

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

**LEANDRO OLIVEIRA BATISTA**



**AVALIAÇÃO HIPOTALÂMICA DE FATORES LIPOGÊNICOS E INFLAMATÓRIOS EM  
RATOS WISTAR APÓS A INGESTÃO PROLONGADA DE SOLUÇÃO DE FRUTOSE**

**Rio de Janeiro**

**2016**

**Leandro Oliveira Batista**



**AVALIAÇÃO HIPOTALÂMICA DE FATORES LIPOGÊNICOS E INFLAMATÓRIOS EM RATOS WISTAR APÓS A INGESTÃO PROLONGADA DE SOLUÇÃO DE FRUTOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro como um dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Nutricionais. Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kelse Tibau de Albuquerque.

**Rio de Janeiro**

**2016**

**Leandro Oliveira Batista**

**AVALIAÇÃO HIPOTALÂMICA DE FATORES LIPOGÊNICOS E INFLAMATÓRIOS EM RATOS WISTAR APÓS A INGESTÃO PROLONGADA DE SOLUÇÃO DE FRUTOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro como um dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Nutricionais. Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kelse Tibau de Albuquerque.

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kelse Tibau de Albuquerque  
Instituto de Nutrição/UFRJ (Presidente)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria das Graças Tavares do Carmo  
Instituto de Nutrição/UFRJ (Revisora)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eliane Fialho de Oliveira  
Instituto de Nutrição/UFRJ

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cintia Monteiro de Barros  
UFRJ-Campus Macaé

---

Prof<sup>a</sup> Dr José Roberto Silva  
UFRJ-Campus Macaé/Nupem

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marta Citelli dos Reis  
Instituto de Nutrição/UFRJ

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fátima Lúcia de Carvalho Sardinha  
Instituto de Nutrição/UFRJ

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Suzana Ortiz Costa  
Centro Universitário Augusto Motta

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Odanir e Valdevino, minhas irmãs, Eliane e Patrícia e à minha orientadora, conselheira e amiga Kelse Tibau. Sei que o apoio de todos vocês, cada um à sua maneira, foi determinante para a realização deste trabalho. Obrigado por cada momento durante esses anos.

## AGRADECIMENTOS

*Aos colegas do LabNex*, o trabalho em conjunto e parceria ao longo dos anos que nos fizeram fortes e permitiram que os trabalhos fossem realizados e sem esquecer as boas risadas e cafés compartilhados. Obrigado!

*Aos colegas do fundão*, que sempre ajudaram e me acolheram ao longo desses anos.

*Aos amigos*, que apoiaram minhas escolhas e torceram sempre para o meu sucesso.

*Ao Campus UFRJ-Macaé*, que desde minha chegada me acolheu e me forneceu espaço para o desenvolvimento deste trabalho.

*À FAPERJ*, pelo financiamento deste trabalho.

*À FUNEMAC* pelo apoio aos laboratórios provisórios.

*Àqueles* que permitiram a realização deste estudo:



*"Graças a ela enfrentei pela primeira vez meu ser natural [...] Descobri que minha obsessão por cada coisa em seu lugar, cada assunto em seu tempo, cada palavra em seu estilo, não era o prêmio merecido de uma mente em ordem, mas, pelo contrário, todo um sistema de simulação inventado por mim para ocultar a desordem da minha natureza. Descobri que não sou disciplinado por virtude, e sim como reação contra a minha negligência; que pareço generoso para encobrir minha mesquinhez, que me faço passar por prudente quando na verdade sou desconfiado e sempre penso o pior, que sou conciliador para não sucumbir às minhas cóleras reprimidas, que só sou pontual para que ninguém saiba como pouco me importa o tempo alheio. **Descobri, enfim, que o amor não é um estado da alma e sim um signo do zodíaco.**"*

- Memórias de minhas putas tristes  
**Gabriel García Márquez**

## RESUMO

Evidências mostram a relação direta do consumo elevado de frutose com alterações periféricas compatíveis com a síndrome metabólica e aumento de vias lipogênicas e pró-inflamatórias, entretanto são poucas as evidências desses efeitos em tecido hipotalâmico. Assim, foi avaliado se o consumo de frutose por 8 semanas afeta a expressão de enzimas fatores de transcrição das vias lipogênica e inflamatória no hipotálamo de ratos *Wistar*. Aos 30 dias os animais foram divididos em grupos: Controle (C) e Frutose (F) e mantidos com acesso livre à ração e água filtrada (C) ou solução aquosa de frutose à 20% (F). Foram avaliados a ingestão hídrica, de ração e a massa corporal. Aos 90 dias foi analisada a glicemia e triacilglicerolemia e o hipotálamo foi coletado para quantificação, por *Western Blotting*, das proteínas acetil-CoA carboxilase (ACC), ácido graxo sintase (AGS) e fator nuclear *kappa* B (NFkB) e, por qPCR a expressão dos gene-alvo: proteína ligadora do elemento regulado por esteróis -1c; -2 (SREBP-1c, SREBP-2), ACC, AGS e NFkB. Os resultados mostraram no grupo F menor consumo de ração, aumento na glicemia ( $146,20 \pm 6,09$  vs.  $102,32 \pm 4,58$ ;  $n=9$ ) e triacilglicerolemia (F:  $191,65 \pm 13,51$  vs. C:  $131,69 \pm 6,49$ ;  $n=9$ ) e não houve diferença no consumo hídrico e energético. Identificamos maior teor de ACC (F:  $133,93 \pm 5,58$  vs. C:  $100 \pm 0,0$ ;  $n=9-10$ ), NFkB (F:  $125,5 \pm 8,85$  vs. C:  $100 \pm 0,0$ ;  $n=14$ ) e SREBP-1c (F:  $4,08 \pm 0,44$  vs. C:  $1,13 \pm 0,15$ ;  $n=5-6$ ) no grupo F, enquanto AGS foi menor (F:  $85,90 \pm 4,81$  vs. C:  $100 \pm 0,0$ ;  $n=4-6$ ). Os genes para ACC, SREBP-2 e NFkB não foram diferentes entre os grupos. Concluímos que a frutose foi capaz de estimular passos iniciais da via lipogênica e inflamatória no hipotálamo de forma semelhante aos tecidos periféricos, além disso, tais alterações surgem antes de efetivas modificações na ingestão alimentar, sugerindo ação na regulação da ingestão alimentar.

Palavras Chaves: levulose – enzimas lipogênicas – inflamação - hipotálamo – SREBP – obesidade

## ABSTRACT

Evidence shows the direct relationship between high consumption of fructose with peripheral changes consistent with the metabolic syndrome and increased lipogenic and pro-inflammatory factors, however there is little evidence of these effects in hypothalamic tissue. We evaluated whether fructose intake for 8 weeks affects enzymes and transcription factors levels of the lipogenic and inflammatory pathways in the hypothalamus of Wistar rats. After 30 days old the animals were divided into groups: control (C) and fructose (F) and maintained with free access to food and filtered water (C) or aqueous solution of fructose at 20% (F). We evaluated weekly: water intake, feed and body mass. At 90<sup>th</sup> day, glycaemia and triacilglicerolemia were analyzed and hypothalamus was collected for quantification of proteins acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS) and *nuclear factor kappa-B* (NFkB) by Western Blotting, and qPCR expression of the target gene: *Sterol Regulatory Element Binding Protein* (SREBP-1c, SREBP-2), ACC, FAS and NFkB. The results shown lower feed intake in F group, increased blood glucose levels (F: 146.20±6.09 vs. C: 102.32±4.58; n= 9) and triacilglicerolemia (F:191,65±13,51 vs. C:131,69±6,49; n=9) and no difference in water and energy intake. We identify high ACC content (F: 133,93±5,58 vs. C: 100±0,0; n=9-10), NFkB (F: 125,5±8,85 vs. C: 100±0,0; n=14) and SREBP-1c (F: 4,08±0,44 vs. C: 1,13±0,15; n=5-6) in F group, while FAS was lower (F: 85,90±4,81 vs. C: 100±0,0; n=4-6). The genes for ACC, SREBP-2 and NFkB were not different between groups. We conclude that fructose was capable of stimulating the early steps of the hypothalamic lipogenic and inflammatory pathway similarly to peripheral tissues, in addition, such changes occur before actual changes in food intake, suggesting action in the regulation of food intake.

Key words: levulose - lipogenic enzymes - inflammation - hypothalamus - SREBP - obesity



## LISTA DE FIGURAS E QUADROS

<b>Figura 1.</b> Vias de sinalização hipotalâmica para glicose (A) e frutose (B) no controle da ingestão de alimentos. Adaptado de Lane e Cha, 2009.....	<b>6</b>
<b>Figura 2.</b> Massa corporal semanal, ingestão de ração, ingestão hídrica e ingestão dos grupos Controle e Frutose.....	<b>24</b>
<b>Figura 3.</b> Glicemia e triacilglicerolemia dos grupos Controle e Frutose.....	<b>25</b>
<b>Figura 4.</b> Teor hipotalâmico relativo (%) das proteínas acetil-CoA carboxilase, ácido graxo sintase e do fator de transcrição <i>kappa</i> B dos grupos Controle e Frutose.....	<b>26</b>
<b>Figura 5.</b> Expressão (RNAm) das proteínas ligadoras do elemento regulado por esteróis ( <i>SREBP- 1c</i> e <i>SREBP- 2</i> ), acetil-CoA carboxilase ( <i>ACC</i> ) e <i>factor nuclear kappa B</i> dos grupos Controle e frutose.....	<b>27</b>
<b>Quadro 1.</b> Tempo e temperatura para síntese de cDNA (kit <i>High-Capacity cDNA</i> ) .....	<b>14</b>
<b>Quadro 2.</b> Parâmetros para a amplificação do mRNA no <i>StepOne Plus</i> (reagente TaqMan com probes personalizados) .....	<b>14</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**ACC** - Acetil-CoA Carboxilase

**AgRP** – Peptídio relacionado ao Agouti

**AGS** - Ácido Graxo Sintase

**AMPK** - proteína quinase ativada por adenosina 5 -monofosfato

**cDNA** - Ácido Desoxirribonucleico complementar

**CEUA** - Comitê de Ética em Uso de Animais

**CPT-1** - Carnitina Palmitoil-Transferase 1

**DNA** – Ácido Desoxirribonucleico

**GLUT2** - Transportador de Glicose tipo 2

**GLUT5** - Transportador de Glicose tipo 5

**NFkB** - fator nuclear *kappa* B

**PFK1** - Fosfofrutoquinase 1

**POF** - Pesquisa de Orçamento Familiar

**POMC** – Proopiomelanocortina

**qPCR** - quantificação da reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa

**RNA** – Ácido Ribonucleico

**RNA<sub>m</sub>** - Ácido Ribonucleico mensageiro

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**SREBP** - proteína ligadora do elemento regulado por esteróis

**TLR4** - receptor do tipo *Toll* 4

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>2</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
3.1. Geral.....	9
3.2. Específicos.....	9
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
4.1. Condições e grupos experimentais.....	10
4.2. Avaliação da ingestão alimentar de 24 horas, ganho de massa corporal e estimativa do consumo de frutose.....	10
4.3. Avaliações bioquímicas.....	10
4.4. Avaliação do teor hipotalâmico de proteínas das vias lipogênica e inflamatória por Western Blotting.....	11
4.4.1. Extração de proteínas.....	11
4.4.2. Eletroforese.....	12
4.5. Avaliação da expressão gênica – qPCR (quantificação da reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa).....	13
4.5.1. Extração de RNA.....	13
4.5.2. Síntese de cDNA.....	14
4.5.3. Amplificação do RNAm.....	14
4.6. Análise dos resultados.....	15
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>16</b>
5.1. ARTIGO: Ingestão de frutose altera expressão gênica de SREBP-1c e ativa enzimas da via lipogênica em hipotálamo de ratos.....	16
5.1.1. Introdução.....	18

<b>5.1.2. Material e métodos.....</b>	<b>20</b>
<b>5.1.3. Resultados.....</b>	<b>23</b>
<b>5.1.4. Discussão.....</b>	<b>28</b>
<b>5.1.5. Referências bibliográficas.....</b>	<b>32</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>36</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>41</b>
<b>8.1. Anexo 1 – Comitê de ético em uso de animais.....</b>	<b>42</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Desde muito tempo, o ser humano busca entender os efeitos dos alimentos que ingerimos sobre os sistemas orgânicos e vias metabólicas que atuam na homeostase. Nos tempos atuais, muitas descobertas ainda são necessárias para determinar como diferentes nutrientes e não nutrientes atuam nos órgãos e sistemas.

