clin Endocrinol Metab. 2009; 94:1562-1569.

55. Varela L, Horvath TL. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. EMBO J. 2012; 13:1079-1086.
56. Volp ACP, Alfenas RC, Costa NM. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em predizer a síndrome metabólica. Arq Bras Endocrinol Metab. 2008; 52(3):537-549.
57. Vos MB, Kimmons JE, Welsh J *et al*. Dietary fructose consumption among US children and adults: the third national health and nutrition examination survey. Medscape J Med. 2008; 10(7):160-177.
58. White JS. Challenging the fructose hypothesis: new perspectives on fructose consumption and metabolism. Adv Nutr. 2013; 4:246-256.
59. Wiernsperger N, Geloen A, Rapin J-R. Fructose and cardiometabolic disorders: the controversy will, and must, continue. Clinics. 2010; 65:729-738.

9. ANEXO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 06 de Agosto de 2012

Prezada Professora Kelse Tibau de Albuquerque

A Comissão de Ética com Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro certifica que o projeto sob sua coordenação e intitulado: **"Efeito dos Diferentes Componentes da Dieta e Atividade Física sobre Sistemas que Regulam a Ingestão Alimentar"**, onde é previsto protocolo com utilização de animais, foi aprovado por esta comissão no dia **03/08/2012**, sob o número de referência **MACAE14**, este protocolo tem validade de 3 anos.

Atenciosamente:

Prof. Paulo de Assis Melo
Presidente da CEUA - CCS
Comissão de Ética com Uso
de Animais em Pesquisa do CCS

Prof. Paulo de Assis Melo
Presidente da Comissão de Ética com Animais - CCS

Decania do CCS: Av.Carlos Chagas Filho, 373 Prédio do Centro de Ciências da Saúde, Bloco K, 2º andar - Cidade Universitária - CEP 21941-590 – Rio de Janeiro – Brasil
Tel: (21) 2562.6705 - Fax: (21) 2270.1749 - www.ccsdecania.ufrj.br