



**UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**ANDERSON CARGNIN-CARVALHO**

**EFEITOS DO CONSUMO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FRUTOSE**  
**SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE CAMUNDONGOS**

Tubarão

2018

**ANDERSON CARGNIN-CARVALHO**

**EFEITOS DO CONSUMO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FRUTOSE  
SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE CAMUNDONGOS**

**LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
da Saúde para obtenção do título de  
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Gislaine Tezza Rezin, Dra.

Tubarão

2018

Cargnin-Carvalho, Anderson, 1982-

C27 Efeitos do consumo de diferentes concentrações de frutose sobre parâmetros bioquímicos de camundongos / Anderson Cargnin-Carvalho ; -- 2019.  
67 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora : Profa. Dra. Gislaine Tezza Rezin.  
Dissertação (mestrado)–Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2019.  
Inclui bibliografias.

1. Frutose. 2. Hipotálamo. 3. Gordura. 4. Stress oxidativo.  
I. Rezin, Gislaine Tezza. II. Universidade do Sul de Santa Catarina – Mestrado em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD (21. ed.) 572.565

Ficha catalográfica elaborada por Francielli Lourenço CRB 14/1435



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO**

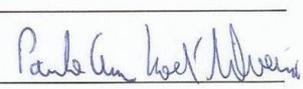
Título da Dissertação

Efeitos do consumo de diferentes concentrações de frutose sobre parâmetros bioquímicos de camundongos

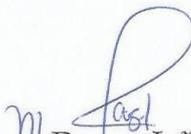
**ANDERSON CARGNIN CARVALHO**  
AUTOR

Aprovado pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 26 de fevereiro de 2018.

Doutora Gislaine Tezza Rezin (orientador) \_\_\_\_\_ 

Doutor Paulo Cesar Lock Silveira (Avaliador externo - Unesc) \_\_\_\_\_ 

Doutora Josiane Somariva Prophiro (avaliador interno) \_\_\_\_\_ 

  
*Professor Doutor Jefferson Traebert*

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

## **AGRADECIMENTOS**

Diversas pessoas e uma instituição, contribuíram para a construção dessa dissertação, portanto, tenho que deixar explícito meus sinceros agradecimentos.

Agradeço à minha orientadora Gislaine Tezza Rezin, por toda atenção prestada ao longo da construção desse trabalho, mas principalmente, pelo surgimento de uma grande amizade.

À Unisul por incentivar e permitir o aperfeiçoamento profissional de seus colaboradores.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), pelos ensinamentos e demais contribuições.

Aos alunos de iniciação científica e colegas de mestrado/doutorado, que colaboraram ativamente, para o desenvolvimento do experimento.

Em especial a minha família, mãe que meu deu suporte nos momentos de cuidado e zelo aos meus filhos, minha esposa Daniela que conseguiu manter-se em equilíbrio nas minhas diversas e constantes ausências. E aos meus filhos (Vicente e Analu), que sempre me motivam e mesmo sem intenção, me confortavam nos momentos mais difíceis.

Meu muito obrigado a todos!

*“Frequentemente é necessário ter mais coragem para ousar fazer certo do que temer fazer errado.” (Abraham Lincoln).*

## RESUMO

**Introdução:** A urbanização vem ditando inadequações alimentares, com o consumo excessivo de bebidas adoçadas e grande disponibilidade de frutose. Das diferentes vias metabólicas envolvidas no seu consumo excessivo, o envolvimento de regiões cerebrais vem ganhando pertinência científica. Além disso, se observa um potencial da frutose em alterações bioquímicas e danos oxidativos. Nesse sentido, a avaliação de alterações bioquímicas na região do hipotálamo e na gordura epididimal, frente ao consumo de frutose, pode trazer um melhor entendimento da evolução de algumas doenças com envolvimento alimentar.

**Objetivo:** Avaliar os efeitos do consumo de diferentes concentrações de frutose sobre parâmetros bioquímicos de camundongos.

**Métodos:** O experimento se baseou na ingestão hídrica (*ad libitum*) com diferentes concentrações de frutose. Camundongos Swiss machos foram randomizados em quatro grupos, com ingestão exclusiva de: água (controle H<sub>2</sub>O), água + 5% de frutose, água + 10% de frutose e água + 20% de frutose. A ração foi comum a todos os grupos. Foram avaliados o consumo alimentar e o peso corporal, durante o experimento. Após 11 semanas os animais foram eutanasiados, para remoção e análise do tecido adiposo visceral e do hipotálamo.

**Resultados:** Não foram observadas diferenças no ganho de peso corporal, mas aumento da gordura epididimal e visceral, nos grupos frutose 10 e 20%. Houve uma tendência ao aumento do dano oxidativo a lipídeos na gordura epididimal, nos grupos frutose 10 e 20%, com alteração dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial. No hipotálamo os grupos frutose 10 e 20%, apresentaram dano oxidativo, mas sem alteração da cadeia respiratória mitocondrial. Os mesmos grupos também apresentaram uma diminuição do consumo sólido e maior ingestão hídrica. O que contribuiu para o aumento gradativo do total de frutose consumida.

**Conclusão:** Conclui-se que, o consumo das maiores quantidades de frutose, alteraram a deposição da gordura visceral, foram suficientes para alterações mitocondriais na gordura epididimal e aumentaram o dano oxidativo no hipotálamo.

**Descritores:** Frutose. Hipotálamo. Gordura. Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

**Introduction:** Urbanization has been dictating inadequate eating habits, with excessive consumption of sweetened drinks and high availability of fructose. From the different metabolic pathways involved in its excessive consumption, the involvement of brain regions has gained scientific relevance. In addition, a potential for fructose in biochemical changes and oxidative damage is observed. In this sense, the evaluation of biochemical alterations in the hypothalamus region and epididymal fat, in view of fructose consumption, may bring a better understanding of the evolution of some diseases with food involvement.

**Objective:** To evaluate the effects of consumption of different fructose concentrations on biochemical parameters of mice.

**Methods:** The experiment was based on water intake (ad libitum) with different fructose concentrations. Male Swiss mice were randomized into four groups, with exclusive intake of: water (H<sub>2</sub>O control), water + 5% fructose, water + 10% fructose and water + 20% fructose. The ration was common to all groups. Dietary intake and body weight were evaluated during the experiment. After 11 weeks the animals were euthanized for removal and analysis of visceral adipose tissue and hypothalamus.

**Results:** There were no differences in body weight gain, but increased epididymal and visceral fat in fructose groups 10 and 20%. There was a tendency for increased oxidative damage to lipids in epididymal fat in fructose groups 10 and 20%, with alteration of mitochondrial respiratory chain complexes. In the hypothalamus fructose groups 10 and 20% presented oxidative damage, but without alteration of the mitochondrial respiratory chain. The same groups also showed a decrease in solid consumption and higher water intake. This contributed to the gradual increase in total fructose consumed.

**Conclusion:** It was concluded that the consumption of higher amounts of fructose altered visceral fat deposition, were sufficient for mitochondrial changes in epididymal fat and increased oxidative damage in the hypothalamus.

**Keywords:** Fructose, hypothalamus, fat, oxidative stress.

## LISTAS

### Lista de abreviaturas

ACC – acetil-CoA carboxilase

Acetil-CoA– acetil coenzima A

ADP – adenosina difosfato

AMP – adenosina monofosfato

AMPK – adenosina monofosfato quinase

ATP – adenosina trifosfato

CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono

CAT – catalase

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DNA – ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)

EHNA – esteatose hepática não alcoólica

ELIZA – do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EROs – espécies reativas de oxigênio

FAD – flavina adenina dinucleotídeo

FADH<sub>2</sub> – flavina adenina dinucleotídeo reduzida

FK – frutokinase

GL – gliceraldeído

GLP-1 – peptídeo semelhante ao glucagon-1 (do inglês *Glucagon like peptide*)

GLUT 2 – transportador de glicose 2

GLUT 5 – transportador de glicose 5

GLUT 8 – transportador de glicose 8

GPx – glutationa peroxidase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

IL-6 – interleucina-6

IL-10 – interleucina-10

KHK – cetoheksokinase

MDA – malondialdeído

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NF-κB – fator nuclear - κB (do inglês *nuclear factor-kappaB*)

NO – óxido nítrico  
 O<sub>2</sub> – oxigênio  
 O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – ânion superóxido  
 OH<sup>•</sup> – radical hidroxila  
 OMS – Organização Mundial da Saúde  
 ONOO – radical peroxinitrito  
 Pi – fosfato inorgânico  
 POF – pesquisas de orçamentos familiares  
 SNC – sistema nervoso central  
 SOD – superóxido dismutase  
 TBARS – substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*)  
 TNF-α – fator de necrose tumoral alfa (do inglês *Tumor necrosis factor alpha*)  
 TRL4 – receptores de Toll-like 4 (do inglês Toll-like receptor 4)  
 TLRs – receptores Toll-like (do inglês *Toll-like receptor*)  
 UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina  
 UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina  
 XMRF – xarope de milho rico em frutose

#### Lista de figuras

Figura 1 – Mecanismo de absorção de frutose e possíveis respostas frente ao seu consumo excessivo .....	14
Figura 2 – Metabolismo da frutose .....	15
Figura 3 – Modelo de efeitos do consumo excessivo de frutose e o desenvolvimento de algumas doenças .....	16
Figura 4 – Modelo de alterações em órgãos específicos desencadeadas pelo consumo de frutose .....	18
Figura 5 – Efeitos das EROS no desenvolvimentos de lesão celular, com envolvimento das alterações ao DNA, as proteínas e aos lipídeos .....	24
Figura 6 – Bioenergética celular .....	26
Figura 7 – Complexos da cadeia respiratória mitocondrial e geração de EROs .....	27
Figura 8 – Desenho experimental .....	32
Figura 9 – Acompanhamento semanal do ganho de peso corporal de camundongos,	

submetidos ao consumo de diferentes concentrações de frutose (0%, 5%, 10% e 20%).....	37
Figura 10 – Efeitos do consumo de diferentes concentrações de frutose no peso corporal de camundongos, no início e após 11 semanas de protocolo.....	38
Figura 11 – Efeitos do consumo de diferentes concentrações de frutose no peso da gordura visceral e suas frações (epididimal, retroperitoneal e mesentérica).....	39
Figura 12 – Efeitos do consumo de diferentes concentrações de frutose no dano oxidativo na gordura epididimal.....	41
Figura 13 – Efeitos do consumo de diferentes concentrações de frutose sobre a atividade das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) na gordura epididimal .....	42
Figura 14 – Efeitos do consumo de diferentes concentrações de frutose sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, na gordura epididimal.....	44
Figura 15 – Efeitos do consumo de diferentes concentrações de frutose no dano oxidativo no hipotálamo .....	46
Figura 16 – Efeitos do consumo de diferentes concentrações de frutose na atividade das enzimas antioxidantes (SOD e CAT), no hipotálamo .....	46
Figura 17 – Efeitos do consumo de diferentes concentrações de frutose sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial no hipotálamo .....	48
Figura 18 – Avaliação do consumo alimentar (sólido e líquido) de camundongos, submetidos a ingestão hídrica, com diferentes concentrações de frutose, e após período de 11 semanas .....	49
Figura 19 – Avaliação do consumo total de frutose por camundongos, submetidos a ingestão hídrica, com diferentes concentrações de frutose, e após período de 11 semanas .....	51

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	09
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO .....	10
1.1.1 Histórico e epidemiologia do consumo de frutose .....	10
1.1.2 Metabolismo da frutose .....	12
1.1.3 Doenças associadas ao consumo de frutose .....	16
1.1.4 Frutose e estresse oxidativo .....	21
1.1.5 Frutose: metabolismo energético e disfunção mitocondrial.....	25
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	29
2.1 OBJETIVO GERAL.....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>3 MÉTODOS</b> .....	30
3.1 TIPO DE ESTUDO .....	30
3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS .....	30
3.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	30
3.4 LOCAL DE REALIZAÇÃO .....	31
3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	31
3.5.1 Avaliação do consumo sólido e hidrico .....	32
3.5.2 Avaliação da gordura visceral.....	33
3.6 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS .....	33
3.6.1 Dano oxidativo a lipídeos e a proteínas.....	33
3.6.2 Atividade das enzimas antioxidantes .....	34
3.6.3 Metabolismo energético .....	34
3.6.3.1 Atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial ...	34
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	35
3.8 ASPECTOS ÉTICOS.....	35
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	53
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	55

## 1. INTRODUÇÃO

No decorrer das últimas décadas, um fenômeno denominado de transição nutricional vem ditando novos comportamentos dietéticos, em diversas populações do mundo<sup>1</sup>. Fatores epidemiológicos e conseqüentemente, comportamentais, desencadearam padrões de inatividade física ou sedentarismo, vinculados ao consumo excessivo de açúcares e de alimentos industrializados<sup>2</sup>. Inserido em um contexto de urbanização, observa-se também uma diminuição no consumo de água pura e um aumento substancial no consumo de bebidas adoçadas, com elevado teor de processamento industrial<sup>3</sup>.

Ao ressaltar o aumento do consumo de açúcar e de bebidas adoçadas artificialmente, é possível a associação de uma maior ingestão de frutose, que além de parte constituinte do açúcar, também está presente nas frutas, no mel e como sub produtos, comumente utilizados na fabricação de bebidas industrializadas<sup>4</sup>. Contudo, essa maior ingestão de frutose, vem sendo descrita como potencial desencadeadora de diferentes alterações bioquímicas, intrínsecas ao desenvolvimento da obesidade, da resistência insulínica, da lipogênese hepática e de doenças cardiovasculares<sup>5-7</sup>.

Diferente de outros carboidratos, o ponto inicial dos efeitos metabólicos da elevada ingestão de frutose está diretamente relacionado com o seu potencial de lipogênese no fígado e no desenvolvimento de esteatose hepática<sup>8</sup>. Essa constitui um processo de acúmulo de gordura nos hepatócitos, com progressão para um espectro de doenças que podem se correlacionar diretamente ao órgão, ou incluir alterações diretas no metabolismo e distribuição dos lipídeos<sup>9</sup>. O aumento do consumo de frutose, além do fornecimento energético, pode se refletir em uma maior disponibilidade de ácidos graxos, responsáveis pelo acúmulo e aumento do tecido adiposo visceral<sup>10</sup>. O que pode ser atribuído ao acometimento de alterações mitocondriais e inflamatórias do próprio tecido, ou sistêmicas, com envolvimento de adipocinas<sup>11</sup>.

Além de alterações no metabolismo das gorduras, se evidencia a frutose como um gatilho para o desencadeamento de disfunção celular, descrita a partir da diminuição ou alteração da fisiologia mitocondrial, e pelo surgimento de danos oxidativos<sup>12,13</sup>. Reforçando o indício do potencial oxidativo do próprio nutriente,

Jaiswal e colaboradores<sup>14</sup>, utilizando cultura de células, demonstraram que a elevada exposição de frutose, aumentou o estímulo mitocondrial para a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), além de significativas alterações nucleares, que acabaram por induzir o quadro de apoptose.

O envolvimento de alterações do sistema nervoso central (SNC), consequentes ao consumo de frutose, se concretiza a partir da identificação de seu metabolismo na região cerebral<sup>15,16</sup>. Já estão declarados na literatura, achados de neuroinflamação no hipotálamo<sup>17</sup> e de diferentes alterações bioquímicas, responsáveis pelo comprometimento dos mecanismos de saciedade<sup>18-20</sup>. Contudo, a resultante de parâmetros de estresse oxidativo no hipotálamo, frente ao consumo de diferentes quantidades de frutose, ainda permanece desconhecida.