É de amplo conhecimento que o consumo de açúcares pode favorecer o desequilíbrio de vias metabólicas importantes nos tecidos periféricos, porém, pouco se sabe como cada nutriente age no sistema nervoso central e as possíveis implicações atreladas à essa ação.

A via de síntese de lipídios está implicada na gênese da obesidade, por converter substratos energéticos em ácidos graxos, promover depósito destes no tecido adiposo, favorecendo doenças cardiovasculares e o diabetes. Além disso, os fatores transcricionais da via lipogênica parecem estar envolvidos nos passos iniciais de distúrbios metabólicos em órgãos periféricos e no sistema nervoso central.

Ademais, a inflamação está ligada diretamente à obesidade e complicações como a resistência à insulina e já foi demonstrada que a ingestão de determinados nutrientes pode favorecer a transcrição e síntese de fatores pró-inflamatórios, que podem levar à desregulação da homeostase em diferentes órgãos e promover o aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis.

Sendo assim, o presente estudo avalia a ingestão de frutose no que tange as alterações nos passos iniciais das vias lipogênica e inflamatória no hipotálamo de ratos após serem submetidos a 8 semanas de solução de frutose.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O perfil alimentar da população se modificou nas últimas décadas, especialmente em relação ao aumento do consumo de alimentos ultraprocessados em detrimento de produtos *in natura*. (Vari e cols., 2016). Concomitante às mudanças na ingestão alimentar, a prevalência da obesidade aumentou ao redor do mundo e estes dados se correlacionam, uma vez que o perfil alimentar contribui fortemente para alterações na composição corporal dos indivíduos (Apovian, 2016; Schmidt, 2015).

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo acentuado de tecido adiposo, o que aumenta o risco para diversas complicações secundárias, como resistência à insulina, hipertensão e outras doenças cardiovasculares (Ogden e cols., 2016). De origem multifatorial, o desenvolvimento da obesidade está diretamente relacionado à interação entre variáveis endógenas e exógenas, incluindo, o sedentarismo, o consumo de dietas ricas em gorduras e carboidratos (Swinburn e cols., 2011). Esta gênese pode ser resultado também do desequilíbrio entre os diversos fatores que integram o sistema de regulação da homeostase energética no organismo. A organização do controle da ingestão alimentar se estabelece a partir de três aspectos principais: a utilização de nutrientes como substratos metabólicos, o armazenamento energético e, quando necessário, a mobilização desses estoques (Pattaranit e Van Den Berg, 2008).

Atualmente, pode se considerar a obesidade como estado sub-crônico de inflamação, com alterações em diversos sistemas orgânicos, como mudanças na microcirculação no tecido adiposo branco, que leva à liberação em pequenas quantidades de citocinas e adipocinas pró-inflamatórias, além de promover aumento de infiltrado de macrófagos. Entre as citocinas e adipocinas/hormônio secretados, destacam-se interleucina-6, interleucina-8, leptina e adiponectina, que agem na regulação da ingestão alimentar, ação insulínica, metabolismo de lipídeos e glicose (Guri e Bassaganya-Riera, 2011; Athyros e cols., 2010; Skurk e cols., 2007).

No Brasil e em vários países do mundo, a frutose vem sendo empregada na indústria como adoçante de bebidas, constituindo de 4,0% a 8,0% de seu peso em decorrência da maior solubilidade em soluções aquosas e pelo fato de ser 1,7 vezes mais doce que a sacarose. Alimentos produzidos em confeitarias têm, em média, 1,0% a 2,0% de frutose, porém se esses alimentos apresentarem frutas na composição, a quantidade de frutose pode aumentar para cerca de 11,0%. O mel fornece em média 42,4% do peso

de frutose. O xarope de milho pode aumentar o consumo deste carboidrato para 100g/dia e até 150g/dia se contabilizada a frutose proveniente da sacarose (Barreiros e cols., 2007; Rumessen e Gudmand-Høyer, 1986).

Dados epidemiológicos relacionam a prevalência de obesidade com dietas palatáveis, ricas em carboidratos e gorduras (Wright e Aronne, 2012; Malik e cols., 2010; Popkin e Nielsen, 2003). De fato, além do consumo elevado de sacarose, nas últimas décadas verificou-se aumento da utilização do xarope de milho, rico em frutose, e ambos contribuindo para a elevação do consumo deste carboidrato pela população mundial (Collino, 2011). Estima-se que a população americana tenha aumentado seu consumo diário de frutose no período de 1978 e 2004 em torno de 61% (Marriott e cols., 2009), porém no Brasil não há dados populacionais representativos sobre a situação do consumo deste carboidrato, mas dados da POF (Pesquisa de Orçamento Familiar) mostram consumo médio de 23% da energia proveniente de açúcares por adolescentes brasileiros (IBGE, 2011).

Embora no passado, os estudos tenham mostrado ocorrência de aumento da prevalência de obesidade paralelo à elevação do consumo de frutose (Bray e cols., 2004; Rizkalla, 2010), recentemente novos estudos não apontam essa relação e revisões tendem a sinalizar uma ocorrência que se sobrepôs, mas não se associa (Bray e Popkin, 2013; Bray e Popkin, 2014). Entretanto, há evidências de que o consumo elevado deste carboidrato pode promover alterações periféricas importantes, como a resistência à insulina, hiperglicemia, hipertriacilglicerolemia e especialmente, aumento nos depósitos viscerais de gordura (Bremer e cols., 2011).

O monossacarídeo frutose é um edulcorante natural com alto poder adoçante, com estrutura química similar à da glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ). Sua absorção se dá nos intestinos por meio do transportador de glicose 5 (GLUT 5), que independe da ação da insulina e possui maior afinidade com a frutose quando comparada à glicose (Douard e Ferraris, 2008). Vale ressaltar que a frutose, quando ingerida de forma isolada é mal absorvida, porém, sua absorção é melhorada na presença de glicose, como na sacarose, por exemplo (Havel, 2005; Rumessen e Gudmand-Høyer, 1986). Ao deixar os enterócitos, a frutose é direcionada para a veia porta por meio do transportador de glicose 2 (GLUT 2) (Barreiros e cols., 2005). Grande parte da frutose absorvida é metabolizada no fígado e pode seguir diferentes vias metabólicas (Lê e Tappy, 2006).

Três enzimas principais participam nos primeiros passos do metabolismo da frutose: frutoquinase; aldolase B e trioquinase (Heinz e cols.,1968). O metabolismo de glicose e frutose converge quando há a formação das trioses fosfato, visto que a partir desse ponto o metabolismo de ambos os monossacarídeos são semelhantes. Os principais produtos do metabolismo de frutose são: glicose, lactato, triacilglicerol e glicogênio. Entretanto, a captação de glicose é negativamente regulada pelo teor da enzima fosfofrutoquinase 1 (PFK1), que catalisa a conversão de frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bifosfato, enquanto, a frutose não é catalisada pela PFK1, o que gera rapidamente produtos que são substratos para a lipogênese *de novo* (Mayes, 1993).

A lipogênese, via que integra as reações de síntese de ácidos graxos e, posteriormente de triacilgliceróis, ocorre no tecido adiposo branco e fígado, principalmente no fígado em humanos. O principal substrato para a via é o acúmulo de acetil-CoA na célula. A síntese endógena de lipídios é favorecida pela oferta de substratos e energia que excedem a demanda do organismo em utilizá-la, de forma que a ingestão elevada de macronutrientes, incluindo a frutose, contribui para a lipogênese nos tecidos hepático e adiposo (Ameer e cols., 2014; McDevitt e cols., 2001; Hellerstein, 1999).

A biossíntese de ácidos graxos envolve várias reações, dentre as quais se incluem a oxidação do piruvato à acetil-CoA. Esta última é carboxilada por ação da enzima acetil-CoA carboxilase, gerando um novo composto, malonil-CoA. Desta forma, as duas enzimas envolvidas nas primeiras etapas da lipogênese são a acetil-CoA carboxilase (ACC) e a ácido graxo sintase (AGS) e ambas atuam sob o estímulo da insulina (Vázquez-Vela, Torres e Tovar, 2008). A ACC é importante na via de síntese de ácidos graxos e já foram identificadas as isoformas 1 e 2. A isoforma 1 está envolvida na gênese de lipídio propriamente dita, enquanto que a 2 atua inibindo o processo mitocondrial de  $\beta$ -oxidação. Assim, de forma cíclica, a interrupção da oxidação de ácidos graxos provoca aumento na concentração de malonil-CoA, cujos níveis aumentados inibem a carnitina palmitoil-transferase 1 (CPT-1) e conseqüentemente a  $\beta$ -oxidação (McGarry e Brown, 1997) e, nesta perspectiva, a lipogênese é então ativada.

O SREBP compreende uma família de fatores de transcrição que ativam genes que sintetizam enzimas reguladoras da biossíntese de ácidos graxos (Osborne, 1995; Brown e Goldstein, 1997; Horton e Shimomura, 1999). Dentre as isoformas do SREBP, a 1c preferencialmente aumenta a transcrição de genes associados com a síntese de ácidos



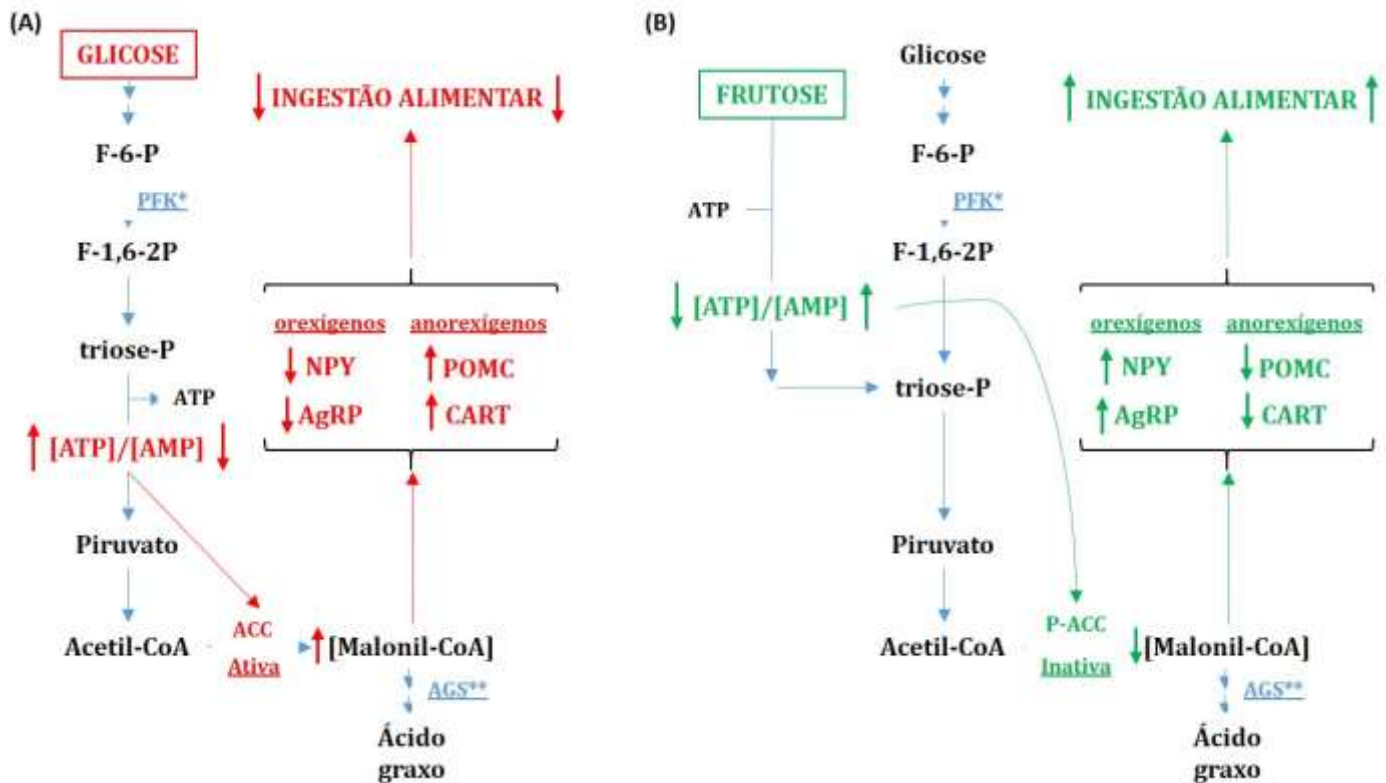
graxos, enquanto a SREBP 2 ativa genes da via de síntese de colesterol (Horton e cols., 2002).

Botezelli e cols (2012) demonstraram que a ingestão de frutose estimula a taxa de lipogênese no fígado de ratos e sugerem que as interações gene-dieta podem ter papel peculiar na regulação transcricional e secretória de adipocinas e, apesar da frutose ter efeito direto sobre a adiposidade, ainda não está claro como este açúcar participa na ativação do principal fator regulador transcricional da lipogênese, o SREBP-1c (Samuel, 2011).

O balanço energético é monitorado por neurônios hipotalâmicos, que respondem a sinais periféricos (nutricionais e hormonais) e neurais, de forma que a condição de energia de um organismo determina modificações na síntese de neuropeptídeos para promover respostas que estimulam (orexígenas) ou inibem (anorexígenas) a ingestão alimentar (Schwartz e cols., 2000).

O hipotálamo representa o comando central que controla não apenas o apetite, mas também o metabolismo de glicose e lipídios em órgãos periféricos. Portanto, o controle hipotalâmico do balanço energético tem papel central no desenvolvimento da obesidade (Schwartz e cols., 2000; Zigman e Elmquist, 2003; Niswender e cols., 2004) e esta constatação tem levado a investigações que evidenciem se o metabolismo lipídico central participa na sinalização hipotalâmica de regulação da ingestão.

Dowell e cols. (2005) sugerem que a síntese de ácidos graxos pode estar envolvida na expressão hipotalâmica de neuropeptídeos que regulam a ingestão alimentar e apontam a molécula de malonil-CoA como possível intermediário da via lipogênica que participa deste mecanismo, sendo este considerado um dos fatores que participa no controle central da ingestão alimentar (López e Vidal-Puig, 2008; Hu e cols., 2005). Foi demonstrado ainda que embora a glicose e a frutose utilizem a mesma via de sinalização hipotalâmica para controlar a ingestão de alimentos, esses substratos atuam de forma inversa e têm efeitos recíprocos sobre a concentração de malonil-CoA no hipotálamo. De forma que o aumento no seu conteúdo promove ação anorexígena e sua diminuição gera resposta orexígena (Lopaschuk e cols., 2010; Wolfgang e Lane, 2008), como pode ser observado na figura abaixo.



**Figura 1.** Vias de sinalização hipotalâmica para glicose (A) e frutose (B) no controle da ingestão de alimentos. Adaptado de Lane e Cha, 2009. \* Fosfofrutoquinase; \*\* Ácido Graxo Sintase

Os dados acima ilustrados na figura 1 suportam a ideia de que o hipotálamo utiliza o malonil-CoA como sinalizador do nível de energia no organismo e esta molécula pode, por sua vez, regular o fluxo de substratos intracelulares de forma a promover resposta anorexígena (Ruderman e cols., 2003). Além disso, a AGS é descrita com a capacidade de integrar sinais hormonais e nutricionais no hipotálamo e assim participa no controle da ingestão alimentar (Loftus e cols., 2000). É uma enzima que age sobre a molécula de malonil-CoA promovendo a síntese de ácidos graxos, de forma que sua inibição tem efeito anorexígeno no hipotálamo, resultante do acúmulo de malonil-CoA.

Estudos em ratos demonstraram que a infusão do inibidor da AGS, o C75, leva ao aumento dos teores de malonil-CoA, resultando em resposta anorexígena, enquanto a infusão intracerebroventricular de frutose reduz os seus teores, suprimindo a expressão do RNAm para proopiomelanocortina (POMC), potente peptídeo anorexígeno, levando à resposta orexígena (Hu e cols., 2003; Cha e cols., 2008). Juntas, estas informações apontam para o envolvimento das enzimas lipogênicas na regulação da ingestão alimentar.

Sabe-se que a frutose é capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica (Cha e Lane, 2009; Thurston e cols., 1972) e que o sistema nervoso central (SNC) possui enzimas necessárias para sua metabolização (Funari e cols., 2005; Miller e cols., 2002). Além disso, as enzimas e fatores de transcrição lipogênicos também são encontrados em áreas importantes do SNC (Okamoto e cols., 2006), levando a sugerir que o consumo de frutose pode influenciar a lipogênese central pelo aumento da expressão de SREBP-1c no tecido hipotalâmico.

A expressão de SREBP-1c no cérebro não responde às alterações metabólicas periféricas, como o estado nutricional e teores de insulina e leptina (Okamoto e cols., 2006), entretanto o consumo de frutose parece favorecer a expressão do RNAm para SREBP-1c no fígado, e a ativação exacerbada desse fator de transcrição pode ter papel importante na patogênese de muitas alterações metabólicas, tais como esteatose hepática e disfunção hepática e estímulo à fatores pró-inflamatórios (Ruscica e cols., 2016; Mastrocola e cols., 2016; Nagata e cols., 2004; Nagai e cols., 2002).

O efeito da ativação da SREBP-1c sobre a regulação da ingestão alimentar e a influência dos nutrientes circulantes sobre a expressão desse fator de transcrição no SNC ainda é controverso, uma vez que existem poucos estudos acerca desse assunto. Sabe-se que a realimentação não influencia tal expressão (Okamoto e cols., 2006), mas nada se sabe sobre o consumo crônico ou prolongado de nutrientes sobre essa ativação.

A expressão do fator SREBP-1c pode ser regulada pela AMPK em células hepáticas (You e cols., 2004), a qual é expressa em altos níveis no cérebro (Stapleton, 1996), sugerindo que em neurônios hipotalâmicos a atividade da acetil-CoA carboxilase parece ser controlada por mudanças na atividade da AMPK. Além disso, a acetil-CoA carboxilase catalisa a formação de malonil-CoA, que é substrato para formação de ácidos graxos pela enzima AGS (Wolfgang e Lane, 2006). Entretanto, ainda é discutida a possibilidade da AMPK regular enzimas lipogênicas no cérebro e, apesar da segura participação de sua fração hipotalâmica na homeostase energética, não é claro a relevância desta proteína no desenvolvimento da obesidade.

Como dito anteriormente, embora Okamoto e cols. (2006) sugiram que a expressão de SREBP-1c no cérebro não seja regulada pelas condições nutricionais, foi demonstrado que ácidos graxos poliinsaturados da série n-3 afetam a expressão da SREBP-1c em cérebro de camundongos (Zhu e cols., 2010). Assim, apesar da SREBP-1c ser expressa no cérebro, existem poucos estudos sobre a repercussão das condições

nutricionais e efeitos da frutose sobre a gênese de gordura no SNC e, mais especificamente, sobre a regulação da expressão dessa proteína e atividades de enzimas lipogênicas no cérebro.

Além da ação na via lipogênica, a frutose apresenta potente efeito pró-inflamatório em tecidos periféricos (Castro e cols., 2015), porém poucas evidências mostram sua ação inflamatória no hipotálamo. Sabe-se que a inflamação hipotalâmica está envolvida na alteração de peptídeos que participam da regulação da ingestão alimentar, como a POMC e a *Agouti-Related Peptide* (AgRP) e que existem sinais de que a “hiperalimentação” pode ativar vias inflamatórias em regiões hipotalâmicas (Valdearcos e cols., 2015).

A ativação do receptor do tipo *Toll* 4 (TLR4) está associada com a fosforilação e liberação do Fator Nuclear *kappa* B (NFkB), que por sua vez possui efeito pró-inflamatório no hipotálamo e provoca resposta inflamatória no tecido (Zhang e cols., 2008).

Evidências indicam que a frutose pode suprimir a via de sinalização hipotalâmica e exercer efeito orexígeno (Cha e cols., 2008; Miller e cols., 2002). Entretanto, estudos sustentam a hipótese de que a frutose exerce seu efeito no SNC, através da via malonil-CoA, com consequente repercussão sobre a atividade de enzimas lipogênicas (Lane e Cha, 2009; Cha e cols., 2008). Porém não foram encontrados estudos que demonstraram se o efeito do consumo prolongado de frutose na dieta promove resposta semelhante, e se a ação da frutose no hipotálamo passa pela regulação gene-dieta, podendo alterar a expressão do fator de transcrição SREBP ou levar à inflamação hipotalâmica.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Avaliar no hipotálamo de ratos após administração crônica e prolongada de solução oral de frutose, teores proteicos e expressão gênica de vias lipogênicas e inflamatórias.

#### 3.2. Específicos

Nos ratos após 8 semanas de tratamento com e sem solução oral de frutose:

- Avaliar o consumo alimentar, a massa corporal e a ingestão de líquidos;
- Analisar a glicemia e triacilglicerolemia de jejum;
- Quantificar o teor hipotalâmico das proteínas da via:
  - a) lipogênica: acetil-CoA carboxilase (ACC) e ácido graxo sintase (AGS) e;
  - b) inflamatória: NFkB (p65);
- Avaliar a expressão hipotalâmica dos RNAm para:
  - a) os fatores de transcrição: SREBP (isoformas 1c e 2) e NFkB (p65);
  - b) a proteína acetil-CoA carboxilase (ACC).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Condições e grupos experimentais

Para o desenvolvimento, o projeto foi submetido à análise e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) (Protocolo Macaé030 – Anexo 1). Foram utilizados machos *Wistar*, recém-desmamados (30 dias), distribuídos em gaiolas individuais e mantidos no biotério sob ciclo de luz de 12 horas (6h00 às 18h00) em temperatura constante ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) com livre acesso a água ou solução de frutose e alimentação até o 90º dia de vida, quando foram eutanasiados por decapitação em guilhotina e o hipotálamo rapidamente dissecado e tratado com tampões para coleta de material e avaliações.

No 30º dia de vida os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais: Controle (C) e Frutose (F), tratados com livre acesso à dieta e fonte hídrica (água ou solução aquosa de frutose à 20%).

A solução aquosa de frutose oferecida a 20% (Shu e cols., 2006) foi a única fonte hídrica para os animais do grupo frutose. A oferta da frutose em solução aquosa teve como objetivo reproduzir os tipos de fontes comumente utilizadas pela população, como refrigerantes e sucos adoçados.

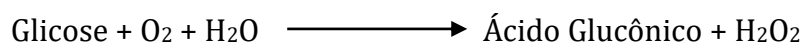
### 4.2. Avaliação da ingestão alimentar de 24 horas, ganho de massa corporal e estimativa do consumo de frutose e energia.

O consumo de ração e solução de frutose em 24h e a avaliação semanal da massa corporal foram realizados individualmente. Para a estimativa do consumo foi avaliado o resto-ingestão das ofertas de ração e solução aquosa de frutose em 24h. Semanalmente, quantidade de ração e solução de frutose eram disponibilizados aos animais e, no dia posterior no mesmo horário, pesava-se o resto de solução e ração. O teor de frutose foi calculado a partir do volume ingerido em 24h, por conversão em gramas do volume (20% v/v) suplementado. Na conversão à energia foi computado o consumo de ração e frutose, e considerados os valores de 9 kcal/g de lipídios e 4 kcal/g de proteínas e carboidratos, incluindo a frutose de adição.

### 4.3. Avaliações bioquímicas – glicose e triacilglicerol

Após jejum de 12 horas, os animais foram eutanasiados em guilhotina e o sangue coletado e centrifugado a 2.500 rpm por 15 minutos a 4º C. Em seguida, o soro foi separado e aliquotado, permanecendo estocado a -80º C até a realização das dosagens, à exceção da glicose que foi dosada imediatamente após a obtenção da amostra para evitar erros na leitura.

A glicose foi determinada pelo método enzimático utilizando kit comercial com limite de detecção de 0,41mg/dL (Glicose PAP Liquiform, Labtest Diagnóstica, BH-MG). Neste método a glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose de acordo com a seguinte reação:



O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, por meio de uma reação oxidativa de acoplamento, formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.