Considerando a necessidade de novos esclarecimentos, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação de parâmetros bioquímicos na gordura epididimal e no hipotálamo, assim como dados do comportamento alimentar e do ganho de peso de camundongos, expostos ao consumo de diferentes concentrações de frutose. A descrição dos resultados poderá servir para uma melhor compreensão das consequências do consumo de frutose e o desenvolvimento de alterações bioquímicas, interligadas ao funcionamento do hipotálamo. Além disso, contribuir para a renovação e inclusão de novas diretrizes, para o consumo de frutose. Amplificando os possíveis prejuízos de seu consumo aumentado, principalmente em doenças como a síndrome metabólica e obesidade.

## 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1.1 Histórico e epidemiologia do consumo de frutose

Os variados formatos dietéticos, que compõe hábitos alimentares, disponibilizam diferentes tipos de carboidratos. Estes por sua vez, com diferentes classificações, repostas fisiológicas e possíveis participações no desenvolvimento de doenças<sup>21</sup>. De acordo com a quantidade de resíduos monoméricos, os carboidratos são conceituados em monossacarídeos (glicose, galactose e frutose), dissacarídeos (sacarose e lactose) e oligossacarídeos (fruto-oligossacarídeos de vegetais e malto-oligossacáridos do amido), estes previamente caracterizados como simples ou de baixo peso molecular. Já os polissacarídeos são definidos como tendo 10 ou mais

resíduos monoméricos (amido e amilopectina) e caracterizados como complexos ou de elevado peso molecular <sup>21</sup>.

Atualmente, em consequência da urbanização e principalmente dos fatores envolvidos na transição nutricional<sup>22</sup>, se amplifica o consumo de alimentos fontes de carboidratos simples e extensa participação do açúcar<sup>23</sup>. Além de elevada participação do total de calorias ingeridas atualmente, que acaba por favorecer o desenvolvimento de doenças como a obesidade, o consumo de açúcar também corresponde em paralelo, a um adicional dietético de frutose. Com uma representatividade média de 50% de sua composição<sup>24</sup>. Além disso, o consumo de frutose se torna ainda mais expressivo, quando acrescidos das variadas fontes dietéticas, podendo citar: as frutas, os vegetais, os produtos industrializados adicionados de xarope de milho rico em frutose (XMRF), o açúcar invertido e as bebidas com elevado teor de adição<sup>25</sup>.

Fatos históricos de cunho econômico, desencadearam modificações marcantes em relação ao consumo de frutose. A sacarose, comumente utilizada como edulcorante em produtos industrializados até meados de 1960, passou a ser substituída pelo XMRF, devido principalmente, a sua semelhança energética, o seu melhor poder edulcorante, a facilidade de manuseio e a economia de custos<sup>26</sup>. Na época, a criação de 2 variações do XMRF, contendo 42 ou 55% de frutose em sua composição, subsidiou novas possibilidades para a produção e, conseqüentemente, a expansão do mercado de bebidas industrializadas. Fato que contribuiu para o crescimento exponencial no consumo de frutose em diferentes regiões do mundo e que vem perdurando até os dias de hoje<sup>27</sup>.

De acordo com uma nova orientação da Organização Mundial da Saúde (OMS) do ano de 2015, destacam-se as recomendações de redução da ingestão dos monossacarídeos, incluindo a frutose, para valores abaixo de 10 ou 5% do consumo energético total diário, tanto para adultos como para crianças. Em termos de quantificação, uma ingestão aproximada de até 25g/dia, poderia diminuir os potenciais riscos a saúde<sup>28</sup>. Historicamente, a média do consumo de frutose vem aumentando acentuadamente em diferentes regiões do mundo, com destaque para a Europa, América do Norte, América do Sul, Ásia e África<sup>29</sup>. Dados específicos do continente americano apontaram para um aumento de 30% no consumo de frutose em relação a década de 70, podendo chegar a uma quantidade estimada de 75g/dia em pelo menos 10% dessa população. Além disso, ao associar a faixa etária, é

possível mensurar um consumo 20% maior em adolescentes e adultos jovens, se comparados aos idosos. Contudo, cabe destacar que o aumento exponencial não foi decorrente do maior consumo de frutas e sim, de açúcar e de edulcorantes industrializados adicionados aos alimentos<sup>29,30</sup>.

No Brasil, inexistem dados específicos para o consumo de frutose. No entanto, os resultados descritos pelas pesquisas de orçamentos familiares (POF)<sup>31</sup>, demonstraram um correspondente da participação dos açúcares de adição (subprodutos utilizados em preparações culinárias e alimentos industrializados), de 16,7% do total de calorias consumidas. Valor este que estaria acima do estipulado pela OMS, que preconiza entre 5 e 10% do mesmo total de calorias<sup>31</sup>. Ainda de acordo com a pesquisa brasileira, deste percentual encontrado, 75% foi representado pelo consumo de açúcares refinados e outros adoçantes calóricos, sendo o restante (25%), composto por alimentos processados, como refrigerantes, doces, balas e biscoitos<sup>31,32</sup>. Em 2013, a partir de uma amostra de 60.202 adultos, de diferentes distritos do Brasil, Claro e colaboradores<sup>33</sup> constataram uma prevalência de 21,7% com consumo regular de alimentos doces e de 23,4% com consumo regular de refrigerante ou suco artificial, ambos com expressiva adição de açúcar.

### **1.1.2 Metabolismo da frutose**

A frutose apresenta uma composição química idêntica à glicose, expressa pela fórmula química  $C_6H_{12}O_6$ . A diferenciação na frutose, ocorre pela presença de um grupo ceto na posição 2 de sua cadeia de carbono, enquanto na glicose, está presente um grupo aldeído na posição 1 da mesma cadeia<sup>27</sup>. No comparativo, a frutose possui uma menor capacidade hiperglicemiante, característica que destacava sua recomendação dietética, para um melhor controle glicêmico, principalmente em pacientes diabéticos ou com desequilíbrios no controle glicêmico<sup>34</sup>. Em recente méta-análise publicada por Evans e colaboradores<sup>35</sup>, foi possível constatar que a substituição da glicose pela frutose, tanto em alimentos sólidos como em bebidas, resultou em um menor pico glicêmico pós-prandial e conseqüentemente, uma menor expressão de insulina plasmática.

A disponibilidade de frutose nas regiões absorptivas, é resultante da ingestão e conseqüentemente, do processo digestivo e enzimático dos carboidratos, tanto para sua forma pura, como para as diferentes fontes alimentares<sup>34</sup>. Especificamente no polo apical dos enterócitos no intestino delgado, ocorre o primeiro transporte pelo transportador de glicose 5 (GLUT5), que ao contrário da glicose é independente de sódio e não envolve desprendimento energético por meio da hidrólise da adenosina trifosfato (ATP). Já no meio interno dos enterócitos, especificamente no polo basolateral, a frutose é difusa para a corrente sanguínea por intermédio de outro transportador de glicose 2 (GLUT2)<sup>18,30</sup>. Além do intestino, já está declarada a expressão do GLUT5 nos rins, no tecido musculoesquelético, nos testículos, na gordura e no cérebro<sup>36</sup>.

Dentro do processo de assimilação, o controle da absorção de frutose e suas variações sanguíneas, são dependentes da expressão orgânica do GLUT5, que pode ser modulado frente a uma maior exposição do nutriente<sup>30</sup>. Em 2009, Barone e colaboradores<sup>37</sup>, utilizando modelo animal, demonstraram que o aumento da ingestão de frutose se correlaciona positivamente a maior expressão de GLUT5 e a supressão deste, diminui significativamente a absorção e a concentração plasmática de frutose.

Após entrada na célula, moléculas de frutose são fosforiladas pela cetoheksokinase (KHK) ou frutokinase (FK), a um metabólito não identificado (M) e formação do gliceraldeído (GL), pela adolase-B. Na ocorrência desse metabolismo inicial, se aumenta a transcrição celular via GLUT5-mRNA no retículo endoplasmático (ER), gerando novas moléculas de GLUT5 e aumentando a absorção do nutriente<sup>38</sup>. A ordem e os mecanismos acima citados estão demonstrados na figura 1.

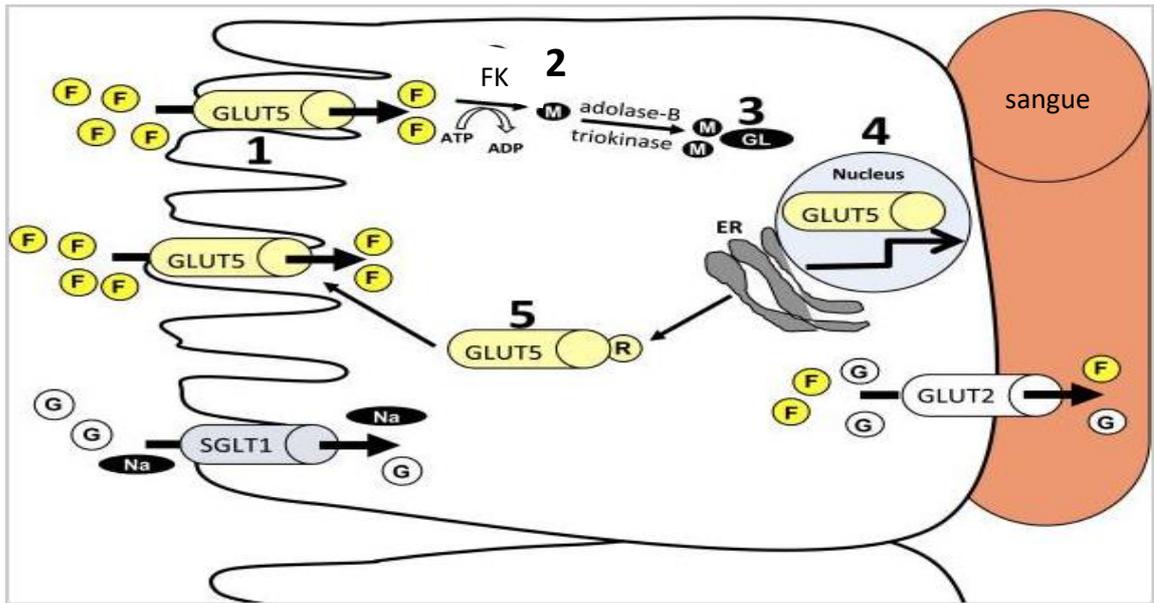


Figura 1 – Mecanismo de absorção de frutose e possíveis respostas frente ao seu consumo excessivo. GLUT5: transportador de glicose 5; FK: frutocinase; GL: gliceraldeído; ER: retículo endoplasmático; GLUT2: transportador de glicose 2; SGLT1: transportador de glicose dependente de sódio 1; F: frutose; G: glicose; M: metabolito não identificado.

Fonte: Adaptado de Patel et al<sup>38</sup>.

Mecanismos envolvidos na ineficiência absorptiva da frutose são menos frequentes e não se correlacionam diretamente ao processo enzimático e sim, na expressão e/ou ineficiência dos transportadores específicos (GLUT5 e GLUT2)<sup>39</sup>. Fisiologicamente, a produção destes transportadores vai aumentando gradativamente após o nascimento e principalmente, após o desmame, o que pode contribuir para um aumento nos casos de má absorção nos primeiros anos de vida<sup>39</sup>.

Após processo de absorção e disponibilidade sanguínea, o fígado é o principal órgão destinado a metabolização da frutose, onde também está presente outro transportador de glicose (GLUT8), responsável pelo seu potencial de captação e transporte<sup>40</sup>. Após entrada no fígado, diferentes enzimas serão envolvidas no seu catabolismo, podendo citar a frutoquinase, a aldolase B e a triquinase. A frutoquinase é responsável pela fosforilação da frutose a frutose-1-fosfato, que consequentemente, ativa mecanismos adicionais via aldolase B e triquinase, formando um intermediário da glicólise e da gliconeogênese (gliceraldeído 3 fosfato)<sup>41,42</sup>. Como pode ser observado na figura 2.

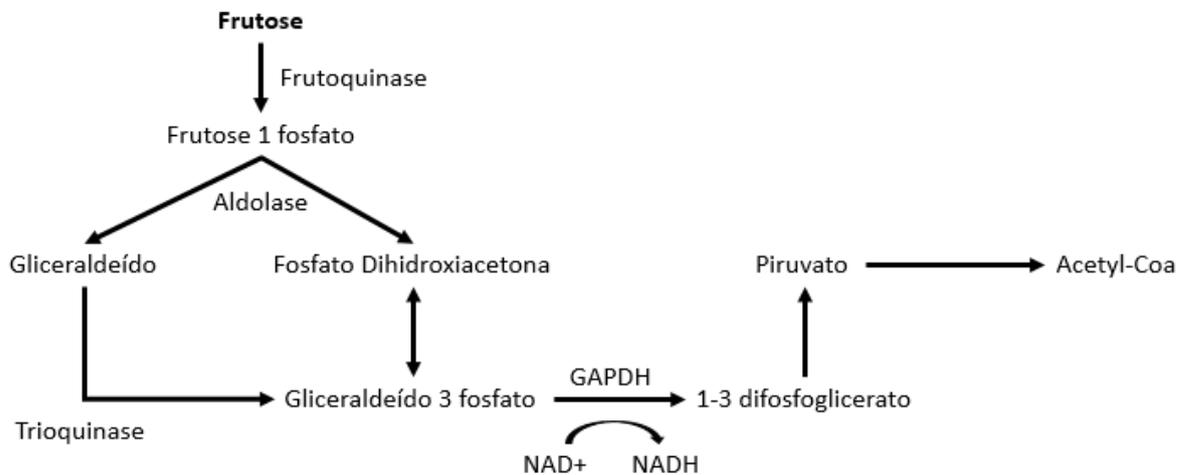


Figura 2 – Metabolismo hepático da frutose. GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato; NAD+: nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido.

O final do metabolismo hepático resulta na formação de glicose e glicogênio. Além de ácidos graxos livres, a partir do gliceraldeído, que acabam por inibir momentaneamente a oxidação lipídica<sup>43–45</sup>. Fato já relatado como potencial desencadeador do acúmulo de gorduras corporais<sup>46</sup>. Além disso, a maior disponibilidade de frutose e, conseqüentemente, o aumento na atividade da FK com desprendimento energético via adenosina trifosfato (ATP), resulta em uma maior disponibilidade de adenosina monofosfato (AMP), podendo gerar uma produção acentuada de ácido úrico<sup>45</sup>. Estando a hiperuricemia associada ao desenvolvimento de doenças, como a resistência insulínica, a gota, a hipertensão, a aterosclerose e as doenças renais crônicas<sup>45</sup>.