Os teores séricos de triacilgliceróis foram determinados por meio de método colorimétrico, utilizando kit comercial (Triglicérides Liquiform, Labtest Diagnóstica, MG, Brasil). Esse método baseia-se na hidrólise dos triacilgliceróis pela ação da lipase lipoproteica e fosforilação do glicerol liberado pela enzima glicerol quinase. O glicerol fosfato resultante é oxidado por ação da glicerol-3-fosfato oxidase resultando na liberação de dihidroxiacetona e água oxigenada. Por intermédio de reação oxidativa, catalisada pela peroxidase, a água oxigenada reage com os compostos 4-aminoantipirina (4-AMP) e 4-clorofenol, produzindo a quinoneimina (vermelha), cuja intensidade da cor vermelha é diretamente proporcional à concentração dos triacilgliceróis na amostra.

Para os dois ensaios, tanto glicose quanto triacilglicerol, foram pipetados 2µL de amostra do soro de cada animal e 200µL de reagente nas placas de microensaio. Após incubação a 37ºC durante 15 minutos, a leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplacas (Asys Expert96, Biochrom, Cambridge, Reino Unido) em comprimento de onda de 505nm. Os resultados de glicemia e triacilglicerolemia foram apresentados em miligramas por decilitro (mg/dL).

#### 4.4. Avaliação do teor hipotalâmico de proteínas das vias lipogênica e inflamatória por Western Blotting

##### 4.4.1. Extração de proteínas

A quantificação das proteínas acetil-CoA carboxilase, ácido graxo sintase e NFkB foi realizada por *Western blotting* (Towbin e cols., 1979) em amostras de extrato total do hipotálamo. O tecido de cada animal foi rapidamente homogeneizado em 1mL de tampão de extração (Trizma base 100mM, pH 7,5; Aprotinina 0,1mg/mL; PMSF - 2mM; Ortovanadato de sódio 10mM; Fluoreto de sódio 100mM; Pirofosfato de sódio 10mM e EDTA - 10mM). Após homogeneização, as amostras foram adicionadas de Triton X-100 (1%), mantidas em gelo por 30 minutos e centrifugadas a 14.000 rpm por 20 minutos à 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e mantidos em freezer a -80°C até o momento das análises.

O teor de proteína dos extratos foi determinado utilizando-se kit Bradford (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) e a quantidade de amostra a ser aplicada foi normalizada entre 50 e 100µg de proteína por poço.

##### 4.4.2. Eletroforese

Para a separação das proteínas por eletroforese, foi adicionado às alíquotas igual volume de tampão Laemmli (Azul de bromofenol 0,01%; Fosfato de sódio 50mM; Glicerol 25%; SDS 1%) (Laemmli, 1970) contendo β-mercaptoetanol a 1M. Os tubos contendo as amostras foram aquecidos em banho-maria a 100°C durante 5 minutos e aplicados em gel de poliacrilamida a 7% para as proteínas ACC e AGS e 10% para a proteína NFkB. As proteínas investigadas foram identificadas comparativamente ao padrão de peso molecular compatível (RPN800E - GE Healthcare, Piscataway, EUA) aplicado em todos os géis (SDS-PAGE).

Após a separação por eletroforese, as amostras foram transferidas em refrigeração a 70V, por 120 minutos, para membrana de nitrocelulose (RPN303E - Amershan Biosciences, Piscataway, EUA). Logo após a transferência, as membranas foram bloqueadas em 5 mL de solução de bloqueio (solução basal contendo albumina 1%; Trizma base 100mM; NaCl 1,5M; Tween 20 à 4%). Após o bloqueio, cada membrana foi incubada *overnight* em refrigeração, com os anticorpos primários contra as proteínas de interesse, diluídos em solução de bloqueio a 1:1.000. Após 3 lavagens de 10 minutos



com solução basal, a membrana foi incubada com anticorpo secundário associado à peroxidase (A5420; A0545 - Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) por 1 hora diluídos a 1:20.000. Após a incubação com anticorpo secundário, a membrana foi lavada e revelada por quimiluminescência. Para a revelação, foram aplicados 400  $\mu$ L da mistura dos reagentes de revelação ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, EUA) em cada membrana, em seguida filmes de raio-x Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, EUA) foram expostos a reação de luminosidade e impressa nos filmes as bandas correspondentes às proteínas marcadas. As bandas das proteínas de interesse foram quantificadas por densitometria utilizando-se software Image J (NIH Image, Bethesda, Maryland, EUA) e padronizadas com as bandas de  $\alpha$ -tubulina.

As membranas foram submetidas ao descarregamento (*stripping*), para extração dos anticorpos anteriormente ligados às proteínas e permitir a reibridização com anticorpo  $\alpha$ -tubulina (2144 - Cell Signaling, Boston, EUA). O descarregamento consiste na incubação da membrana com solução (Trizma base 0,75g; SDS 0,2g;  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2M em 100 mL de água deionizada) por 30 minutos, com agitação a cada 5 minutos a 48°C em estufa. Todas as membranas descarregadas foram bloqueadas e incubadas com anticorpo primário  $\alpha$ -tubulina e anticorpo secundário como descrito acima. A marcação das membranas com o anticorpo  $\alpha$ -tubulina teve como propósito normalizar a carga de proteínas aplicadas nos géis.

#### 4.5. Avaliação da expressão dos genes por que codificam as proteínas envolvidas nas vias lipogênicas e inflamatórias no hipotálamo

##### 4.5.1. Extração de RNA

Após a eutanásia, o hipotálamo de cada animal foi rapidamente dissecado e homogeneizado em 1 mL de Trizol (Thermo Scientific). Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e adicionados de 200 $\mu$ L de clorofórmio e centrifugados à 12000g por 15 minutos a 4°C para separação de fases. Nesta etapa foram formadas 3 fases: fenólica, interfase e aquosa, sendo esta última, a fase que contém o RNA.

Coletada a fase aquosa, cada amostra foi adicionada de 500  $\mu$ L de isopropanol, incubadas por 10 minutos e centrifugadas à 12000g por 10 minutos em refrigeração para precipitação do RNA, que se torna visível com a formação de *pellet* no fundo do

microtubo. Uma vez precipitado, o sobrenadante foi descartado por inversão e os *pellets* foram lavados com etanol 75% (diluído com água ultrapura livre de DNase e RNase), secados em temperatura ambiente e suspensos em 20 µL de água.

A qualidade e concentração de RNAm foram avaliadas com a utilização de aparelho Nanodrop (Thermo Scientific), considerada melhor relação nos comprimentos de onda A260/280 entre 1,9 e 2,09. As amostras de RNA foram estocadas em freezer até a síntese de cDNA.

#### 4.5.2. Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado por meio de kit comercial *High-Capacity cDNA* (Applied Biosystems), com a adição de 10 µl de *mastermix* (2 µl de 10X *RT Buffer*, 0,8 µl de 25X *dNTP mix*, 2 µl de 10X *RT Random primers*, 1µl de *MultScribe RT* e 4,2 µl de água livre de nuclease) e 10 µl de amostras de RNA normalizada entre 1 e 3 µg/RNA por amostra. Após o preparo das reações, a placa foi colocada em termociclador com as especificações do Quadro 1:

**Quadro 1.** Tempo e temperatura para síntese de cDNA, utilizando-se kit High-Capacity cDNA.

	<b>Passo 1</b>	<b>Passo 2</b>	<b>Passo 3</b>	<b>Passo 4</b>
<b>Temperatura</b>	25°C	37°C	85°C	4°C
<b>Tempo</b>	10 min	120 min	5 min	∞

#### 4.5.3. Amplificação do RNAm

Uma vez obtido o cDNA, foi quantificada a expressão gênica mediante a amplificação pela técnica de PCR (Real Time PCR ou reação em cadeia de polimerase) em tempo real por meio do aparelho *StepOne Plus* (Applied Biosystems). Foram usados sondas customizadas para os genes SREBP-1c, SREBP2 e 18S e amplificação do RNA foi realizada por uso de *mastermix* TaqMan (Applied Biosystems). Após o preparo das reações, as placas foram centrifugadas à 2.500 rpm por 5 minutos para eliminação de bolhas de ar e carregadas no aparelho com os parâmetros descritos no Quadro 2.

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram analisados em  $\Delta\Delta CT$ , utilizando-se o gene 18S como controle endógeno.

**Quadro 2.** Parâmetros para a amplificação do mRNA no *StepOne Plus*, utilizando-se reagente TaqMan com probes personalizados.

Parâmetro	Ativação da polimerase	PCR (40 ciclos)	
		Desnaturar	Anelar/Estender
<b>Temperatura</b>	95°C	95°C	60°C
<b>Tempo (mm:ss)</b>	10:00	00:15	01:00

#### 4.6. Análise dos dados

Todos os resultados obtidos foram tabulados em planilhas do programa Excel versão 365 (Microsoft Office, EUA) e, a partir desses, foi realizada a análise estatística no programa GraphPad Prism versão 6 (GraphPad Prism Software Inc., EUA).

Inicialmente, todas as variáveis foram avaliadas quanto à normalidade de sua distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e, assumindo normalidade, submetidos ao teste “t” de Student. No entanto, em situações em que os resultados não apresentaram distribuição gaussiana, aplicou-se o teste de Mann-Whitney. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

## **5. RESULTADOS**

Os dados obtidos no presente estudo foram organizados de forma a construir manuscrito a ser submetido em periódico para publicação. Desta forma, os resultados e discussão foram apresentados como artigo.

## **Alteração na expressão gênica do SREBP-1c e alteração no teor de enzimas lipogênicas em hipotálamo de ratos que receberam solução oral de frutose**

Leandro O. Batista<sup>1</sup>, Viviane W. Ramos<sup>1</sup>, Carlos M.C. Vilca<sup>1</sup>, Mariana A.R. Fernández<sup>1</sup>, Kelse T. de Albuquerque<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Nutrição Experimental. Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus UFRJ – Macaé.

Av. Aloísio da Silva Gomes, 50 - 27930-560 - Macaé – Rio de Janeiro, Brasil

Autor correspondente: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kelse T. de Albuquerque. E-mail: kelsealbuquerque@macae.ufrj.br - Fone: (22)21414019

### Resumo

Nos últimos anos, estudos apontam que o metabolismo intermediário pode participar da regulação hipotalâmica da ingestão alimentar. Entretanto, ainda não está claro como alguns nutrientes, como a frutose, pode participar da ativação de enzimas da via lipogênica e dos passos iniciais da via inflamatória. Assim, foi avaliado se o consumo de frutose por 8 semanas afeta enzimas e fatores de transcrição das vias lipogênica e inflamatória no hipotálamo de ratos *Wistar*. Aos 30 dias os animais foram divididos em grupos: Controle (C) e Frutose (F) e mantidos com acesso livre à ração e água filtrada (C) ou solução aquosa de frutose à 20% (F). Os resultados mostraram no grupo F menor consumo de ração, aumento na glicemia (146,20±6,09 vs. 102,32±4,58; n:9) e triacilglicerolemia (F:191,65±13,51 vs. C:131,69±6,49; n:9) e não houve diferença no consumo hídrico e energético. Identificamos maior teor de ACC (F: 133,93±5,58 vs. C: 100±0,0; n:9-10), NFκB (F: 125,5±8,85 vs. C: 100±0,0; n:14) e SREBP-1c (F: 4,08±0,44 vs. C: 1,13±0,15; n:5-6) no grupo F, enquanto AGS foi menor (F: 85,90±4,81 vs. C: 100±0,0; n:4-6). Os genes para ACC, SREBP-2 e NFκB não foram diferentes entre os grupos. Concluimos que a frutose altera fatores lipogênicos e inflamatórios importantes no hipotálamo de ratos e leva à regulação de fatores de transcrição antes das alterações na massa corporal se evidenciarem.

Palavras Chaves: Frutose – enzimas lipogênicas – Inflamação - hipotálamo – SREBP – Obesidade

## INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas três décadas pesquisas mostram alarmante aumento na incidência de obesidade e diabetes tipo 2 na população mundial (Johnson e cols., 2013). Paralelamente a este aumento evidências apontam que o consumo elevado de frutose pode promover alterações metabólicas periféricas importantes, como a resistência à insulina, alterações no metabolismo de colesterol e especialmente, aumento nos depósitos viscerais de gordura (Sharawy e cols., 2016; Bremer e cols., 2011). Muitas dessas alterações associam-se com o efeito lipogênico atribuído a este carboidrato, com a ativação de fatores de transcrição como o SREBP-1c e enzimas da via lipogênica no fígado (Samuel, 2011).

No entanto, pouco é conhecido sobre o efeito da ingestão de frutose no hipotálamo. É sabido que o hipotálamo representa o comando central que controla não apenas o apetite, mas o metabolismo de carboidratos e lipídios em órgãos periféricos. Portanto, o controle hipotalâmico do balanço energético tem papel fundamental no desenvolvimento da obesidade e esta constatação tem motivado investigações de como o metabolismo central participa na sinalização hipotalâmica de regulação da ingestão alimentar (Schwartz e cols., 2000; Zigman e Elmquist, 2003; Niswender e cols., 2004).

Estudos apontam que tanto a glicose como a frutose utilizam da mesma via de sinalização hipotalâmica de regulação da ingestão alimentar, ainda que atuam de maneira inversa e com efeitos recíprocos na concentração hipotalâmica de Malonil-CoA, um intermediário chave na cascata de sinalização hipotalâmica que regula o balanço energético (Rizkalla, 2010; Cha e cols., 2008). Nos animais que receberam infusão intracerebroventricular de frutose ocorreu aumento da ingestão alimentar associada com reduzido teores hipotalâmico de Malonil-CoA, enquanto infusão de glicose na mesma concentração aumentou o teor de Malonil-CoA e reduziu o apetite e a ingestão de alimentos (Miller et al, 2002). As enzimas lipogênicas acetil-CoA carboxilase (ACC) e a ácido graxo sintase (AGS), envolvidas na regulação hipotalâmica da ingestão alimentar por intermédio da molécula malonil-CoA, também foram alteradas após a infusão intracerebroventricular de frutose (Lane e Cha, 2009; e Cha e cols., 2008).

Estes dados apontam que o acúmulo ou declínio celular de malonil-CoA sinaliza o estado metabólico do indivíduo e parece modular a liberação de fatores orexígenos ou anorexígenos, regulando a ingestão alimentar.

Além da ação na via lipogênica, a frutose apresenta potente efeito pró-inflamatório em tecidos periféricos (Castro e cols., 2015), porém poucas evidências mostram este efeito no sistema nervoso central. Sabe-se que a inflamação hipotalâmica altera peptídeos envolvidos na regulação da ingestão alimentar, como a proopiomelanocortina (POMC) e a *agouti-related peptide* (AgRP) e que evidências sugerem que a hiperalimentação pode ativar vias inflamatórias em regiões hipotalâmicas (Valdearcos e cols., 2015, Milanski e cols., 2012; Cintra e cols., 2011)

Na obesidade, a infiltração de macrófagos e outras células do sistema inato no tecido adiposo levam à liberação desregulada de adipocinas, provocando inflamação de grau leve a moderado e consequente alteração do perfil de citocinas pró-inflamatórias circulantes (Lumeng e Saltiel, 2011; Ouichi e cols., 2011; Xu e cols., 2003), entretanto não se tem claro se este mecanismo se reproduz no tecido hipotalâmico. O NFκB (*nuclear factor kappa B*) possui efeito pró-inflamatório, e no hipotálamo a ativação do *Toll-like Receptor 4* (TLR4) está associada com a fosforilação e liberação deste fator de transcrição, resultando em resposta inflamatória no tecido (Zhang e cols., 2008).

Considerando a relação entre o potencial lipogênico e inflamatório da frutose, o seu crescente e elevado consumo populacional e a ausência de investigação desses efeitos no sistema nervoso central, o presente trabalho avaliou se a ingestão de frutose em concentrações elevadas na dieta, altera atividade hipotalâmica das enzimas ACC, AGS e os fatores de transcrição SREBP-1c, SREBP-2 e NFκB. Tais avaliações tem por base científica a estimativa de consumo médio de 20% da energia total ingerida como açúcares por indivíduos adultos no mundo (Newens e Walton, 2016), o que é considerado elevado e pode determinar repercussões lipogênica e inflamatória no hipotálamo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Condições e grupos experimentais*

Machos Wistar, recém-desmamados (30 dias) foram distribuídos nos grupos: Controle (C) e Frutose (F) e tratados com livre acesso à dieta e fonte hídrica. A solução aquosa de frutose oferecida a 20% (Shu e cols., 2006) foi a única fonte hídrica para os animais do grupo frutose. Os animais foram mantidos no biotério em condições adequadas de luz (6h00 às 18h00 claro/escuro) e temperatura (24 + 1°C) até o 90º dia de vida, quando foram eutanasiados por decapitação em guilhotina e o hipotálamo rapidamente dissecado para as avaliações. O protocolo utilizado foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Instituição.

### *Avaliação da ingestão alimentar (ração e frutose), energia e massa corporal*

O consumo de 24h de ração e solução de frutose e a avaliação semanal da massa corporal foram realizados individualmente. Para a estimativa do consumo foi avaliado o resto-ingestão das ofertas de ração e solução aquosa de frutose em 24h. O teor de frutose foi calculado a partir do volume ingerido em 24h, por conversão em gramas do volume (20% v/v) suplementado. Na conversão à energia foi computado o consumo de ração e frutose, e considerados os valores de 9 kcal/g de lipídios e 4 kcal/g de proteínas e carboidratos, incluindo a frutose de adição.

### *Avaliações bioquímicas*

Após jejum de 12 horas, os animais foram eutanasiados em guilhotina e o sangue coletado e centrifugado a 2.500 rpm por 15 minutos a 4º C. Em seguida, o soro foi separado e aliquoteado, permanecendo estocado a -80º C até a realização das dosagens, à exceção da glicose que foi dosada imediatamente após a obtenção da amostra para evitar erros na leitura. A glicose foi determinada pelo método enzimático utilizando kit comercial com limite de detecção de 0,41mg/dL (Glicose PAP Liquiform, Labtest Diagnóstica, BH-MG). Os níveis de triacilgliceróis foram determinados por meio de método colorimétrico, utilizando kit comercial (Triglicérides Liquiform, Labtest Diagnóstica, MG, Brasil).



### *Avaliação do teor hipotalâmico de proteínas das vias lipogênicas e inflamatórias por Western Blotting*

Para a avaliação das enzimas ácido graxo sintase, acetil-CoA carboxilase, e NFkB cada hipotálamo foi retirado e homogeneizado individualmente em tampão de extração de proteínas à 4°C (Trizma base 100mM, pH 7,5; Aprotinina 0,1mg/mL; PMSF - 2mM; Ortovanadato de sódio 10mM; Fluoreto de sódio 100mM; Pirofosfato de sódio 10mM e EDTA - 10mM), adicionadas de 100µL de Triton X-100 10%, mantidas em gelo por 30 minutos e centrifugadas a 14.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O teor de proteína dos extratos foi determinado utilizando-se método de Bradford e a quantidade de amostra aplicada foi normalizada entre 50-100µg de proteína. Foi adicionado às alíquotas tampão Laemmli (v/v) (Azul de bromofenol 0,01%; Fosfato de sódio 50mM; Glicerol 25%; SDS 1%) (Laemmli, 1970) contendo 2-mercaptoetanol a 1M. As amostras foram aquecidas em banho-maria a 100°C durante 5 minutos e aplicados em gel de poliacrilamida a 10% e depois transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas então foram bloqueadas com 5% de solução basal contendo albumina de soro bovina (0,1% Tween 20 em tampão TBS) e incubada com anticorpo primário contra ACC, AGS (Cell Signalling) e NFkB (Sabiotech) à 1:1000 *overnight* sob refrigeração. Em seguida as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich) à 1:20000 por 1h em temperatura ambiente. As bandas foram detectadas por reação de quimiluminescência em filme. A intensidade das bandas foi analisada por densitometria em software ImageJ.

### *Avaliação da expressão gênica – qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction)*

O hipotálamo de cada animal foi rapidamente dissecado e homogeneizado em 1mL de Trizol (Thermo Scientific) e o RNA foi extraído de acordo com o protocolo do fabricante. Após a extração do RNA, o cDNA foi sintetizado por meio de kit comercial *High-Capacity cDNA* (Applied Biosystems) e sintetizado de acordo com os parâmetros fornecidos pelo fabricante. Os níveis de RNAm dos genes alvo foram avaliados por meio do aparelho *StepOne Plus* (Applied Biosystems). Foram usados probes customizados para os genes SREBP-1c, SREBP-2, ACC, NFkB e 18S, e a amplificação do RNA foi realizada por uso de *mastermix* TaqMan (Applied Biosystems). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram analisados em  $\Delta\Delta CT$ , utilizando-se o gene 18S como controle endógeno.

### *Análise dos resultados*

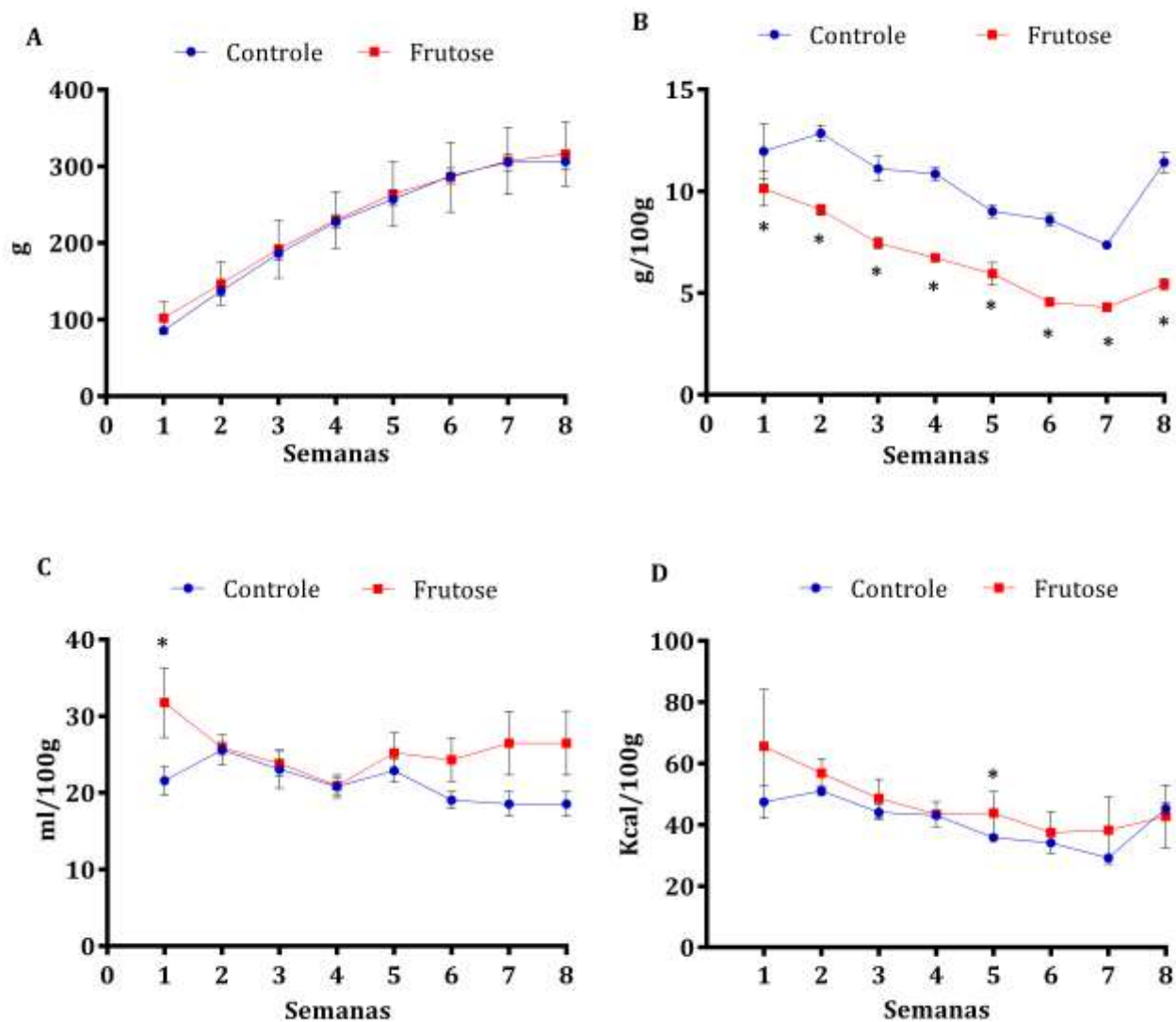
Todos os resultados obtidos foram tabulados em planilhas do programa Excel versão 365 (Microsoft Office, EUA) e, a partir desses, foi realizada a análise estatística no programa GraphPad Prims versão 6 (GraphPad Prism Software Inc., EUA).