As evidências que justificam a maior metabolização de frutose pelo tecido hepático, estão embasadas diante de sua elevada concentração de FK<sup>47–49</sup>. No entanto, outros tecidos ou órgãos também podem apresentar atividade da enzima e ativar seu metabolismo, podendo citar os rins<sup>50</sup>, o pâncreas<sup>51</sup>, o intestino<sup>38</sup>, o musculo esquelético<sup>52</sup> e o cérebro<sup>15,53</sup>. Ainda que a atividade da enzima FK, já possa justificar um metabolismo de frutose extra hepático, a descrição dos mecanismos envolvidos não estão totalmente claros<sup>54</sup>. Oppelt e colaboradores<sup>15</sup> descrevendo uma hipótese, ressalta que, qualquer tecido com expressão de GLUT (2, 5, 7, 9 ou 11) e genes das enzimas FK ou aldolase, poderiam metabolizar a frutose a partir da via frutose-1-fosfato. Além da liberação hepática, o cérebro também pode expressar quantidade significativas dos genes para FK e aldolase, principalmente frente a

maior disponibilidade de frutose. O que vem a confirmar o potencial de metabolização do nutriente na região cerebral<sup>55,56</sup>.

### 1.1.3 Doenças associadas ao consumo de frutose

A associação da frutose no desenvolvimento de doenças vem sendo amplamente estudada e com estreitos apontamentos metabólicos, tanto no envolvimento de seus transportadores (GLUT2 e GLUT5), como de seus efeitos isolados do próprio nutriente<sup>30,57,58</sup>. Alguns fatores, implicados diretamente na esteatose hepática não alcoólica (EHNA), na hipertensão e na doença renal, podem ser resultados do aumento na absorção de sódio (Na) e na maior produção do ácido úrico, assim como, na redução das concentrações sanguíneas da 1,25-(OH)2D3 (forma ativa da vitamina D). Como pode ser observado na Figura 03.

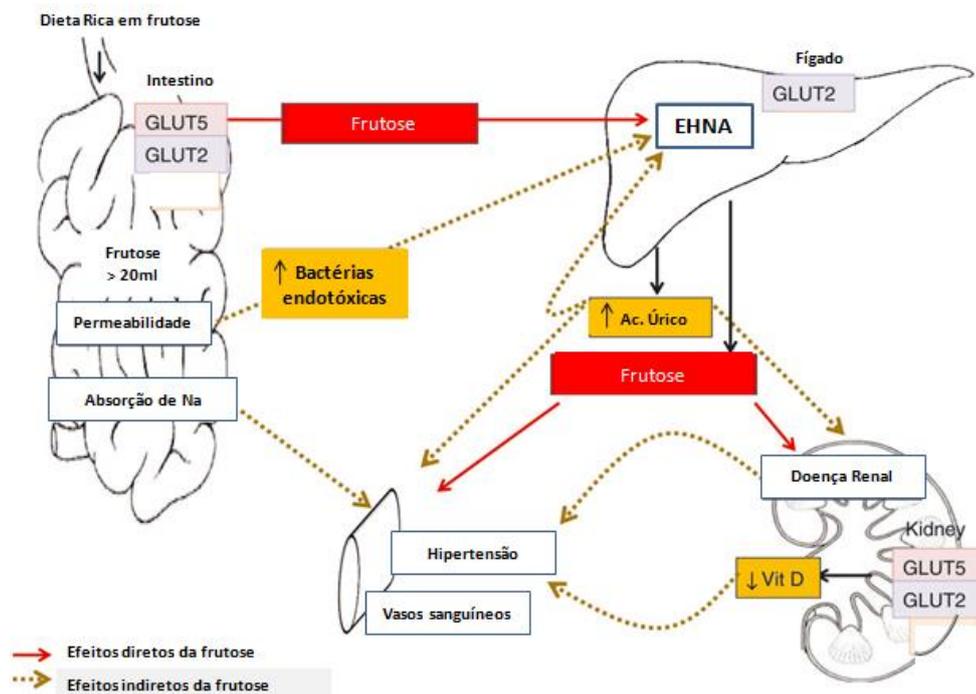


Figura 03 – Modelo de efeitos do consumo excessivo de frutose e o desenvolvimento de algumas doenças: EHNA: esteatose hepática não alcoólica.

Fonte: Adaptado de Douard e Ferraris<sup>30</sup>.

Além das participações citadas, o aumento no consumo de frutose e suas diferentes apresentações vêm ganhando pertinência científica, principalmente

quando contextualizado com o aumento da obesidade em diversas faixas etárias<sup>59-61</sup>. Inicialmente é possível sintetizar implicações hepáticas, com destaque para conversão da frutose absorvida em glicogênio e ácidos graxos. Conseqüentemente, o aumento da conversão e disponibilidade do substrato lipídico, acabam por favorecer tanto a lipogênese tecidual como hepática. Em meio a essas vias metabólicas, evoluir para o agravamento ou acometimento da EHNA, assim como, inibir a oxidação de ácidos graxos provenientes da circulação sistêmica, potencializando os efeitos lipogênicos<sup>27,62</sup>. Lozano e colaboradores<sup>9</sup>, utilizando ratos, demonstraram que o acréscimo de frutose em uma dieta rica em gordura, acelerou o desenvolvimento da síndrome metabólica, além de potencializar a EHNA e contribuir para alterações na integridade vascular. Utilizando humanos obesos e com excesso de peso, submetidos ao consumo diário de bebidas adoçadas com glicose ou frutose, Stanhope e colaboradores<sup>63</sup>, demonstraram outros importantes parâmetros. O grupo que consumiu a frutose, aumentou o volume adiposo visceral e as concentrações séricas de triglicerídeos, se comparado ao grupo que recebeu glicose. Além disso, também se associou com o adicional de frutose, a menor expressão de leptina, responsável pela modulação do consumo dietético e com importantes implicações obesogênicas<sup>64</sup>. Estudos conduzidos com a utilização de modelo animal<sup>65,66</sup> e seres humanos<sup>67,68</sup>, também encontraram uma menor expressão de leptina frente ao consumo de frutose.

Em uma outra linha de investigação com envolvimento do SNC, o consumo excessivo de frutose pode ser responsável pela geração de danos e/ou alterações neurobiológicas específicas, associados ao desenvolvimento de doenças, como a obesidade e a síndrome metabólica<sup>69</sup>. Essas alterações na região cerebral, seriam responsáveis por inadequações dos mecanismos de saciedade e na expressão de hormônios reguladores, proporcionando um ambiente de consumo alimentar excessivo e acentuando a evolução de doenças como a obesidade<sup>20,70</sup>. A metabolização da frutose no SNC, tende a gerar uma menor concentração de ATP e maior de AMP, que conseqüentemente, aumenta a atividade da adenosina monofosfato quinase (AMPK). Em contrapartida a AMPK reduz a atividade da acetil-CoA carboxilase (ACC) e diminuiu a concentração da coenzima malonil coenzima-A (Malonil-CoA)<sup>71</sup>. Essa com participação direta nos efeitos anorexigênicos e no controle da ingestão alimentar<sup>43,71</sup>. A contextualização entre o cérebro, a frutose e algumas doenças, pode ser observada na figura 04.

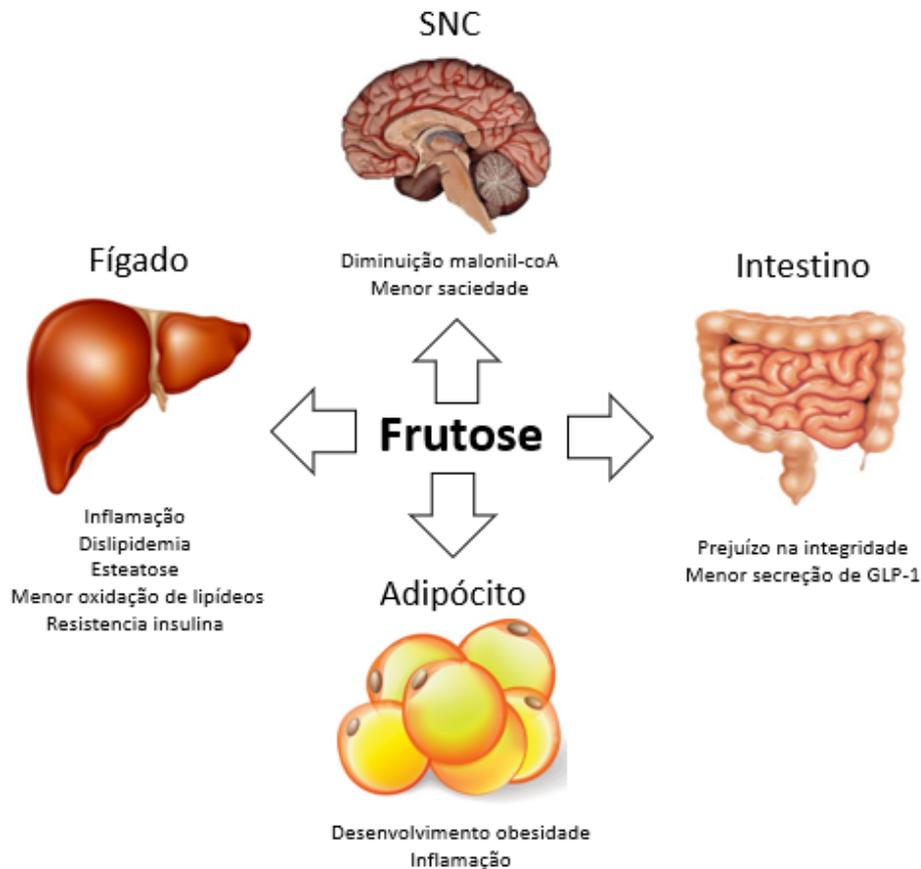


Figura 04 – Modelo de alterações em órgãos específicos desencadeadas pelo consumo de frutose: malonil coenzima-A; GLP-1: peptídeo semelhante a glucagon-1 (do inglês *Glucagon like peptide*).

Fonte: Adaptado de Dekker et al<sup>43</sup>.

O cérebro é o órgão responsável pela transposição de mecanismos envolvendo as relações ambientais, para respostas comportamentais e fisiológicas. Nesse sentido, regiões específicas como o hipotálamo, o tronco encefálico e áreas cognitivas superiores, são responsáveis por importantes interpretações e reações neuroendócrinas<sup>72</sup>. O hipotálamo é uma estrutura complexa com grande concentração de neurônios, descritos como responsáveis pelo controle da reprodução, das respostas defensivas e, principalmente, pelo controle da ingestão alimentar. Em uma região denominada núcleo arqueado, encontram-se neurônios responsáveis pela expressão de receptores para hormônios reguladores, como a insulina, a leptina, a grelina, os glicocorticoides, o estrogênio, os hormônios da tireoide e o GLP-1, ambos com estreitas implicações no consumo alimentar<sup>73-75</sup>.

A leptina é um hormônio anorexigênico, secretado pelo tecido adiposo e descrito em síntese<sup>76</sup>, como contraste evolutivo para o controle das reservas energéticas. Com uma forte sinalização hipotalâmica, é capaz de estimular a produção de neurotransmissores que modulam a ingestão alimentar<sup>76,77</sup>. A insulina além de atuar estritamente em boa parte da fisiologia celular, incluindo os adipócitos (lipogênese), desempenha um mecanismo de sinalização das reservas de energia e consumo alimentar, para conseqüente neuroregulação no hipotálamo em sinergismo a leptina<sup>64,66</sup>. No entanto, mesmo com expressões aumentadas de leptina e insulina, fatores inerentes da obesidade, acabam por diminuir o potencial de sinalização de ambas<sup>65,67</sup>. A grelina é um hormônio orexigênico produzido principalmente no estômago, possuindo um envolvimento sistemático no controle da fome e saciedade, estimulando via neuropeptídios, a ingestão alimentar. Além disso, pode induzir ao aumento da adiposidade via sistema nervoso simpático, com aumento do tecido adiposo e maior deposição lipídica no fígado<sup>68</sup>. Pertencendo a categoria das incretinas, o GLP-1 é secretado por células intestinais, principalmente na região do íleo, na presença de alimentos em processo de digestão<sup>78</sup>. Seus efeitos já estão evidenciados em diferentes tecidos periféricos (pâncreas, fígado, ossos, tecido adiposo) e no SNC, com sinalização de receptores para GLP-1 em diferentes regiões do hipotálamo (núcleo arqueado, ventromedial e núcleo paraventricular)<sup>79</sup>. A atividade hipotalâmica mediada pela expressão de GLP-1, está atribuída aos mecanismos de regulação do apetite e controle da saciedade<sup>80</sup>, podendo inclusive, estar associada a redução e controle de peso corporal<sup>81</sup>.

O hipotálamo possui um envolvimento crucial no comportamento alimentar e, conseqüentemente, no desenvolvimento de doenças como a obesidade<sup>82</sup>. Na etiologia da doença, é possível destacar o estreito envolvimento do desequilíbrio energético, onde o consumo calórico (alimentos) supera o desprendimento energético, por intermédio de atividades físicas e/ou metabólicas<sup>83</sup>. Além disso, fatores genéticos podem também contribuir de maneira significativa, principalmente, na junção dos fatores ambientais, expressos por dietas hipercalóricas e pelo sedentarismo<sup>84</sup>. Como conseqüência isolada ou multifatorial, ocorre uma maior disponibilidade de triglicerídeos, que por sua vez, tendem a potencializar os mecanismos fisiológicos de armazenamento energético, culminando na hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo<sup>85,86</sup>. Essa expansão tecidual, é relatada como desencadeadora de efeitos metabólicos locais, incluindo a hipóxia, a morte de

células adipocitárias e a desregulação dos fluxos de ácidos graxos<sup>11</sup>. Condição que se pressupõe ao maior recrutamento de macrófagos, necessários na remodelação tecidual, que acabam por aumentar a produção de citocinas inflamatórias e denomina variações sistêmicas do tecido adiposo<sup>11,87</sup>. Portanto, o tecido adiposo acaba por atuar como um importante órgão endócrino e, conseqüentemente, produtor de diversas citocinas denominadas adipocinas<sup>88</sup>. Tanto o acometimento, quanto o desenvolvimento de doenças vinculadas a obesidade, possuem fortes evidências do envolvimento das adipocinas. Seu potencial tem sido descrito a partir de características distintas em relação ao aumento das atividades inflamatórias e diminuição das atividades anti-inflamatórias, podendo estar vinculadas ao aumento dos danos oxidativos<sup>88-90</sup>.

Ao considerar a hipertrofia do tecido adiposo, como responsável de uma inflamação sistêmica, é possível traçar o envolvimento não padronizado de diferentes órgãos ou tecidos, como o fígado, o pâncreas, o coração, o músculo esquelético e o cérebro<sup>91</sup>. Especificamente na região do hipotálamo, algumas alterações bioquímicas tem sido descritas como consequência de danos ocorridos no tecido adiposo<sup>92</sup>. As conseqüências dessas alterações no hipotálamo, podem ser traduzidas em modificações no controle da homeostase energética e perda da sensibilidade de mensageiros anorexígenos, como a leptina e a insulina<sup>92</sup>.

As trocas moleculares entre o meio externo e o SNC, incluindo o hipotálamo, são controladas por uma barreira hematoencefálica, composta por sistemas de microvasos estreitamente alinhados e com um considerável aparato seletivo. No entanto, pode apresentar alterações de permeabilidade decorrente da maior disponibilidade de ácidos graxos e/ou da expressão de mediadores inflamatórios periféricos<sup>91,93</sup>.

Os mecanismos fisiológicos da inflamação hipotalâmica frente ao consumo excessivo de frutose, ainda não estão totalmente compreendidos, mas alguns resultados podem ser evidenciados. Em um estudo conduzido por Li e colaboradores<sup>94</sup>, com a utilização de cultura de células e modelo animal com ratos, a exposição ou o consumo excessivo de frutose, foi capaz de induzir a inflamação hipotalâmica, tanto na cultura de células, quanto no modelo animal. Os resultados demonstraram uma maior expressão das citocinas pró-inflamatórias, assim como, dos marcadores de inflamação conhecidos como receptores de Toll-like 4 (TRL4) e fator nuclear - kB (NF-kB), no hipotálamo dos animais e nos astrócitos cultivados.

Diferentes gatilhos externos, como traumas, infecções e citocinas inflamatórias, podem desencadear o início da resposta imune inata do SNC, e ativar um complexo de células imunológicas residentes, conhecida como micróglia<sup>95</sup>. Dentro dessa, há um conjunto de células que limitam o tecido neural do tecido não-neural, denominadas de astrócitos. Atualmente a ativação dos astrócitos e da micróglia, estão descritos no potencial de mediação entre os mecanismos inflamatórios e anti-inflamatórios, dentro do SNC<sup>96</sup>. Uma ativação constante e persistente desses grupos celulares, aumentam seu fenótipo fagocítico e a liberação de citocinas inflamatórias, responsáveis pela depuração de agentes invasores e reparação de tecidos danificados<sup>97</sup>. Além disso, já está relatada como consequência na ativação da micróglia e dos astrócitos, a maior produção local de citocinas anti-inflamatórias, responsáveis pelo controle do potencial neuroinflamatório e da atenuação de mediadores pró-inflamatórios<sup>98</sup>.

Os receptores Toll-like (TLRs) são proteínas transmembranas também expressas pelas células da glia no SNC, e que atuam no reconhecimento de moléculas associadas a patógenos<sup>97</sup>. Considerados como importantes mediadores funcionais da inflamação, para os TLRs designa-se a ativação do NF- $\kappa$ B, responsável pelo potencial da inflamação e pelo controle da expressão de genes codificadores, para proteínas ou citocinas pró-inflamatórias<sup>99</sup>. Em um estudo conduzido por Yu e colaboradores<sup>100</sup>, ratos que tiveram a inibição química do NF- $\kappa$ B no núcleo paraventricular hipotalâmico, apresentaram menor expressão de citocinas pró-inflamatórias, maior expressão citocinas anti-inflamatórias e menor expressão de espécies reativas do oxigênio (EROs), se comparados aos animais que não sofreram a inibição. Portanto, a ativação contínua do conjunto celular compreendido pela micróglia e pelos astrócitos, com mecanismos modulados pelo NF- $\kappa$ B, além de provocar a neuroinflamação, pode aumentar a liberação de EROs e instaurar um estresse oxidativo, amplificando o dano tecidual<sup>101,102</sup>.

#### **1.1.4 Frutose e estresse oxidativo**

Conceituado como um distúrbio resultante do desequilíbrio orgânico, entre as atividades oxidantes e as respostas antioxidantes, o estresse oxidativo está fortemente associado a parâmetros de disfunção celular<sup>103,104</sup>. Os mecanismos oxidantes e com potencial de lesão, estão atribuídos as EROs, que são substâncias

com elevado poder de reação, produzidas sistematicamente a partir do metabolismo do oxigênio. Estando incluídos o radical superóxido ( $O_2\bullet$ ), o radical hidroxila ( $OH\bullet$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical peroxinitrito ( $ONOO$ )<sup>105,106</sup>.

Uma diversidade de mecanismos inflamatórios, decorrentes do aumento do tecido adiposo e/ou da maior expressão de adipocinas pró-inflamatórias, parecem contribuir de maneira efetiva para o aumento do estresse oxidativo<sup>105</sup>. Além disso, diferentes doenças crônicas inflamatórias, tem o estresse oxidativo como um fator de pior progressão, podendo citar o diabetes, as doenças neurodegenerativas, a aterosclerose, a artrite, a síndrome do intestino irritável, as doenças cardiovasculares e o câncer<sup>107</sup>.

Na expansão do tecido adiposo, a expressão de adipocinas pró-inflamatórias podem induzir a uma maior produção de EROs, que por sua vez tendem a exacerbar ou tornar irregular, os mecanismos de outras adipocinas<sup>108</sup>. Diferentes adipocinas inflamatórias podem aumentar a produção de EROs, com envolvimento paralelo da liberação de nitrogênio, desencadeada pela elevação do recrutamento de macrófagos<sup>108,109</sup>. Além disso, outros mecanismos também podem ser atribuídos ao aumento do estresse oxidativo no contexto da obesidade, podendo citar: a hiperglicemia, o aumento da atividade muscular decorrente do excesso de peso, a inadequação antioxidante e o acometimento de doenças crônicas decorrentes da inflamação<sup>109</sup>.

No SNC incluindo a região do hipotálamo, a produção das EROs está associada a nutrientes, peptídeos, infecções e adipocinas pró-inflamatórias. Em baixas concentrações, as EROs podem atuar no combate a microrganismos, no entanto, a sua maior expressão ou o acometimento do estresse oxidativo, estão associados ao agravo da neuroinflamação e no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas<sup>110</sup>. Sabendo que em muitos casos, pode ocorrer a cronicidade de gatilhos desencadeadores de danos oxidativos no hipotálamo, juntamente com o agravo da idade, algumas linhas de investigação sugerem a inclusão de novas metodologias de tratamento, voltadas a redução dos parâmetros oxidativos<sup>111</sup>.

Os processos de defesa contra as EROs objetivam principalmente, a redução e/ou erradicação dos danos celulares, com envolvimento dos antioxidantes e de uma série de mecanismos baseados na prevenção, na interceptação e na reparação celular<sup>103,106</sup>. De uma maneira sistêmica, esses antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos, incluindo a superóxido dismutase (SOD), a catalase

(CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx). E não enzimáticos, com inclusão de fontes endógenas e dietéticas, tais como: a vitamina C (ac. Ascórbico), a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), os carotenóides, o ácido úrico e alguns fitoquímicos<sup>106,112</sup>.

O aumento expressivo das EROs, tanto pelo acréscimo das atividades oxidativas como pela diminuição da resposta neutralizadora ou antioxidante, pode resultar em alterações funcionais de proteínas. Com potencial de indução a proteólise e em alterações nos processos de diferenciação ou crescimento celular<sup>113</sup>. Conseqüentemente, a oxidação de cadeias proteicas pode gerar grupos de proteínas carboniladas (aldeídos e cetonas). Já evidenciados como marcadores de danos oxidativos em proteínas e seu acúmulo, descrito em doenças como o Alzheimer, a diabetes, as doenças do aparelho digestivo, a artrite e o câncer<sup>114</sup>.

Já está estabelecido que o acúmulo das EROs pode também danificar estruturas lipídicas (peroxidação lipídica), potencializando o dano celular e aumentando a suscetibilidade para doenças como, as cardiovasculares, o câncer e as neurodegenerativas<sup>104,115</sup>. Quando instaurada, a peroxidação lipídica pode alterar a expressão e sinalização gênica, assim como danificar diferentes membranas celulares, acentuando o potencial lesivo<sup>115</sup>. Os principais subprodutos da peroxidação lipídica são os hidroperóxidos lipídicos e dentre estes, o malondialdeído (MAD) é descrito como de elevado poder mutagênico<sup>116</sup>.

A partir de efeitos específicos ou consequentes dos danos a proteínas e da peroxidação lipídica, as EROs possuem mecanismos distintos que podem levar a alterações no ácido desoxirribonucleico (DNA – do inglês *deoxyribonucleic acid*) celular<sup>112</sup>. Dependendo da magnitude do estresse oxidativo, pode ocorrer a quebra ou degradação de suas bases, assim como, modificações, mutações e alteração de ligações com proteínas. A resultante entre os danos oxidativos ao DNA e os mecanismos antioxidantes, pode dimensionar a amplitude da lesão, as alterações funcionais e sua posterior reparação<sup>102,112</sup>. Portanto as EROs e o estresse oxidativo, podem causar lesão celular por intermédio de alterações à proteínas, lipídeos e DNA (figura 05).

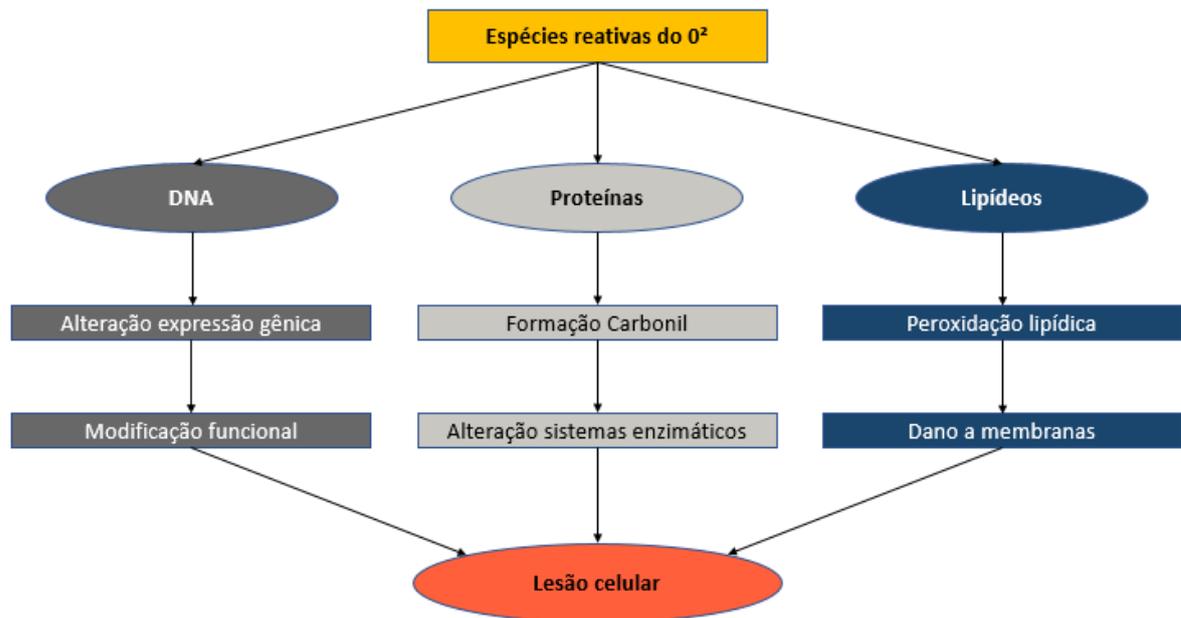


Figura 05 – Efeitos das EROS no desenvolvimentos de lesão celular, com envolvimento das alterações ao DNA, as proteínas e aos lipídeos.

Fonte: Adaptado de Bhat et al<sup>102</sup>.

Ao destacar um potencial da frutose como indutivo ao estresse oxidativo, Jaiswal e colaboradores<sup>14</sup> utilizando cultura de células do músculo esquelético de ratos e expostas a frutose, demonstraram importantes parâmetros. A exposição a frutose por um período de 06 horas, aumentou de maneira significativa e crescente (ao longo do período), a produção do radical  $O_2\bullet$  e do  $H_2O_2$ , se comparado ao controle. Além disso, após 3 horas de exposição, houve uma diminuição significativa, na atividade da CAT, também comparado ao controle. Em um outro estudo de Maithilikarpagaselvi e colaboradores<sup>117</sup>, com a utilização de ratos submetidos ao consumo excessivo de frutose alimentar, ocorreu um aumento na concentração de malondialdeído (MDA) e diminuição na atividade da GPx, no musculo esquelético, se comparado ao grupo controle. Ao avaliar o EO no córtex cerebral de ratos, a partir de injeção subcutânea com frutose ou salina, Lopes e colaboradores<sup>118</sup> encontraram 1 hora após a infusão, aumento significativo nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs, do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*), parâmetro que reflete o conteúdo de MDA, e no conteúdo de carbonil, se comparado ao grupo salina. Além disso foram encontradas diferenças significativas na atividade das enzimas CAT e SOD, que no contexto contribuíram para constatar a presença do estresse oxidativo.

### 1.1.5 Frutose: metabolismo energético e disfunção mitocondrial

Dos mecanismos fisiológicos que envolvem o estresse oxidativo e suas consequências patológicas, as mitocôndrias e, conseqüentemente, a cadeia respiratória mitocondrial, são consideradas as principais geradoras das EROs. Além das responsabilidades primárias na respiração celular (fosforilação oxidativa), ressíntese e geração de energia, as mitocôndrias acabam por participar diretamente da manutenção e viabilidade celular<sup>119</sup>. Ao tratar da bioenergética celular, a principal molécula de troca energética se apresenta sob a forma de adenosina trifosfato (ATP), proveniente dos combustíveis alimentares (carboidratos, proteínas e gorduras). Na hidrólise do ATP à adenosina difosfato (ADP) e um fosfato inorgânico (Pi), ocorre o desprendimento de energia livre, vital para o suprimento de demandas energéticas do organismo<sup>120</sup>.

Como já mencionado, a primeira etapa da produção de energia para as células, envolve a oxidação dos macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídeos), para produção de fragmentos de dois carbonos sob o formato da acetil-coenzima A (acetil-CoA). Numa segunda etapa, esse mesmo grupo acetil se incorpora ao ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs, com conversão enzimática a dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e a energia liberada, armazenada nos transportadores de elétrons, nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo reduzida (FADH<sub>2</sub>). Já na terceira etapa, estes transportadores são oxidados, com doação de seus elétrons, que são ligados ao oxigênio (O<sub>2</sub>) por intermédio de uma cascata de moléculas transportadoras, denominada cadeia respiratória. O movimento de todo esse percurso de elétrons, resulta numa grande quantidade de energia liberada sob a forma de ATP<sup>121</sup> (figura 06).

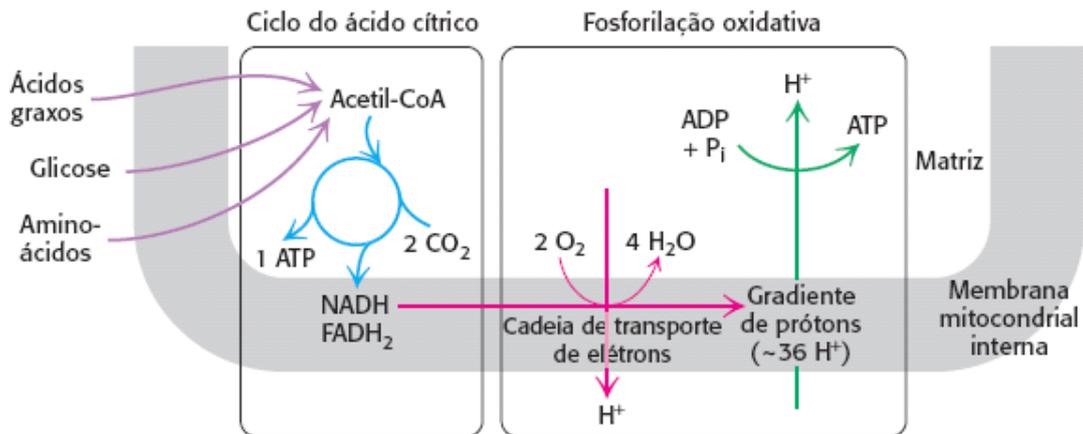


Figura 06 – Bioenergética celular. ATP – adenosina trifosfato; ADP – adenosina difosfato; NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida; FADH<sub>2</sub> - flavina adenina dinucleotídeo reduzida 2; P<sub>i</sub> – fosfato inorgânico.