Inicialmente, todas as variáveis foram avaliadas quanto à normalidade de sua distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e, assumindo normalidade, submetidos ao teste “t” de Student. No entanto, em situações em que os resultados não apresentaram distribuição gaussiana, aplicou-se o teste de Mann-Whitney. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

*Avaliação da ingestão alimentar (24h), massa corporal e estimativa do consumo de frutose e energia.*

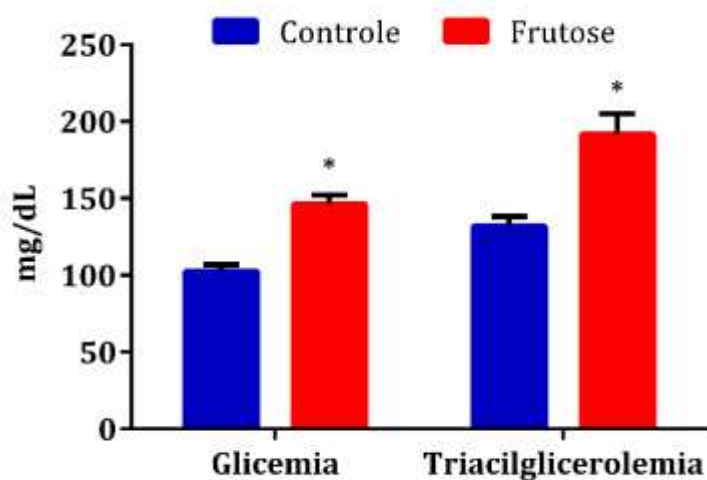
Inicialmente, avaliamos a massa corporal semanal (Figura 2A). O ganho total também foi avaliado (dados não mostrados), entretanto, não obtivemos diferenças nos dados analisados. O grupo frutose demonstrou menor consumo de ração durante todo o período de tratamento (Figura 2B) e apresentou maior consumo ( $p=0,004$ ) hídrico na 1ª semana (Figura 2C) e de ingestão energética ( $p=0,005$ ) (Figura 2D) na 5ª semana. O consumo diário médio estimado de frutose em solução foi de 5,12 g/100g de massa corporal.



**Figura 2.** Peso semanal (A), ingestão de ração (B), ingestão hídrica (C) e ingestão energética (D) dos grupos Controle e Frutose. Valores expressos como Média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. Controle.  $n = 10$ .

### *Avaliações bioquímicas*

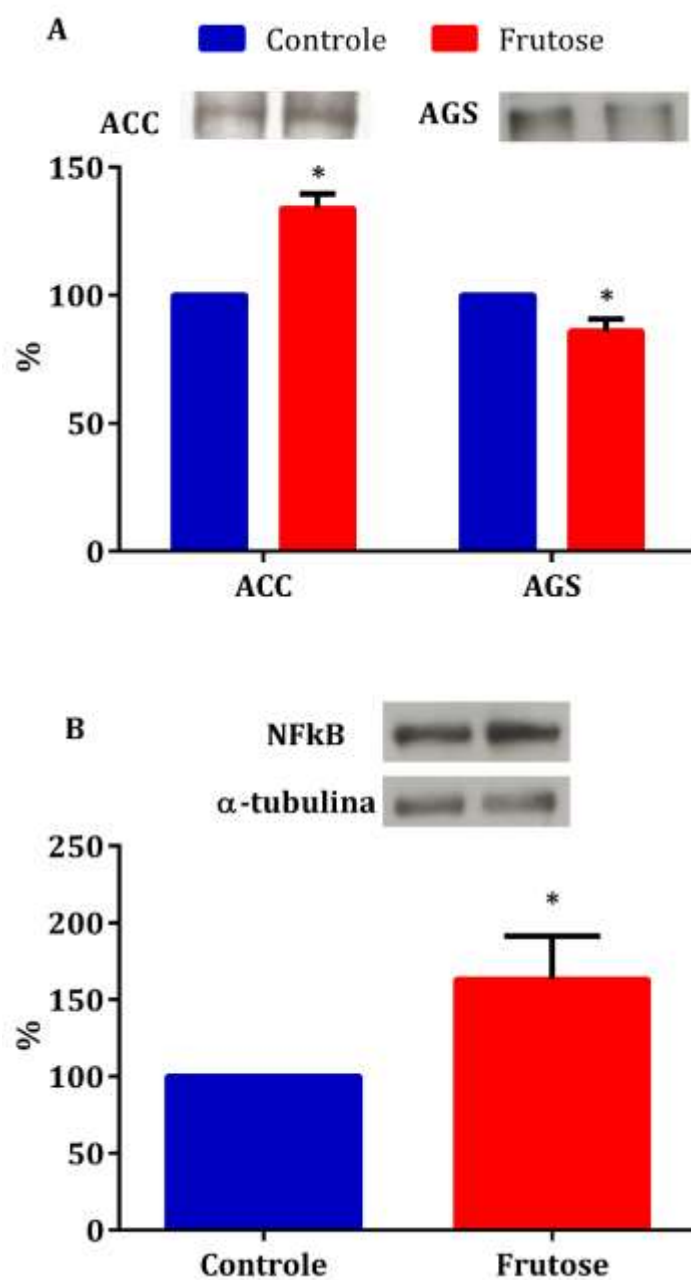
Observou-se que o grupo frutose, mesmo em jejum, apresentou maior glicemia ( $p < 0,0001$ ) e triacilglicerolemia comparado ao grupo controle ( $p = 0,0019$ ) (Figura 3).



**Figura 3.** Glicemia e triacilglicerolemia dos grupos Controle e Frutose. Valores expressos como Média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs Controle.  $n = 9$ .

### *Avaliação hipotalâmica de proteínas por Western Blotting*

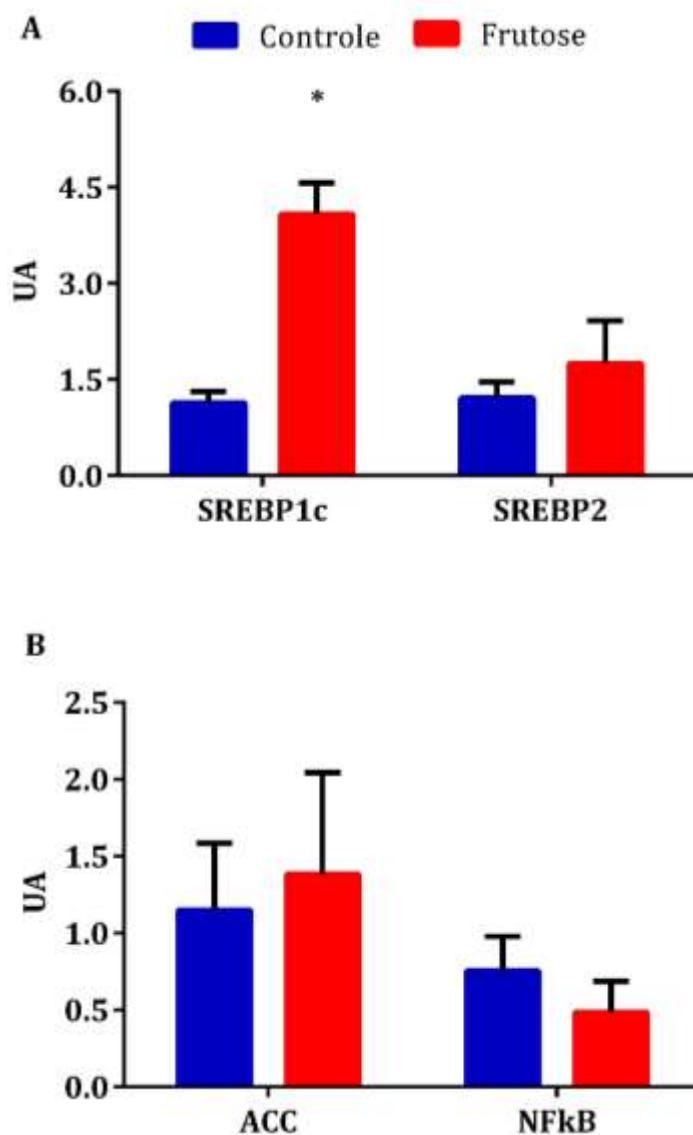
Os teores das proteínas hipotalâmicas estavam alterados no grupo frutose, com maior teor da enzima acetil-CoA carboxilase ( $p < 0,0001$ ) (Figura 4A) e do fator nuclear NFkB ( $p = 0,042$ ) (Figura 4B) e menor teor da ácido graxo sintase ( $p = 0,006$ ) (Figura 4A).



**Figura 4.** Teor hipotalâmico relativo (%) das proteínas Acetil-CoA Carboxilase (n=10), Ácido Graxo Sintase (A) (n=6) e do fator de transcrição NFκB (B) (n=14) dos grupos Controle e Frutose após 8 semanas de tratamento. Valores expressos como Média ± EPM. \*p<0,05 vs Controle.

*Avaliação da expressão gênica dos RNAm das vias lipogênica e inflamatória – qPCR*

A ingestão de frutose estimulou a expressão (Figura 5A) do SREBP-1c versus o grupo controle ( $p=0,0005$ ). Não houve diferença entre os grupos, na expressão do SREBP-2 ( $p=0,42$ ) (5A), do fator de transcrição NFkB e do gene para ACC (Figura 5B).



**Figura 4.** Expressão dos RNAm do proteína ligadora do elemento regulado por esteróis 1c (n=6) e proteína ligadora do elemento regulado por esteróis 2 (n=9) (A), Acetil-CoA Carboxilase (n=4) e NFkB (n=9) (B) dos grupos Controle e Frutose após 8 semanas de tratamento. Valores expressos como Unidades Arbitrárias (UA)  $\pm$  EPM. \* $p<0,05$  vs Controle.

## DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que mostra que o tratamento prolongado com solução oral de frutose, em ratos por 8 semanas, apresenta alterações nas vias lipogênicas e inflamatórias do hipotálamo, promovendo aumento nos teores da proteína acetil-Coa carboxilase (ACC) e do fator de transcrição NFkB (p65) e redução do teor da proteína AGS. Adicionalmente, observamos também aumento da expressão (mRNA) do fator de transcrição SREBP-1c no hipotálamo, fator este, responsável pela ativação de genes que codificam enzimas da via lipogênica.

Após absorção, a frutose presente na circulação portal é rápida e eficientemente extraída pelo fígado (mediada pelo GLUT5), sendo metabolizada em frutose-1-fosfato (P) pela enzima frutoquinase (Samuel, 2011). A frutose-1-P pode depois ser convertida em várias trioses-P, nomeadamente, gliceraldeído, dihidroxiacetona-P e gliceraldeído-3-P, gerando rapidamente produtos que são substratos para a lipogênese *de novo* (Mayes, 1993). Adicionalmente, o aumento de frutose inibe a oxidação lipídica hepática, favorecendo assim a reesterificação dos ácidos graxos com o glicerol para formar TAG, e a síntese de VLDL ricas em TAG (VLDL-TAG) que são liberadas para a corrente sanguínea podendo ocasionar triacilglicerolemia (Samuel, 2011). No presente estudo encontramos também triacilglicerolemia no grupo de animais que receberam solução oral de frutose em comparação com o controle. Este resultado pode constituir indício da existência da ocorrência de aumento da ativação da lipogênese hepática, em decorrência da elevada ingestão de frutose no presente estudo. Além disso, foi previamente relatado por Janevski e cols. (2012) que a substituição na dieta de glicose para frutose ocasionou alterações hepáticas na ACC, AGS e SREBP-1c, porém sem acréscimos na massa corporal. Assim, é possível considerar que o excesso de acetil-CoA proveniente do metabolismo de frutose possa estimular as enzimas ACC e AGS em tecidos lipogênicos, como o fígado, porém, sua ação no SNC sobre essas enzimas ainda não está totalmente elucidada.