Fonte: Adaptado de Berg et al<sup>120</sup>.

As reações específicas ao ciclo do ácido cítrico, com envolvimento dos processos de redução da acetil-CoA em diferentes reações, acabam por gerar subprodutos metabólicos da cadeia respiratória mitocondrial, podendo citar: o CO<sub>2</sub>, o NADH, o FADH<sub>2</sub> e o ATP<sup>122</sup>. Na cadeia respiratória mitocondrial, para realização de todos os processos e contemplar a geração destes subprodutos, se faz necessário a atividade de quatro componentes ou complexos enzimáticos. O complexo I (NADH-ubiquinona oxidoreductase), o complexo II (succinato-ubiquinona oxidoreductase), o complexo III (ubiquinolcitocromo c oxidoreductase) e o complexo IV (citocromo c oxidase)<sup>123</sup>. O transporte de elétrons é acoplado ao sistema de bombeamento dos complexos (I, III e IV), que gera força motora para a membrana mitocondrial, que a partir ATP sintase (complexo V), sintetiza moléculas de ATP<sup>124</sup>.

Em condições fisiológicas em torno de 2 a 5% do O<sub>2</sub> metabolizado nas mitocôndrias são desviados para a produção de EROs, no entanto, uma inadequada transferência de elétrons entre os complexos da cadeia respiratória mitocondrial, pode aumentar o volume de O<sub>2</sub> reduzido univalente, com a geração do radical O<sub>2</sub>• e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além disso, na presença de Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>+</sup>, o mesmo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a partir da reação de Fenton e de Haber-Weiss, pode levar a formação do radical OH•. Caracterizado como um radical livre (RL) com elevado poder reativo e com grande potencial de dano celular<sup>103</sup> (figura 07).

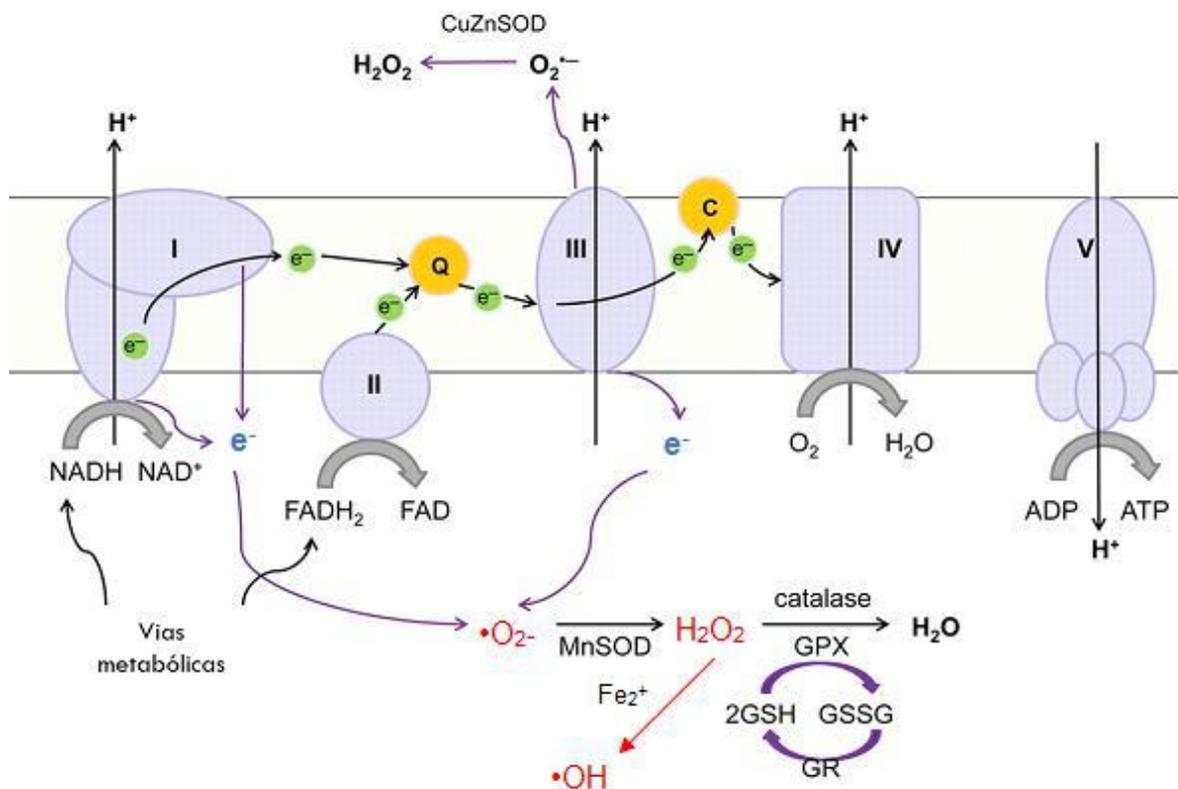


Figura 7 – Complexos da cadeia respiratória mitocondrial e geração de EROs. SOD – superóxido dismutase; MnSOD – superóxido dismutase manganês; CuZnSOD – Superóxido dismutase cobre zinco; GPx – glutatona peroxidase. GSH – glutatona reduzida; GSSG – glutatona oxidada; GR – glutatona redutase; NAD – Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo; FAD – Flavina-adenina-dinucleotídeo; Q – coenzima Q; C – citocromo C; ADP – adenosina difosfato; ATP – adenosina trifosfato.

Fonte: adaptado de Yu e colaboradores<sup>125</sup>.

Em contribuição, Jaiswal e colaboradores<sup>64</sup> utilizando cultura de células do músculo esquelético de ratos, encontraram uma diminuição na atividade da citrato sintase e dos complexos enzimáticos mitocondriais (I e IV), a partir da exposição à frutose. Na região cerebral, qualquer defeito no funcionamento mitocondrial, como a diminuição na atividade dos complexos da cadeia respiratória, pode levar a um déficit energético e uma maior produção de EROs. Ambos considerados importantes gatilhos para o desencadeamento de distúrbios neurodegenerativos, com impacto em deficiências comportamentais, motoras e cognitivas<sup>126</sup>. Em um trabalho de revisão, Drougard e colaboradores<sup>127</sup> ressaltam que, a liberação de ROS no hipotálamo, pode acontecer por intermédio de diferentes mecanismos, incluindo fatores dietéticos, como a ingestão de gorduras e açúcares. Contudo, a partir de

uma produção exacerbada de EROs, é possível o acometimento de um processo de neurodegeneração, contribuindo negativamente para o controle do balanço energético e de doenças como a obesidade e o diabetes tipo II.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do consumo de diferentes concentrações de frutose sobre parâmetros bioquímicos de camundongos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Acompanhar o ganho de peso corporal de camundongos, submetidos a ingestão hídrica, com diferentes concentrações de frutose (0%, 5%, 10% e 20%);
- Mensurar o peso da gordura visceral e de suas frações (retroperitoneal, mesentérica e epididimal) de camundongos submetidos a ingestão hídrica com diferentes concentrações de frutose (0%, 5%, 10% e 20%);
- Analisar os efeitos da ingestão hídrica com diferentes concentrações de frutose (0%, 5%, 10% e 20%), sobre os danos oxidativos a lipídeos e a proteínas, na gordura epididimal e no hipotálamo de camundongos;
- Avaliar os efeitos da ingestão hídrica com diferentes concentrações de frutose (0%, 5%, 10% e 20%), sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, na gordura epididimal e no hipotálamo de camundongos;
- Elucidar os efeitos da ingestão hídrica com diferentes concentrações de frutose (0%, 5%, 10% e 20%), sobre a atividade dos complexos (I, II e IV) da cadeia respiratória mitocondrial, na gordura epididimal e no hipotálamo de camundongos;
- Avaliar o consumo alimentar (sólido e líquido) e a ingestão de frutose, de camundongos submetidos a ingestão hídrica com diferentes concentrações de frutose (0%, 5%, 10% e 20%).

### 3. MÉTODOS

#### 3.1 TIPO DE ESTUDO

O presente trabalho trata-se de um estudo experimental com a utilização de animais, submetidos ao consumo de diferentes concentrações de frutose.

#### 3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Para as análises bioquímicas foram utilizados os seguintes reagentes: ácido tiobarbitúrico, dinitrofenilhidrazina, epinefrina, ferricianeto, rotenona, fosfato de potássio, succinato de sódio, azida sódica, lauril maltosídeo, catalase de fígado bovino, hidroperóxidos de tert-butila, albumina bovina, glutathione, glutathione reductase, NADPH, sulfanilamina, azida sódica, naftil etilenodiaminadichloridrato e reagente de Griess (Sigma, St. Louis, MO), ácido tricloroacético, ácido fosfórico, peróxido de hidrogênio, glicina, EDTA, (Labsynth, São Paulo, Brazil). Em relação aos equipamentos, para todas as análises do experimento, foi utilizado um Espectrofotômetro (U2010, Hitachi), pertencente ao Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos – UNISUL.

#### 3.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 80 camundongos Swiss machos (*Mus musculus*) com 40 dias de idade, pesando entre 31 e 49g. Todos procedentes do Biotério da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os camundongos tiveram livre acesso à água e ração, e foram mantidos em ciclos de claro/escuro de 12 horas cada e temperatura de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Os camundongos foram alojados em gaiolas coletivas com lotação máxima de 5 animais, obrigatoriamente pertencentes a mesma ninhada.

### 3.4 LOCAL DE REALIZAÇÃO

O procedimento experimental foi realizado no Biotério da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL) e as análises bioquímicas no Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos, da mesma universidade, com sede na cidade de Tubarão – SC.

### 3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O desenho experimental se baseou na ingestão hídrica contínua de diferentes concentrações de frutose, por um período de 11 semanas. Para que posteriormente, se iniciasse as avaliações dos parâmetros bioquímicos. Embora não haja consenso ideal para o tempo de exposição, estudos que avaliaram o consumo de frutose em relação a diferentes parâmetros bioquímicos e/ou fisiológicos sugerem que, modificações consideráveis podem ser encontradas num período entre 60 a 168 dias<sup>9,43,128</sup>. Além disso, outros estudos ainda em andamento e também conduzidos no mesmo laboratório, utilizam 10 semanas para indução de obesidade, com dieta rica em gordura saturada, o que pode servir como parâmetro para comparativos futuros e novos estudos.

O protocolo utilizado para o consumo de frutose, se baseou na adição de um gradiente de concentração pré-estabelecido, diretamente na água dos animais (*ad libitum*). Em um estudo conduzido por Lozano e colaboradores<sup>9</sup>, a utilização de 25% de frutose na água de ratos, por um período de 60 dias, aumentou a peroxidação lipídica (TBARs), no plasma e no fígado dos animais, se comparado ao controle. Já Agrawal e colaboradores<sup>12</sup>, utilizando 15% de frutose na água de ratos, encontraram um declínio na bioenergética de mitocôndrias cerebrais e aumento da peroxidação lipídica em membranas plasmáticas, após 8 semanas de protocolo.

Portanto, para um melhor esclarecimento dos mecanismos avaliados, se optou pela utilização de uma escala gradativa, variando entre uma diluição de 5% a 20% de frutose em água. A partir da separação do total de animais em quatro grupos, o primeiro seguiu a ingestão exclusiva de água potável pura (grupo controle H<sub>2</sub>O), o segundo a ingestão exclusiva de água potável com diluição de 5% de frutose (grupo frutose 5%), o terceiro com a ingestão exclusiva de água potável com diluição

de 10% de frutose (grupo frutose 10%) e o quarto, com a ingestão exclusiva de água com diluição de 20% de frutose (grupo frutose 20%).

A separação dos grupos se baseou na exposição a diferentes percentuais de frutose na água. Conforme esquema apresentado na Figura 08.



Figura 08 – Desenho experimental.

Ao primeiro dia do experimento os animais foram pareados por grupos, de acordo com o protocolo experimental proposto, e acondicionados em caixas coletivas contendo aproximadamente cinco animais (n=5), da mesma ninhada. Além disso, foram pesados individualmente, o que também ocorreu semanalmente, com a utilização de balança digital.

Para o desenvolvimento do modelo dietético foi utilizada uma ração padrão para camundongos (comum a todos os grupos), água filtrada e frutose pura, esta adquirida de empresa especializada no fornecimento de material laboratorial (Dinâmica Química Contemporânea LTDA). O grupo que somente recebeu a dieta padrão e água pura, foi considerado o controle do experimento.

### 3.5.1 Avaliação do consumo sólido e hídrico

O consumo sólido (ração), foi mensurado a cada 48 horas, como resultado da diferença de peso de cada gaiola, entre a última quantia ofertada e as respectivas sobras. O consumo hídrico de cada gaiola também foi mensurado a cada 48 horas, pesando as garrafas de hidratação antes e após este período, com subtração do

peso de cada uma, resultando na quantidade de líquido consumido (onde 1g = 1ml)<sup>129,130</sup>. Tais quantificações foram critérios importantes para acompanhamento evolutivo dos animais e interferência do protocolo aplicado. Ao final do período estabelecido de 11 semanas e após última pesagem, os animais foram mortos por decapitação, método que implica em menores interferências aos parâmetros analisados.

### **3.5.2 Avaliação da gordura visceral**

Após morte, os animais forem submetidos a dissecação da gordura visceral e isoladas as regiões: mesentérica, epididimal e retroperitoneal. Na sequência as amostras foram pesadas em balança analítica de elevada precisão e acondicionadas para congelamento a -80°C.

## **3.6 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS**

### **3.6.1 Dano oxidativo a lipídeos e a proteínas**

O dano oxidativo a lipídeos, na gordura epididimal e no hipotálamo, foi mensurado pelo método descrito por Draper e Hadley<sup>131</sup>, a partir da mensuração do conteúdo de TBARS. Durante uma reação de aquecimento em meio ácido a formação de TBARS é bem adotada como método de peroxidação lipídica. Nesta técnica, as amostras foram misturadas com 1 ml de ácido tricloroacético (10%) e 1 ml de ácido tiobarbitúrico (0,67%). Posteriormente, foram aquecidas em banho de água fervente (100°C) durante 30 min. Os equivalentes de MDA foram determinados pela absorbância em 532 nm, utilizando-se 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. A produção de MDA é comumente utilizado para quantificar a peroxidação lipídica<sup>118</sup>.

Como índice de peroxidação de lipídios foi verificada a formação de MDA, mensurado por cromatografia líquida de alta eficiência (Prominence Shimadzu em coluna Ascentis® C18, 250 x 2.1 mm, 5 µm, Supelco Sigma-Aldrich), conforme descrito por Grotto e colaboradores<sup>132</sup>.

O dano oxidativo em proteínas, na gordura epididimal e no hipotálamo, foi estimado a partir da mensuração de proteínas carboniladas por intermédio da reação

de grupamentos carbonilas em proteínas oxidadas, com base na reação com dinitrofenilhidrazina, a partir do método descrito por Levine et al<sup>133</sup>. Nesse as proteínas foram precipitadas por adição de ácido tricloroacético (20%) e dissolvidas em dinitrofenilhidrazina. A absorvância foi avaliada em 340 nm.

As análises foram normalizadas pelo conteúdo de proteínas, determinados pelo método de Lowry e colaboradores<sup>134</sup>. Os resultados foram expressos em nmol/mg proteína.