Um dos poucos estudos existentes sobre os efeitos da frutose no hipotálamo demonstraram que a infusão intracerebroventricular de frutose foi capaz de diminuir a razão AMP/ATP celular, a fosforilação e inativação da ACC, com consequente aumento da ACC fosforilada, levando à diminuição dos teores de malonil-CoA e aumento da expressão (mRNA) de neuropeptídeos orexígenos e portanto, aumento da ingestão alimentar (Cha e cols. 2008) Estes resultados foram importantes porque mostraram,



pela primeira vez, que a frutose é capaz de alterar o metabolismo lipídico e a ativação da acetil-CoA carboxilase no sistema nervoso central, similarmente como ocorre em tecidos periféricos. Nossos resultados também corroboram com esses dados, considerando que a ingestão de frutose aumentou o teor da enzima ACC, porém não observamos aumento significativo da expressão de seu RNAm em relação ao grupo controle. É provável que o aumento da quantidade da ACC observado em nosso estudo no hipotálamo seja representado por alterações pós-traducionais. No entanto, investigação complementar da quantificação fosforilada/desfosforilada da ACC faz-se necessário em futuros estudos para comprovar essa hipótese.

A AGS foi relacionada com a ingestão alimentar a partir do estudo de Loftus e cols. (2000), no qual infundiram C75, um inibidor de AGS, que levou à redução da ingestão alimentar e diminuição da massa corporal. Este efeito foi atribuído ao fato de que a inibição de AGS provoca acúmulo de malonil-CoA no hipotálamo, sinalizando saciedade e aumento na expressão de efetores anorexígenos. No estudo de Cha e cols. (2008) a infusão de frutose levou à diminuição de malonil-CoA, porém, os teores de AGS não foram avaliados.

Durante o tratamento o grupo frutose regulou a ingestão de energia, consumindo menos ração que o controle e compensando com a suplementação de frutose em solução, ainda que sem alterar a ingestão de líquidos. Estes dados sugerem que ou a energia proveniente da frutose ou a frutose *per se* promove saciedade, visto que não foi observado compulsão alimentar e nem hídrica. Adicionalmente a frutose parece regular a ingestão alimentar. Reforçando esse estímulo, o grupo frutose apresentou maior expressão do RNAm para a SREBP-1c, que está relacionado aos primeiros passos da lipogênese (Eberlé e cols., 2004; Horton, 2002) e isso pode significar que a frutose participa da regulação transcricional no SNC como age em tecidos periféricos.

No presente estudo, avaliamos a expressão dos RNAm para duas isoformas 1c e 2 do *sterol-element regulatory binding protein*. O grupo frutose apresentou aumento na expressão de SREBP-1c sem alteração na expressão de SREBP-2. Além disso, o teor de ACC foi maior no grupo frutose, evidenciando ação do fator de transcrição SREBP 1c sobre os passos iniciais da via lipogênica. Foi demonstrado em camundongos *knockout* para SREBP-1c, aumento nos níveis de SREBP-2, sugerindo possível efeito compensatório da isoforma 2 para a isoforma 1c (Horton e cols., 2002; Shimano e cols., 1997).

Suzuki e cols. (2010) mostraram que camundongos com diabetes mellitus apresentaram prejuízos no metabolismo de colesterol no hipotálamo, com diminuição na expressão de SREBP-2 e sinalização sináptica. Além disso, a infusão intracerebroventricular de insulina reverteu a supressão de SREBP-2 promovida pelo diabetes, o que sugere influência do estado nutricional e circulação de hormônios sobre a expressão de SREBP-2. No presente estudo, os animais apresentaram alterações no metabolismo de glicose, porém não mostraram mudanças na expressão de SREBP-2, tal fato nos leva a supor que o SNC é resistente a efeitos provocados pela frutose na glicemia no que condiz ao metabolismo de colesterol.

O acúmulo de lipídios em diversos tecidos, como no tecido adiposo, promove resposta inflamatória de graus variados. Investigamos se a frutose como fator altamente lipogênico é capaz de alterar passos iniciais da resposta inflamatória hipotalâmica. A ingestão de frutose por 8 semanas aumentou o teor de NFkB-p65, porém a expressão do RNAm não sofreu modificação, permitindo considerar que a ação da frutose ocorre pós-transcrição e tradução da proteína. Dados de Li e cols. (2015a) corroboram com o aumento no teor de NFkB encontrado no grupo frutose, pois demonstraram que o consumo de frutose, também por 8 semanas, levou ao aumento na circulação de citocinas inflamatórias e no teor de NFkB e TLR4 no hipotálamo de ratos, mostrando que a frutose possui potente efeito pró-inflamatório em tecidos periféricos e no SNC. Além disso, Li e cols. (2015b) sugerem que além do efeito *per se* da frutose sobre a via inflamatória, parece haver sinergia entre a ativação do fator de transcrição SREBP-1c com estímulo da via inflamatória mediada pelo NFkB.

A alteração inflamatória aqui observada pode ter implicações na regulação da ingestão alimentar, visto que a inflamação hipotalâmica pode estar envolvida com o desequilíbrio na secreção de efetores anorexígenos e orexígenos, podendo levar ao favorecimento da liberação de AgRP e NPY em detrimento da liberação de POMC e CART, além de desencadear diversas alterações nos tecidos periféricos como disfunção das ilhotas pancreáticas e alterações no metabolismo periférico de glicose (Valdearcos e cols., 2015). Entretanto, mesmo com alterações no teor de NFkB, o grupo frutose manteve normal a regulação da ingestão de ração, mostrando que os efeitos sobre o controle da ingestão alimentar são posteriores à exposição ao carboidrato.

Tais resultados apontam a relevância de dois aspectos, o efeito da frutose propriamente dito e suas consequências; e a quantidade de frutose consumida para que

este efeito seja evidenciado. Estabelecendo paralelo com humanos, entre a estimativa atual do consumo de frutose e o que foi observado neste estudo com ratos, verifica-se que os ratos tiveram uma ingestão na ordem de 15-20g/dia, enquanto em humanos, no Brasil, essa estimativa é de 10g/dia (IBGE, 2011). Esses dados comparados podem evidenciar que a população apresenta consumo dose-efeito compatível e que investigações fisiológicas devem ser realizadas em populações que apresentam consumo elevado de frutose.

Esses dados nos fazem refletir sobre a quantidade de frutose ingerida por humanos e os seus possíveis efeitos no SNC, e evidenciamos a necessidade emergente de investigações em humanos. Dessa forma, concluímos que a frutose ao provocar alterações na expressão gênica e de proteínas hipotalâmicas, foi capaz de estimular passos iniciais da via lipogênica no hipotálamo de forma semelhante aos tecidos periféricos. Como tais alterações surgem antes de efetivas modificações na ingestão alimentar sugere-se que a frutose tem ação hipotalâmica na regulação da ingestão alimentar.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Sayed A, Binnert C, Lê KA e cols. A high-fructose diet impairs basal and stress-mediated lipid metabolism in healthy male subjects. **Br J Nutr.** 2008 Aug;100(2):393-9.
- Barbosa CR, Albuquerque EM, Faria EC e cols. Opposite lipemic response of Wistar rats and C57BL/6 mice to dietary glucose or fructose supplementation. **Braz J Med Biol Res.** 2007 40(3):323-31.
- Barros CM, Lessa RQ, Grechi MP e cols. Substitution of drinking water by fructose solution induces hyperinsulinemia and hyperglycemia in hamsters. **Clinics.** 2007 62(3):327-34.
- Bremer AA, Stanhope KL, Graham JL e cols. Fructose-fed rhesus monkeys: a nonhuman primate model of insulin resistance, metabolic syndrome, and type 2 diabetes. **Clin Transl Sci.** 2011 4(4):243-52.
- Cancello R, Clément K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. **BJOG.** 2006 Oct;113(10):1141-7.
- Castro MC, Massa ML, Arbeláez LG e cols. Fructose-induced inflammation, insulin resistance and oxidative stress: A liver pathological triad effectively disrupted by lipoic acid. **Life Sci.** 2015 Sep 15;137:1-6.
- Cha SH, Wolfgang MJ, Tokutakeb Y e cols. Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl-CoA and food intake. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2008 Nov 4;105(44):16871-5.
- Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC e cols. Unsaturated Fatty Acids Revert Diet-Induced Hypothalamic Inflammation in Obesity. **PLoS One.** 2012; 7(1): e30571.
- Eberlé D, Hegarty B, Bossard P e cols. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. **Biochimie.** 2004 Nov;86(11):839-48.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. - Rio de Janeiro: **IBGE**, 2011.
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **J Clin Invest.** 2002 May;109(9):1125-31.
- Horton JD. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. **Biochem Soc Trans.** 2002 Nov;30(Pt 6):1091-5.
- Huang BW, Chiang MT, Yao HT e cols. The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. **Diabetes Obes Metab.** 2004 Mar;6(2):120-6.
- Janevski M, Ratnayake S, Siljanovski S e cols. Fructose containing sugars modulate mRNA of lipogenic genes ACC and FAS and protein levels of transcription factors ChREBP and SREBP1c with no effect on body weight or liver fat. **Food Funct.** 2012 Feb;3(2):141-9.
- Johnson RJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG e cols. Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity. **Diabetes.** 2013 Oct;62(10):3307-15.

- Koo HY, Wallig MA, Chung BH e cols. Dietary fructose induces a wide range of genes with distinct shift in carbohydrate and lipid metabolism in fed and fasted rat liver. **Biochim Biophys Acta**. 2008 May;1782(5):341-8.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
- Lane MD, Cha SH. Effect of glucose and fructose on food intake via malonyl-CoA signaling in the brain. **Biochem Biophys Res Commun**. 2009 Apr 24;382(1):1-5.
- Lee HS, Lim WC, Lee SJ e cols. Antiobesity Effect of Garlic Extract Fermented by *Lactobacillus plantarum* BL2 in Diet-Induced Obese Mice. **J Med Food**. 2016 Sep;19(9):823-9.
- Li JM, Ge CX, Xu MX e cols. Betaine recovers hypothalamic neural injury by inhibiting astrogliosis and inflammation in fructose-fed rats. **Mol Nutr Food Res**. 2015a Feb;59(2):189-202.
- Li X, Huang W, Gu J e cols. SREBP-1c overactivates ROS-mediated hepatic NF- $\kappa$ B inflammatory pathway in dairy cows with fatty liver. **Cell Signal**. 2015b Oct;27(10):2099-109.
- Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL e cols. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. **Science**. 2000 Jun 30;288(5475):2379-81.
- Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **J Clin Invest**. 2011 Jun;121(6):2111-7.
- Mayes PA. Intermediary metabolism of fructose. **Am J Clin Nutr**. 1993 Nov;58(5 Suppl):754S-765S.
- Milanski M, Arruda AP, Coope A e cols. Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver. **Diabetes**. 2012 Jun;61(6):1455-62.
- Newens KJ, Walton J. A review of sugar consumption from nationally representative dietary surveys across the world. **J Hum Nutr Diet**. 2016 Apr;29(2):225-40.
- Niswender KD, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. **Trends Endocrinol Metab**. 2004 Oct;15(8):362-9.
- Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ e cols. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**. 2011 Feb;11(2):85-97.
- Samuel VT. Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance. **Trends Endocrinol Metab**. 2011 Feb;22(2):60-5.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr e cols. Central nervous system control of food intake. **Nature** 2000 404(6):661-71.
- Sharawy MH, El-Awady MS, Megahed N e cols. The ergogenic supplement  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) attenuates insulin resistance through suppressing GLUT-2 in rat liver. **Can J Physiol Pharmacol**. 2016 May;94(5):488-97

Shimano H, Shimomura I, Hammer RE e cols. Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. **J Clin Invest.** 1997 Oct 15;100(8):2115-24.

Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M e cols. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. **J Biol Chem.** 1999 Dec 10;274(50):35832-9.

Shu HJ, Isenberg K, Cormier RJ e cols. Expression of fructose sensitive glucose transporter in the brains of fructose-fed rats. **Neuroscience.** 2006 Jul 7;140(3):889-95.