### **3.6.2 Atividades das enzimas antioxidantes**

A atividade da enzima antioxidante SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente, conforme descrito por Bannister e Calabrese<sup>135</sup>. A técnica se baseia na inibição da reação do radical  $O_2\bullet$  com a adrenalina, composto que se auto-oxida na variação de pH. A oxidação da adrenalina leva à formação de adrenocromo e a atividade da SOD foi então determinada a partir da mensuração de velocidade de formação do adrenocromo, determinada espectrofotometricamente a 480 nm, em um meio de reação contendo glicina-NaOH (50 mM em pH 10,2) e adrenalina 60 mM.

A atividade da enzima antioxidante CAT foi determinada pela medida da taxa de decaimento da absorvância do  $H_2O_2$  em 240nm, conforme técnica descrita por Aebi<sup>136</sup>. Nesta técnica, os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato (pH 7,4) e posteriormente, centrifugados por 10 min. Na sequência, a um meio de reação foi adicionado uma alíquota de amostra e 1mL de substrato contendo  $H_2O_2$  e tampão fosfato. As absorvâncias iniciais e finais foram registradas após 1 e 6 min, respectivamente.

Os resultados das atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT foram expressos em U/mg de proteína.

### **3.6.3 Metabolismo energético**

#### **3.6.3.1 Atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial**

A atividade do complexo I foi avaliada pelo método descrito por Cassina e Radi<sup>137</sup>, pela taxa de NADH-dependente da redução do ferricianeto. Um meio de

reação foi adicionado tampão fosfato de potássio 100 mM, ferricianeto 10 mM, NADH 14 mM, rotenona 2 mM e amostra. Após a adição de todos os reagentes com a amostra, a leitura foi realizada em espectrofotômetro de 1 em 1 min, durante 3 min, em 420 nM.

A atividade do complexo II foi elucidada pelo método descrito por Fischer e colaboradores<sup>138</sup>, pela diminuição da absorbância do 2,6-DCIP. A amostra foi adicionada a um meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 62,5 mM, succinato de sódio 250 mM e 2,6-DCIP 0,5 mM. Posteriormente, realizada incubação por 20 minutos a 30°C em banho-maria. Após a incubação foi adicionada azida sódica 100 mM, rotenona 2 mM e novamente 2,6-DCIP 0,5 mM, para então ser realizada leitura em espectrofotômetro de 1 em 1 min, por 5 min, em 600 nM.

A atividade do complexo IV foi determinada de acordo com a técnica descrita por Rustin e colaboradores<sup>139</sup> e calculada pela diminuição da absorbância gerada pela oxidação do citocromo-c reduzido. Em um meio de incubação foi adicionado tampão fosfato de potássio 62,5 mM, lauril maltosídeo 125 mM, amostra diluída com tampão SETH (Sacarose, EDTA, Trizma base e Heparina) e citocromo-c 1%, para então ser realizada leitura em espectrofotômetro de 1 em 1 min, por 10 min, em 550 nM.

Os resultados da atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial foram expressos em nmol/min x mg proteína.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do programa estatístico GraphPad Prism. O comparativo dos grupos foi determinado a partir da análise de variância (ANOVA) seguido pelo post hoc de Tukey. Os resultados foram apresentados em média  $\pm$  erro padrão e a significância estatística será considerada para valores de  $p < 0,05$ .

### 3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina (registro 17.005.4.01.IV). Além disso, todas as intervenções realizadas seguiram as normas expressas na Diretriz

Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica, publicada em 2016, pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo grupos randomizados e heterogêneos de camundongos machos de 40 dias, foram submetidos ao consumo exclusivo de diferentes concentrações de frutose. Após período de 11 semanas foram avaliadas as resultantes do ganho de peso corporal, do acúmulo da gordura visceral e suas frações, do estresse oxidativo, da atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, do consumo alimentar (sólido e líquido) e da quantidade de frutose ingerida.

A figura 09 apresenta a evolução do ganho de peso corporal dos animais ao longo do período e a partir do consumo das diferentes concentrações de frutose. Ressalta-se que o aumento de peso ocorreu de maneira proporcional ao longo do protocolo, em ambos os grupos, mas sem diferenças significativas entres as médias dos mesmos, mesmo ao final das 11 semanas de protocolo (figura 10).

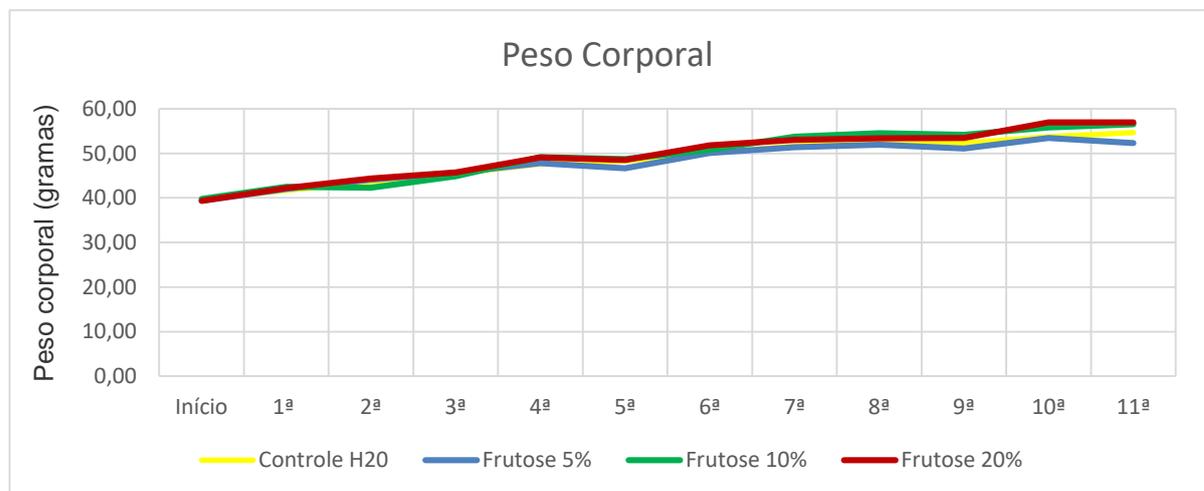


Figura 09 – Acompanhamento semanal do ganho de peso corporal de camundongos, submetidos ao consumo de diferentes concentrações de frutose (0%, 5%, 10% e 20%). Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão.

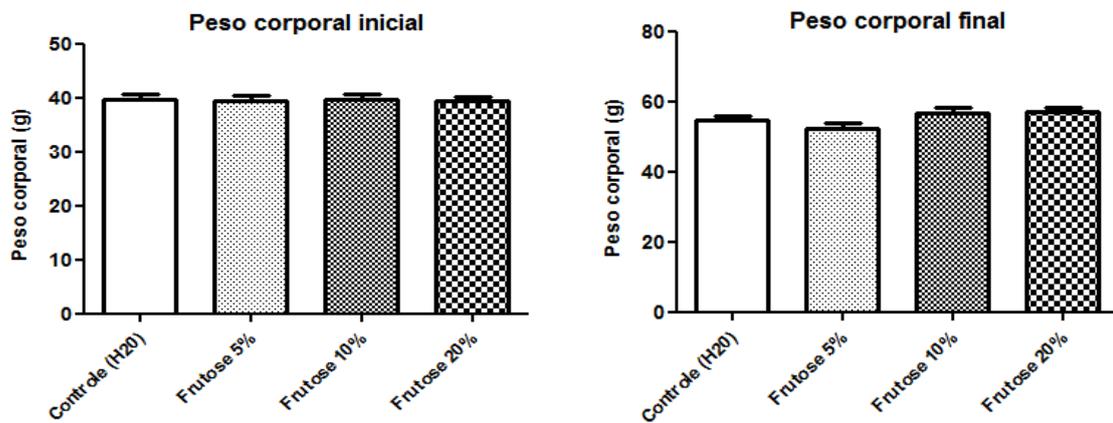


Figura 10 – Efeitos do consumo de diferentes concentrações de frutose no peso corporal de camundongos, no início e após 11 semanas de protocolo. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão.

O ganho de peso corporal com animais submetidos ao consumo de frutose, difere entre a grande variedade de protocolos existentes. No entanto, Lozano e colaboradores<sup>9</sup>, utilizando bebida com diluição de frutose a 25%, também não encontrou diferenças significativas no peso corporal de ratos, mesmo após um período de 8 meses. Em outro estudo, de Baena e colaboradores<sup>10</sup>, novamente com ratos e utilização de diluição de frutose a 15%, não foram encontradas diferenças significativas comparadas ao controle, após um período de 12 semanas. Estudos semelhantes ao presente, em que houvesse o comparativo da ingestão hídrica com com diferentes concentrações de frutose, inexistem ou não foram encontrados. Mesmo que o consumo de frutose possa desencadear alterações metabólicas sistêmicas, com envolvimento da EHNA e da maior disponibilidade de ácidos graxos, não se evidencia uma ingestão calórica excessiva, que contribua para o aumento de peso corporal.

Ainda em relação a mensuração dos componentes corporais, após morte e dissecação, foram pesadas as gorduras epididimal, retroperitoneal e mesentérica. Além da realização do somatório das três gorduras supracitadas, que resultou na gordura visceral total. A partir dos resultados foi possível constatar que, no comparativo com o grupo controle, a gordura visceral total aumentou de maneira significativa e com semelhança, tanto no grupo frutose 10% como no grupo frutose 20%. Já com o grupo frutose 5% não houve modificação adicional em relação ao grupo controle. Na quantificação da gordura epididimal, pode-se observar um reflexo

dos resultados obtidos na gordura visceral total, com aumento significativo nos grupos frutose 10% e frutose 20%, e sem diferenças significativas no grupo frutose 5%. O que não refletiu na gordura retroperitoneal e mesentérica, que mesmo com variação de peso, os grupos frutose 5%, frutose 10% e frutose 20%, não apresentaram acúmulo significativo, se comparado ao controle (figura 11).

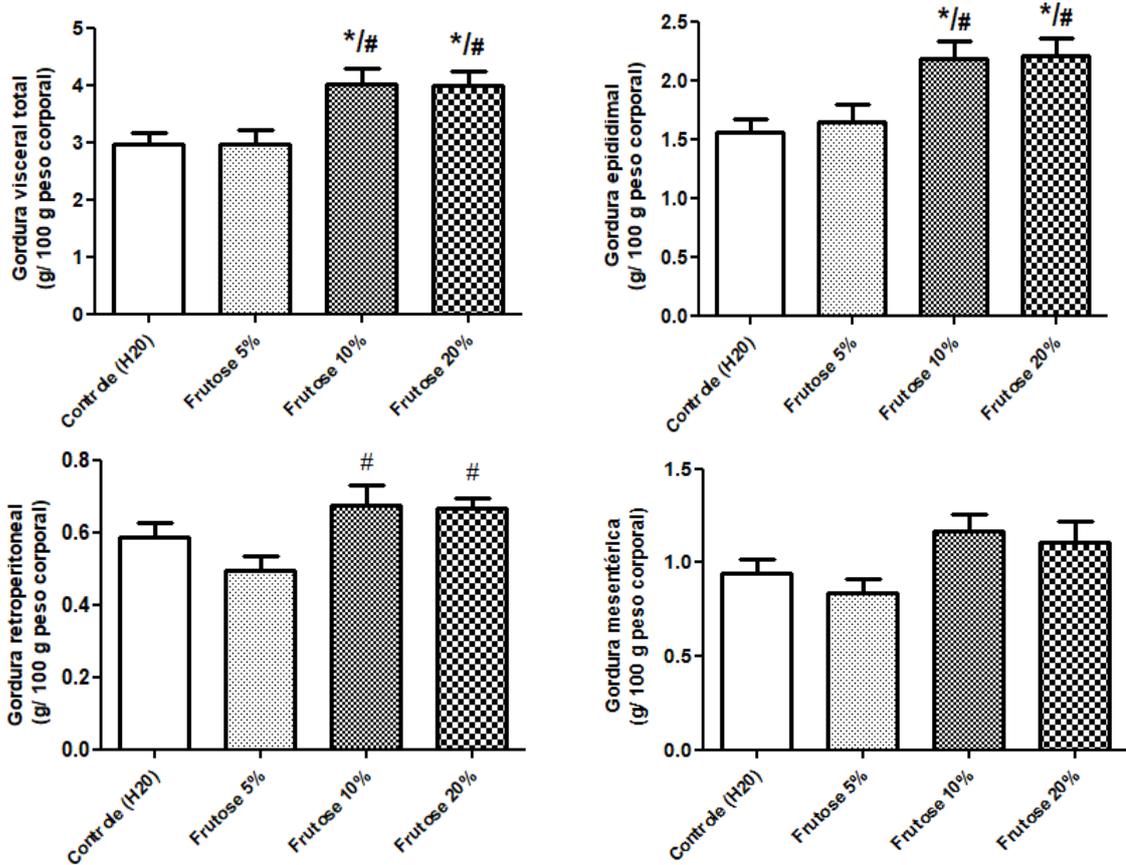


Figura 11 – Efeitos do consumo de diferentes concentrações de frutose no peso da gordura visceral e suas frações (epididimal, retroperitoneal e mesentérica). Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão; \* vs. Controle (H2O); # vs. Frutose 5%;  $p < 0.05$  (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

As relações entre o consumo de frutose e o aumento da gordura visceral, vem sendo ressaltadas tanto em roedores<sup>140</sup>, quanto em humanos<sup>141</sup>. Em um estudo conduzido por Zubiria e colaboradores<sup>142</sup>, com a utilização de ratos, o consumo hídrico com adicional de 10% de frutose, aumentou de maneira significativa o peso e o tamanho do tecido adiposo visceral, após um período de 3 semanas. Aumento no peso da gordura visceral que também foi encontrado por Baena e colaboradores<sup>10</sup>,

com a utilização de 15% de frutose e período de 12 semanas. Esses dados vão ao encontro da conclusão de Zubiria e colaboradores<sup>143</sup>, que relatou um maior percentual de células hipertrofiadas e de novas células com menor diâmetro, com a utilização de frutose a 10% de diluição, por um período de 56 dias. Sugerindo que a expansão do tecido visceral com o consumo de frutose, pode ocorrer tanto pela hipertrofia quanto pela adipogênese celular. No estudo conduzido por Ramos e colaboradores<sup>144</sup>, com a utilização de ratos submetidos ao consumo hídrico de frutose a 20%, também foi encontrado um aumento significativo da gordura epididimal, se comparado ao controle, após período de 90 dias. Achados semelhantes, com aumento da gordura epididimal em ratos, submetidos ao consumo sólido composto por 30% de frutose, foram encontrados por Crescenzo e colaboradores<sup>46</sup>, após período de 8 semanas.

O aumento do conteúdo de gordura corporal, a partir de dietas com elevado teor de frutose, está relatado em partes<sup>145</sup>, como uma consequência do aumento da lipogênese hepática. O próprio metabolismo hepático da frutose, além de aumentar a lipogênese local, acaba por contribuir para uma maior liberação de ácidos graxos para a corrente sanguínea, que consequentemente, poderão induzir a formação dos adipócitos<sup>146</sup>. Além disso, já foi identificado uma maior competência de precursores de células adiposas – mRNA, com o consumo aumentado de frutose. Sugerindo, que essa via poderia ser responsável pelo surgimento de novas populações de adipócitos em ratos submetidos ao maior consumo de frutose<sup>147</sup>. No entanto, os estudos não descrevem a particularidade da frutose em relação ao aumento da gordura epididimal. Portanto dietas com elevada concentração de frutose podem contribuir para alterações no metabolismo dos lipídeos e para o desenvolvimento de doenças como a obesidade, assim como ocorre em dietas hiperlipídicas.