Suzuki R, Lee K, Jing E e cols. Diabetes and insulin in regulation of brain cholesterol metabolism. **Cell Metab.** 2010 Dec 1;12(6):567-79.

Thaler JP, Yi CX, Schur EA e cols. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **J Clin Invest.** 2012 Jan;122(1):153-62.

Valdearcos M, Xu AW, Koliwad SK. Hypothalamic inflammation in the control of metabolic function. **Annu Rev Physiol.** 2015;77:131-60.

Xu H, Barnes GT, Yang Q e cols. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest.** 2003 Dec;112(12):1821-30.

Zhang X, Zhang G, Zhang H e cols. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. **Cell.** 2008 Oct 3;135(1):61-73.

Zigman JM, Elmquist JK. Minireview: From anorexia to obesity--the yin and yang of body weight control. **Endocrinology.** 2003 Sep;144(9):3749-56.

## 6. CONCLUSÃO

A ingestão de frutose durante 8 semanas por ratos Wistar promoveu:

- Regulação na ingestão alimentar, uma vez que os animais diminuíram o consumo de ração durante todo o tratamento;
- Alterações na homeostase glicêmica e aumento na triacilglicerolemia;
- Estímulo à lipogênese no tecido hipotalâmico, pelo menos nos passos iniciais da via, com aumento no teor de ACC e expressão no SREBP-1c;
- Estímulo ao NFkB, o que sugere ação pró-inflamatória.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ameer F, Scandiuzzi L, Hasnain S e cols. De novo lipogenesis in health and disease. **Metabolism**. 2014 Jul;63(7):895-902
- Apovian CM. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. **Am J Manag Care**. 2016 Jun;22(7 Suppl):s176-85.
- Athyros VG, Tziomalos K, Karagiannis A e cols. Should adipokines be considered in the choice of the treatment of obesity-related health problems? **Curr Drug Targets**. 2010 Jan;11(1):122-35.
- Barreiros RC, Bossolan G, Trindade CEP. Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. **Rev. Nutr**. 2005 18(3):377-389.
- Botezelli JD, Cambri LT, Ghezzi AC e cols. Fructose-rich diet leads to reduced aerobic capacity and to liver injury in rats. **Lipids Health Dis**. 2012 Jun 19;11:78.
- 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 Apr;79(4):537-43.
- Bray GA, Popkin BM. Calorie-sweetened beverages and fructose: what have we learned 10 years later. **Pediatr Obes**. 2013 Aug;8(4):242-8.
- Bray GA, Popkin BM. Dietary sugar and body weight: have we reached a crisis in the epidemic of obesity and diabetes?: health be damned! Pour on the sugar. **Diabetes Care**. 2014 Apr;37(4):950-6.
- Bremer AA, Stanhope KL, Graham JL e cols. Fructose-fed rhesus monkeys: a nonhuman primate model of insulin resistance, metabolic syndrome, and type 2 diabetes. **Clin Transl Sci**. 2011 4(4):243-52.
- Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. **Cell**. 1997 May 2;89(3):331-40.
- Castro MC, Massa ML, Arbeláez LG e cols. Fructose-induced inflammation, insulin resistance and oxidative stress: A liver pathological triad effectively disrupted by lipoic acid. **Life Sci**. 2015 Sep 15;137:1-6.
- Cha SH, Lane MD. Central lactate metabolism suppresses food intake via the hypothalamic AMP kinase/malonyl-CoA signaling pathway. **Biochem Biophys Res Commun**. 2009 Aug 14;386(1):212-6.
- Cha SH, Wolfgang MJ, Tokutakeb Y e cols. Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl-CoA and food intake. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2008 Nov 4;105(44):16871-5.
- Collino M. High dietary fructose intake: Sweet or bitter life? **World J Diabetes**. 2011 Jun 15;2(6):77-81.
- Douard V, Ferraris RP. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2008 Aug;295(2):E227-37.
- Dowell P, Hu Z, Lane MD. Monitoring energy balance: metabolites of fatty acid synthesis as hypothalamic sensors. **Annu Rev Biochem**. 2005 74:515-34.



Funari VA, Herrera VL, Freeman D e cols. Genes required for fructose metabolism are expressed in Purkinje cells in the cerebellum. **Brain Res Mol Brain Res**. 2005 Dec 14;142(2):115-22.

Guri AJ, Bassaganya-Riera J. Systemic effects of white adipose tissue dysregulation and obesity-related inflammation. **Obesity (Silver Spring)**. 2011 Apr;19(4):689-700.

Havel PJ. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. **Nutr Rev**. 2005 May;63(5):133-57.

Heinz F, Lamprecht W, Kirsch J. Enzymes of fructose metabolism in human liver. **J Clin Invest**. 1968 Aug;47(8):1826-32.

Hellerstein MK. De novo lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects. **Eur J Clin Nutr**. 1999 Apr;53 Suppl 1:S53-65.

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **J Clin Invest**. 2002 May;109(9):1125-31.

Horton JD, Shimomura I. Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis. **Curr Opin Lipidol**. 1999 Apr;10(2):143-50.

Hu Z, Cha SH, Chohnan S e cols. Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2003 Oct 28;100(22):12624-9.

Hu Z, Dai Y, Prentki M e cols. A role for hypothalamic malonyl-CoA in the control of food intake. **J Biol Chem**. 2005 Dec 2;280(48):39681-3.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. - Rio de Janeiro: **IBGE**, 2011.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Lane MD, Cha SH. Effect of glucose and fructose on food intake via malonyl-CoA signaling in the brain. **Biochem Biophys Res Commun**. 2009 Apr 24;382(1):1-5.

Lê KA, Tappy L. Metabolic effects of fructose. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. 2006 Jul;9(4):469-75.

Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL e cols. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. **Science**. 2000 Jun 30;288(5475):2379-81.

Lopaschuk GD, Ussher JR, Jaswal JS. Targeting intermediary metabolism in the hypothalamus as a mechanism to regulate appetite. **Pharmacol Rev**. 2010 Jun;62(2):237-64.

López M, Vidal-Puig A. Brain lipogenesis and regulation of energy metabolism. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. 2008 Jul;11(4):483-90.

Malik VS, Popkin BM, Bray GA e cols. Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis. **Diabetes Care**. 2010 Nov;33(11):2477-83.

- Marriott BP, Cole N, Lee E. National estimates of dietary fructose intake increased from 1977 to 2004 in the United States. **J Nutr.** 2009 Jun;139(6):1228S-1235S.
- Mastrocola R, Nigro D, Chiazza F e cols. Fructose-derived advanced glycation end-products drive lipogenesis and skeletal muscle reprogramming via SREBP-1c dysregulation in mice. **Free Radic Biol Med.** 2016 Feb;91:224-35.
- Mayes PA. Intermediary metabolism of fructose. **Am J Clin Nutr.** 1993 Nov;58(5 Suppl):754S-765S.
- McDevitt RM, Bott SJ, Harding M e cols. De novo lipogenesis during controlled overfeeding with sucrose or glucose in lean and obese women. **Am J Clin Nutr.** 2001 Dec;74(6):737-46.
- McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. **Eur J Biochem.** 1997 Feb 15;244(1):1-14.
- Miller CC, Martin RJ, Whitney ML e cols. Intracerebroventricular injection of fructose stimulates feeding in rats. **Nutr Neurosci.** 2002 Oct;5(5):359-62.
- Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T e cols. Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPARalpha. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 2002 May;282(5):E1180-90.
- Nagata R, Nishio Y, Sekine O e cols. Single nucleotide polymorphism (-468 Gly to A) at the promoter region of SREBP-1c associates with genetic defect of fructose-induced hepatic lipogenesis [corrected]. **J Biol Chem.** 2004 Jul 9;279(28):29031-42.
- Niswender KD, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. **Trends Endocrinol Metab.** 2004 Oct;15(8):362-9.
- Ogden CL, Carroll MD, Lawman HG e cols. Trends in Obesity Prevalence Among Children and Adolescents in the United States, 1988-1994 Through 2013-2014. **JAMA.** 2016 Jun 7;315(21):2292-9.
- Okamoto K, Kakuma T, Fukuchi S e cols. Sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1 expression in brain is affected by age but not by hormones or metabolic changes. **Brain Res.** 2006 Apr 7;1081(1):19-27.
- Osborne TF. Transcriptional control mechanisms in the regulation of cholesterol balance. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr.** 1995;5(3-4):317-35.
- Pattaranit R, van den Berg HA. Mathematical models of energy homeostasis. **J R Soc Interface.** 2008 Oct 6;5(27):1119-35.
- Popkin BM e Nielsen SJ. The sweetening of the world's diet. **Obes Res.** 2003 Nov;11(11):1325-32.
- Rizkalla SW. Health implications of fructose consumption: A review of recent data. **Nutr Metab (Lond).** 2010 Nov 4;7:82.
- Ruderman NB, Saha AK, Kraegen EW. Minireview: malonyl CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity. **Endocrinology.** 2003 Dec;144(12):5166-71.

- Rumessen JJ, Gudmand-Høyer E. Absorption capacity of fructose in healthy adults. Comparison with sucrose and its constituent monosaccharides. **Gut**. 1986 Oct;27(10):1161-8.
- Ruscica M, Ferri N, Macchi C e cols. Liver fat accumulation is associated with circulating PCSK9. **Ann Med**. 2016 Aug;48(5):384-91.
- Samuel VT. Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance. **Trends Endocrinol Metab**. 2011 Feb;22(2):60-5.
- Schmidt AM. The growing problem of obesity: mechanisms, consequences, and therapeutic approaches. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2015 Jun;35(6):e19-23.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr e cols. Central nervous system control of food intake. **Nature** 2000 404(6):661-71.
- Shu HJ, Isenberg K, Cormier RJ e cols. Expression of fructose sensitive glucose transporter in the brains of fructose-fed rats. **Neuroscience**. 2006 Jul 7;140(3):889-95.
- Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C e cols. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. **J Clin Endocrinol Metab**. 2007 Mar;92(3):1023-33.
- Stapleton D, Mitchelhill KI, Gao G e cols. Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. **J Biol Chem**. 1996 Jan 12;271(2):611-4.
- Swinburn BA, Millar L, Utter J e cols. The Pacific Obesity Prevention in Communities project: project overview and methods. **Obes Rev**. 2011 Nov;12 Suppl 2:3-11.
- Thurston JH, Levy CA, Warren SK e cols. Permeability of the blood-brain barrier to fructose and the anaerobic use of fructose in the brains of young mice. **J Neurochem**. 1972 Jul;19(7):1685-96.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1979 Sep;76(9):4350-4.
- Valdearcos M, Xu AW, Koliwad SK. Hypothalamic inflammation in the control of metabolic function. **Annu Rev Physiol**. 2015;77:131-60.
- Vari R, Scazzocchio B, D'Amore A e cols. Gender-related differences in lifestyle may affect health status. **Ann Ist Super Sanita**. 2016 Apr-Jun;52(2):158-66.
- Vázquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. **Arch Med Res**. 2008 Nov;39(8):715-28.
- Wolfgang MJ, Lane MD. Hypothalamic malonyl-coenzyme A and the control of energy balance. **Mol Endocrinol**. 2008 Sep;22(9):2012-20.
- Wolfgang MJ, Lane MD. The role of hypothalamic malonyl-CoA in energy homeostasis. **J Biol Chem**. 2006 Dec 8;281(49):37265-9.
- Wright SM e Aronne LJ. Causes of obesity. **Abdom Imaging**. 2012 Oct;37(5):730-2.
- You M, Matsumoto M, Pacold CM e cols. The role of AMP-activated protein kinase in the action of ethanol in the liver. **Gastroenterology**. 2004 Dec;127(6):1798-808.

Zhang X, Zhang G, Zhang H e cols. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. **Cell**. 2008 Oct 3;135(1):61-73.

Zhu H, Fan C, Xu F e cols. Dietary fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids and alpha-linolenic acid differently affect brain accretion of docosahexaenoic acid and expression of desaturases and sterol regulatory element-binding protein 1 in mice. **J Nutr Biochem**. 2010 Oct;21(10):954-60.

Zigman JM, Elmquist JK. Minireview: From anorexia to obesity--the yin and yang of body weight control. **Endocrinology**. 2003 Sep;144(9):3749-56.