Ao relatar uma expansão ou aumento do tecido adiposo corporal, se pressupõe o desencadeamento de diferentes alterações teciduais, podendo citar a hipóxia, a morte de células adipocitárias e a desregulação dos fluxos de ácidos graxos<sup>87</sup>. Estas podem ordenar um maior recrutamento de macrófagos, necessários na remodelação tecidual, que acabam por aumentar o estado de inflamação crônica de baixo grau<sup>11,148</sup>. Tanto a inflamação como um aumento da disponibilidade de ácidos graxos para as mitocôndrias dos próprios adipócitos, podem levar a uma maior produção de EROs e contribuir para o desencadeamento do estresse oxidativo<sup>149</sup>.

Na avaliação do estresse oxidativo na gordura epididimal, escolha baseada nos aumentos significativos acima declarados, foram analisados parâmetros que contemplassem tanto o dano oxidativo quanto uma fração do potencial de defesa antioxidante, frente ao consumo das diferentes concentrações de frutose. Em relação ao dano a lipídeos, houve uma tendência ao aumento de TBARS (refletindo o conteúdo de malondialdeído) nos grupos frutose 10% e frutose 20%, mas sem alcance de significância estatística. Já o grupo frutose 5% não apresentou diferença ou tendência ao aumento do mesmo parâmetro. Em relação ao dano a proteínas (expresso pelo conteúdo de proteínas carboniladas), o grupo frutose 5% apresentou uma redução significativa em relação ao controle, o que pode ser considerado um efeito protetor ou resposta frente as enzimas antioxidantes. Já os grupos frutose 10 e 20%, não apresentaram valores que os diferenciasssem do grupo controle (figura 12).

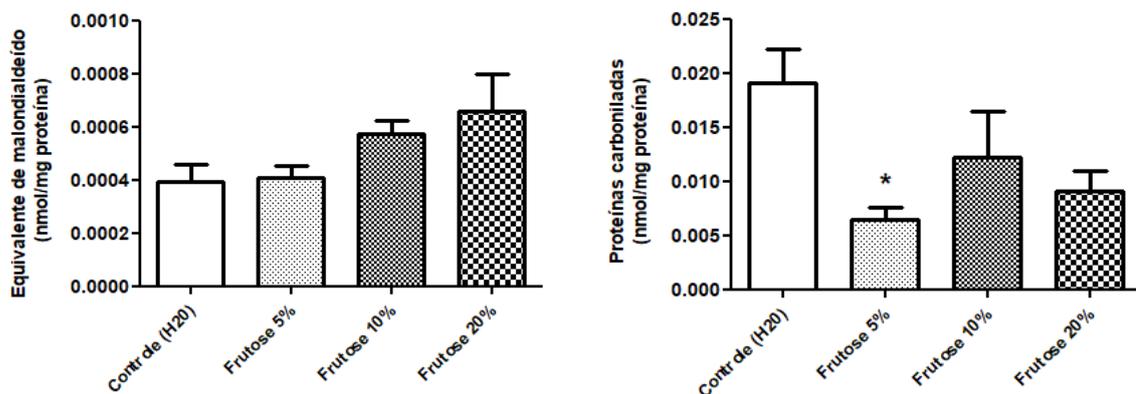


Figura 12 – Efeitos do consumo de diferentes concentrações de frutose no dano oxidativo na gordura epididimal. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão; \* vs. Controle (H2O);  $p < 0.05$  (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

Não foram encontrados estudos com avaliação do dano a lipídeos e proteínas, na gordura epididimal, a partir do consumo de diferentes concentrações de frutose. Com a utilização de uma ração rica em frutose (60%), Chou e colaboradores<sup>150</sup> encontraram um aumento significativo de MDA na gordura epididimal, retroperitoneal e mesentérica, se comparado ao controle e após 8 semanas de experimento. Achados que podem contribuir para o esclarecimento, da tendência observada no presente estudo, onde a maior quantidade de frutose consumida foi responsável pelo maior dano a lipídeos.

Dos mecanismos de defesa antioxidantes avaliados, no grupo 5% a atividade da SOD apresentou-se aumentada significativamente, se comparado ao controle. O que pode ter gerado um menor potencial de dano a proteínas no mesmo grupo, conforme expresso anteriormente. Nos demais (frutose 10% e frutose 20%), não foram encontradas diferenças significativas. Na avaliação da CAT, houve uma redução de atividade, semelhante nos grupos frutose 5%, frutose 10% e frutose 20%. Porém, não alcançaram patamares numéricos para diferenças significativas estatisticamente (figura 13).

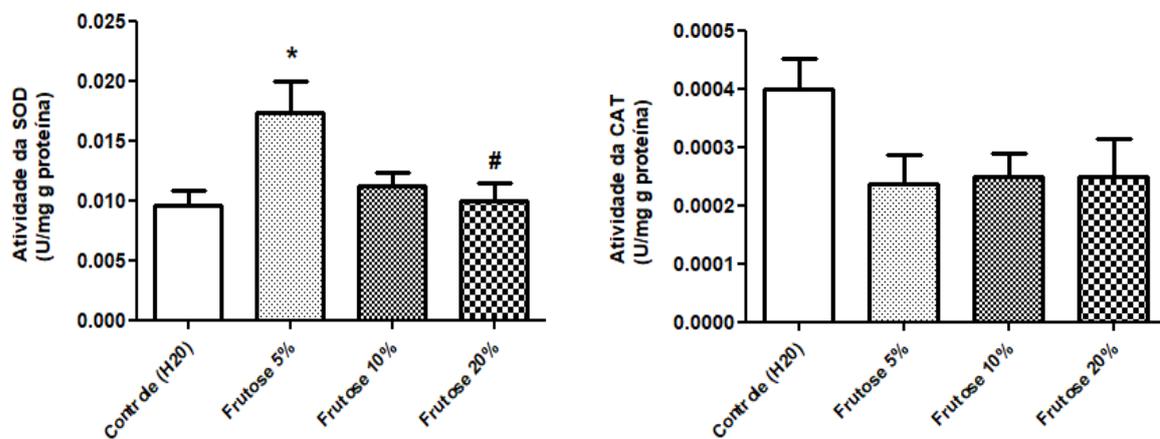


Figura 13 – Efeitos do consumo de diferentes concentrações de frutose sobre a atividade das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) na gordura epididimal. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão; \* vs. Controle (H2O); # vs. Frutose 5%;  $p < 0.05$  (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

No processo de dano celular, dependendo do potencial oxidante ocasionado pelas EROs, as células podem promover sua sobrevivência com um aparato antioxidante (incluindo as atividades das enzimas SOD e CAT) ou induzir a apoptose celular, quando as respostas antioxidantes não se equiparam a ação oxidante<sup>116</sup>. Não foram encontrados na literatura, dados de estresse oxidativo na gordura epididimal, após ingestão hídrica com diluição de concentrações de frutose e possível explicação para o efeito protetor observado no grupo frutose 5%. Chou e colaboradores<sup>150</sup>, utilizando ração com elevado percentual de frutose (60%) encontrou aumento significativo de MDA e diminuição da SOD, na gordura epididimal de ratos após 8 semanas, o que configurou a presença do estresse oxidativo.)

O estresse oxidativo, dentro das flutuações de produção das EROs, pode alterar o potencial da membrana mitocondrial e contribuir para a diminuição da respiração celular, com inibição dos complexos de sua cadeia<sup>152</sup>. Além disso, a hipertrofia do tecido adiposo, assim como uma maior demanda de nutrientes energéticos, podem contribuir para a disfunção mitocondrial<sup>153</sup>. Portanto, no presente estudo, também foram analisados a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial na gordura epididimal, a partir da ingestão hídrica com diferentes diluições de frutose.

Na avaliação do complexo I, não foram encontradas modificações significativas entre os grupos. A atividade do complexo II se elevou significativamente e de maneira crescente, nos grupos frutose 5%, frutose 10% e frutose 20%, respectivamente. Nesse sentido, observa-se que o aumento da concentração de frutose nas bebidas, influenciou no aumento da atividade complexo II. Por último, a atividade do complexo VI diminuiu de maneira significativa e semelhante, nos grupos frutose 5%, frutose 10% e frutose 20%, se comparado ao controle (figura 14).

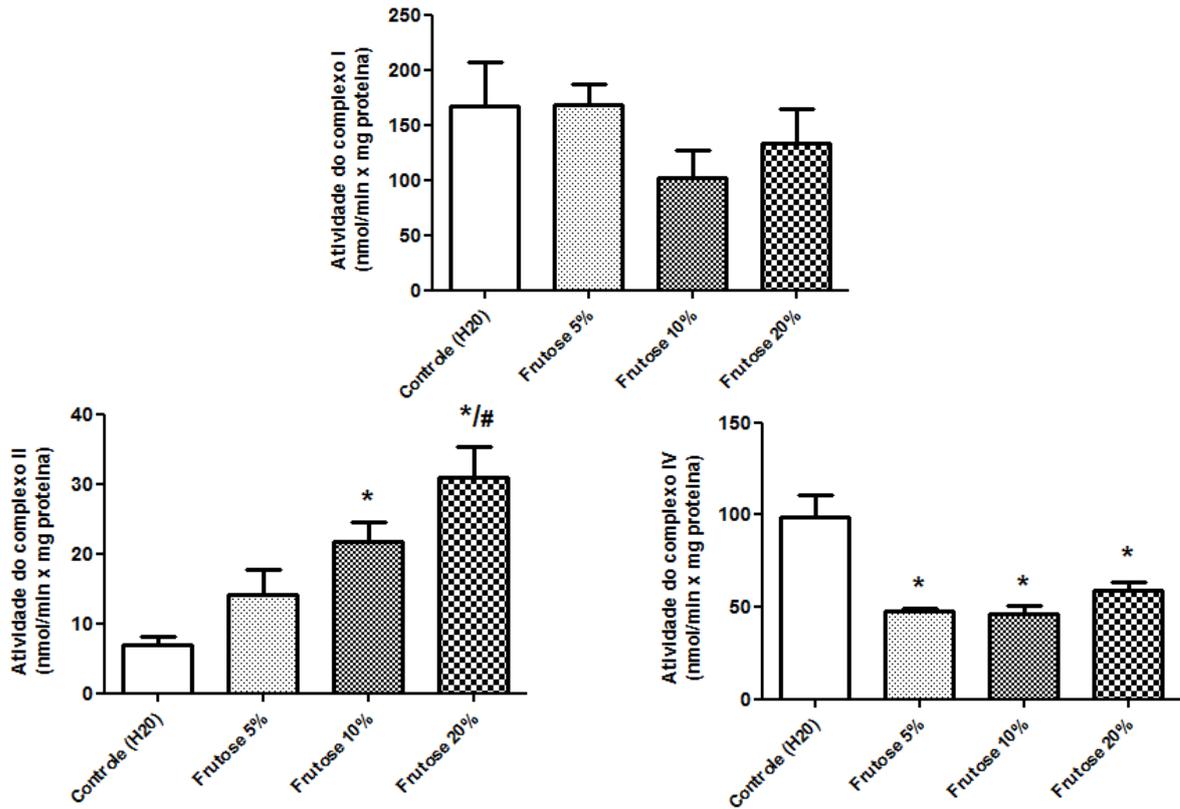


Figura 14 – Efeitos do consumo de diferentes concentrações de frutose sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, na gordura epididimal. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão; \* vs. Controle (H2O); # vs. Frutose 5%;  $p < 0.05$  (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

O aumento da atividade do complexo II e diminuição do complexo IV, pode refletir em uma sobrecarga de elétrons regionalizada, que pode possibilitar ao aumento na produção do radical  $O_2^\bullet$ . Dessa forma é possível sugerir, que o consumo de frutose nos grupos 10% e frutose 20%, foi responsável pela geração de um desequilíbrio entre os complexos da cadeia respiratória mitocondrial, que pode ter contribuído para o aumento tendencioso do conteúdo de MDA, em ambos. Alterações no transporte de elétrons, vão aumentar a produção do radical  $O_2^\bullet$  e seu posterior desmembramento, pode originar o  $H_2O_2$ , que ainda pode reagir para formar o radical  $OH^\bullet$ <sup>103,154</sup>. Causando assim possíveis danos aos componentes mitocondriais e iniciando processos de degeneração, com possibilidade de uma série de doenças. Não foram encontrados estudos com análise da atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial na gordura epididimal, após consumo de frutose. Macongond e colaboradores<sup>151</sup>, analisaram a atividade dos complexos I, II e IV, no fígado, rins, músculo esquelético e córtex cerebral, após uma única

injeção subcutânea de frutose (0,9 mg/g). O complexo I teve aumento significativo no fígado, os demais complexos não apresentaram diferenças estatísticas ou substanciais entre os órgãos.

Das análises bioquímicas realizadas na gordura epididimal, foi possível constatar um indício de estresse oxidativo nos grupos 10 e 20%, mas sem demonstração de clareza nos cálculos estatísticos e no balanço, entre o potencial de lesão oxidante e as respostas antioxidantes. Enquanto que no grupo frutose 5%, os resultados apontaram o contrário, com um possível efeito protetor. Na avaliação dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, foi possível a constatação na alteração de 2 complexos (II e IV), que podem contribuir para uma disfunção mitocondrial e aumento do estresse oxidativo, mesmo que os resultados não tenham demonstrado total elucidação.

Como já ressaltado anteriormente, alterações decorrentes do aumento do tecido adiposo, podem significar a liberação de mediadores inflamatórios, ao nível sistêmico<sup>155</sup>. Importantes achados<sup>156,157</sup>, descrevem a existência de um maior recrutamento imunológico para o SNC, a partir do aumento do tecido adiposo, de seus processos inflamatórios e da maior oferta de ácidos graxos. Além disso, o metabolismo da frutose no SNC já vem sendo descrito<sup>55,56,158</sup>, e seu consumo excessivo pode estar associado, a alterações no SNC, direcionadas principalmente, para inadequações dos mecanismos de saciedade<sup>70,159</sup>. Dentro desse contexto, destaca-se o hipotálamo como uma região do SNC, responsável pelo sinergismo do controle de ingestão alimentar e pelo fato de estar posicionado em uma estrutura circumventricular, possui uma maior susceptibilidade aos conteúdos transmitidos pela via sanguínea<sup>160</sup>.

Os mesmos parâmetros de dano oxidativo avaliados na gordura epididimal, também foram mensurados no hipotálamo dos camundongos. Houve um aumento significativo de TBARS nos grupos frutose 10% e frutose 20%, se comparados ao controle. Evidenciando, que o consumo nesses formatos potencializou o dano a lipídeos. Fato que não ocorreu com o grupo frutose 5%. Na avaliação do dano a proteínas, o grupo frutose 10% apresentou a maior formação de proteínas carboniladas dentre todos os grupos estudados, com aumento significativo em relação ao controle, frutose 5% e frutose 20% (figura 15).

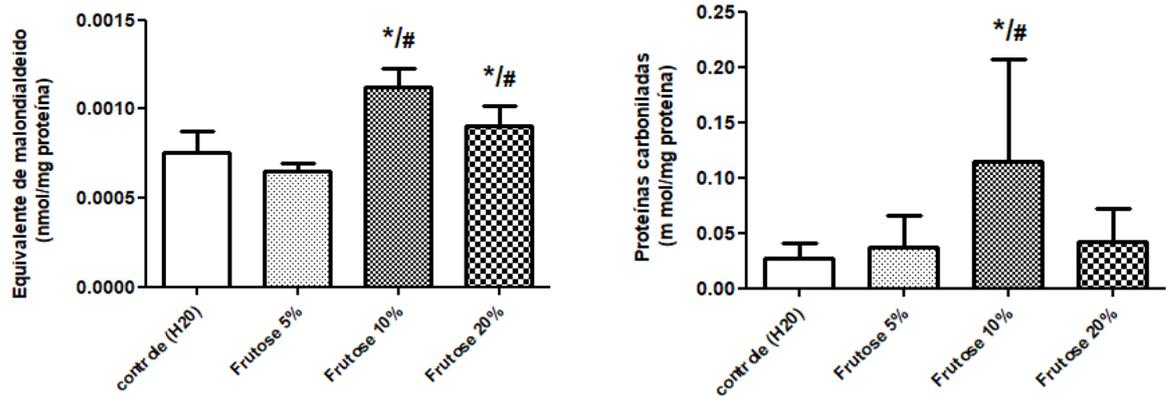


Figura 15 – Efeitos do consumo de diferentes concentrações de frutose no dano oxidativo no hipotálamo. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão; \* vs. Controle (H2O); # vs. Frutose 5%;  $p < 0.05$  (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

Na avaliação da SOD no hipotálamo, mesmo que o grupo frutose 20% tenha apresentada a maior atividade, não foi suficiente para gerar diferenças estatísticas, o que também ocorreu nos demais grupos. Em relação a atividade da CAT tanto o grupo frutose 10% como o grupo frutose 20%, apresentam aumento significativo se comparado ao controle e ao grupo frutose 5% (figura 16).

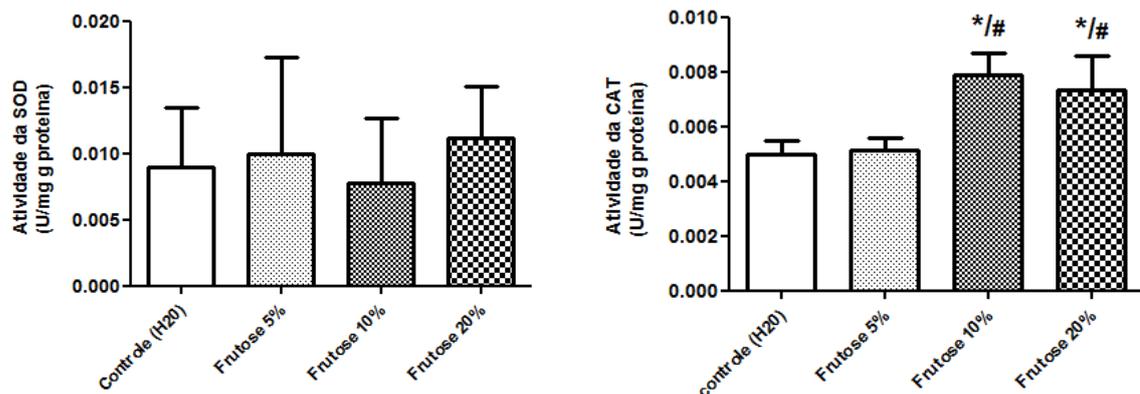


Figura 16 – Efeitos do consumo de diferentes concentrações de frutose na atividade das enzimas antioxidantes (SOD e CAT), no hipotálamo. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão; \* vs. Controle (H2O); # vs. Frutose 5%;  $p < 0.05$  (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

A partir dos resultados encontrados do dano oxidativo e na atividade das enzimas antioxidantes, foi possível constatar o acometimento do estresse oxidativo

no hipotálamo, frente aos protocolos de ingestão hídrica, com frutose a 10% e a 20% de diluição. Na presença do estresse oxidativo no hipotálamo, é possível a associação mútua de uma inflamação hipotalâmica<sup>161</sup>. Essa já destacada por Li e colaboradores<sup>17</sup>, onde a utilização de frutose a 10%, por um período de 8 semanas, aumentou significativamente a expressão dos marcadores inflamatórios TLR4 e NF- $\kappa$ B, além de citocinas pró-inflamatórias, no hipotálamo de ratos. Não foram encontrados estudos que descrevessem parâmetros de estresse oxidativo no hipotálamo a partir do consumo de frutose. Portanto, esse é o primeiro estudo que relata parâmetros de estresse oxidativo no hipotálamo, a partir da ingestão hídrica com diferentes concentrações de frutose. Yin e colaboradores<sup>162</sup>, relataram que o consumo de uma bebida com frutose a 10% de diluição por 10 semanas, aumentou o estresse oxidativo no hipocampo e no córtex cerebral, ambos os tecidos apresentaram aumento significativo de MDA e de proteínas carboniladas. Lopes e colaboradores<sup>118</sup>, utilizando uma única injeção subcutânea de frutose (0,9 mg/g), relataram o estresse oxidativo no córtex cerebral, a partir do aumento significativo de MDA e de proteínas carboniladas. Amri e colaboradores<sup>163</sup>, com a utilização de uma dieta rica em gordura animal (15% do total) e frutose (15% do total), indicaram a presença do estresse oxidativo no cérebro de ratos, após transcorridas 12 semanas. Também descritos pelo aumento de MDA e de proteínas carboniladas.

Novamente, ressalta-se a importância da associação entre o estresse oxidativo, com possíveis alterações mitocondriais<sup>153</sup>. Por possuir uma elevada demanda energética, o tecido cerebral é estritamente dependente da respiração mitocondrial. No entanto, se apresenta com elevado risco de dano, frente ao aumento do estresse oxidativo e de quadros de insuficiência energética<sup>164</sup>. Nesse contexto, portanto, foi avaliada a atividade dos complexos I, II e IV, da cadeia respiratória mitocondrial, com intuito de encontrar indícios de disfunção.

Dos achados deste estudo em relação a atividade dos complexos da cadeia respiratória no hipotálamo, não ocorreram diferenças significativas do complexo I e II. Mesmo com aumento da atividade do complexo I nos grupos frutose 5 e 10%, os valores não foram suficientes para diferenças estatísticas. No complexo IV houve uma maior atividade no grupo frutose 5% e uma menor atividade significativa no grupo 20%, se comparado ao mesmo grupo. No entanto, em relação ao controle, em nenhum dos parâmetros foram encontradas diferenças significativas (figura 17).

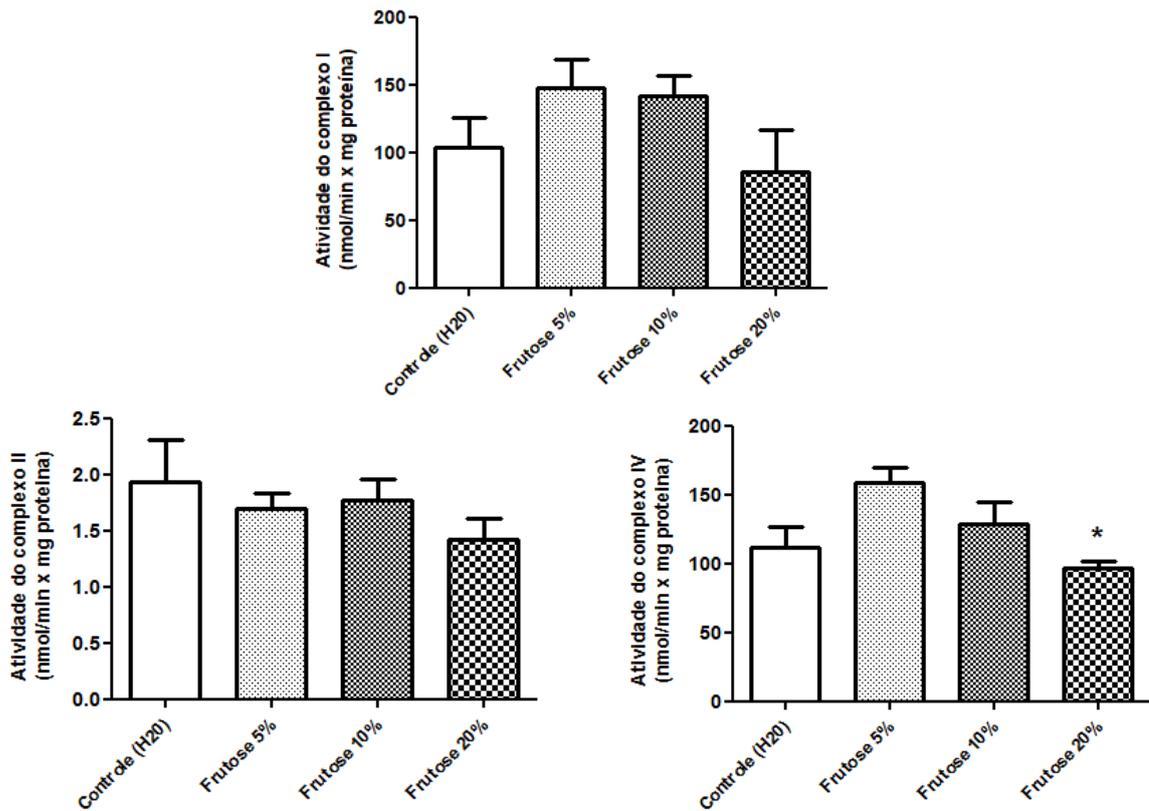


Figura 17 – Efeitos do consumo de diferentes concentrações de frutose sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial no hipotálamo. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão; # vs. Frutose 5%;  $p < 0.05$  (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

Não foram encontrados estudos que relatassem a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial no hipotálamo, a partir do consumo de frutose. Novamente os achados desses parâmetros no presente estudo, são os primeiros a serem declarados. Macongond e colaboradores<sup>151</sup>, com a utilização de uma única injeção subcutânea de frutose (0.9 mg/ g peso corporal), não encontraram diferenças significativas em ambos os complexos (I, II e IV), no córtex cerebral de ratos. Sil e colaboradores<sup>165</sup>, avaliaram o fígado de ratos com um consumo de ração rica em frutose (60%), por um período de 8 semanas. Na atividade do complexo I não foram encontradas diferenças significativas e na atividade do complexo IV, relataram uma diminuição significativa, se comparada ao controle. São escassos na literatura, os argumentos que possam justificar a ausência de alteração na atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial no hipotálamo, frente ao consumo de frutose. É possível que, mesmo com elevadas concentrações de frutose circulante, o

seu menor metabolismo na região cerebral, possa não ser responsivo a alterações dos complexos. Ainda que, uma pequena quantidade possa já desencadear alterações que configurem um estresse oxidativo.

Mesmo que não tenham sido evidenciadas alterações mitocondriais no hipotálamo dos animais, com a avaliação dos complexos, a presença do estresse oxidativo pode subjugar o acometimento de alterações funcionais, com possível reflexo no comportamento alimentar. Após protocolo de 11 semanas com ingestão hídrica constante das diferentes concentrações de frutose, foi avaliado o consumo alimentar médio dos animais de cada grupo. O consumo alimentar sólido correspondeu a ingestão de ração e o consumo hídrico, inclui a ingestão total de líquidos, em cada grupo. Foram observadas diminuições significativas no consumo sólido nos grupos frutose 10% e frutose 20%, se comparados ao controle (H2O) e ao grupo frutose 5%. No consumo líquido, essa diminuição alimentar foi compensada, com aumento significativo de consumo, nos mesmos grupos, frutose 10% e frutose 20% (figura 18), também comparados ao controle (H2O) e frutose 5%.

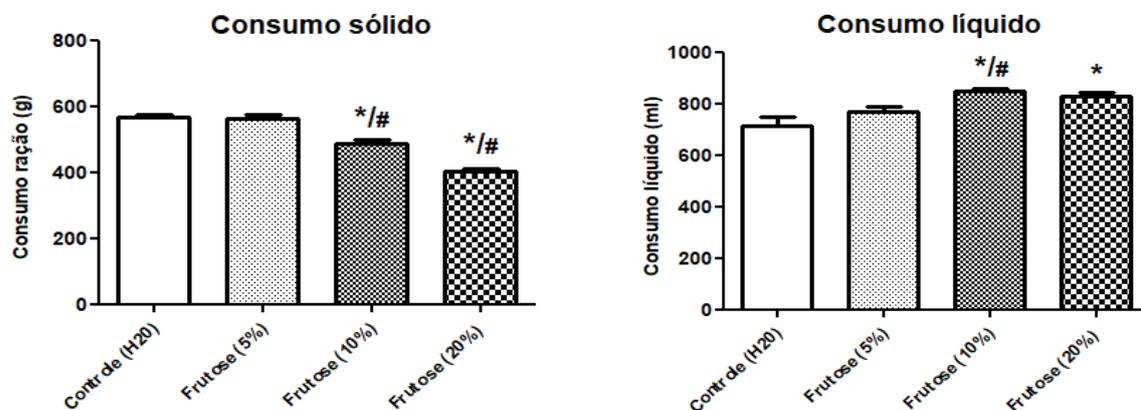


Figura 18 – Avaliação do consumo alimentar (sólido e líquido) de camundongos, submetidos a ingestão hídrica, com diferentes concentrações de frutose, e após período de 11 semanas. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão por animal e grupo; \* vs. Controle (H2O); # vs. Frutose 5%;  $p < 0.05$  (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

Achados da literatura destacam que a frutose pode interferir na ingestão de alimentos, por intermédio de danos no hipotálamo, gerados por estresse oxidativo e inflamação<sup>127,166,167</sup>. Marcadores de inflamação e de estresse oxidativo, já podem ser

vinculados a alterações no hipotálamo e gerar inadequações nos mecanismos de sinalização da insulina e da leptina<sup>168</sup>. Além disso, a própria frutose pode modular a ativação neuronal na região do hipotálamo e influenciar nos mecanismos de saciedade<sup>169</sup>. Em um menor período de tempo (2 semanas), o estudo conduzido por Lindqvist e colaboradores<sup>170</sup> e com a utilização de uma bebida com solução de frutose a 23%, também encontraram um consumo sólido menor e um líquido maior, se comparados ao grupo controle. Dados semelhantes encontrados por Ramos e colaboradores<sup>144</sup>, que utilizando frutose a 20% de diluição e por um período de 60 dias, também encontraram diminuição da ingestão sólida e aumento da líquida. A partir destes resultados e de seus comparativos, se faz provável uma relação, entre a maior palatabilidade dos líquidos com maior percentual de frutose e de possíveis alterações hipotalâmicas, frente a sua maior expressão sanguínea. O que pode contribuir paralelamente, para uma possível inadequação dos mecanismos de saciedade e favorecer para o aumento da ingestão.

A partir dos dados de consumo alimentar, foi possível mensurar a quantidade média de frutose (em gramas), consumida por cada que cada animal, ao final das 11 semanas de protocolo. Ocorreram diferenças significas entre todos os grupos, com aumento gradativo do total de frutose em relação aos grupos 5%, 10% e 20%, respectivamente. O grupo frutose 20% apresentou o maior consumo, refletindo a sua maior ingestão hídrica e seu maior percentual de diluição (figura 19).

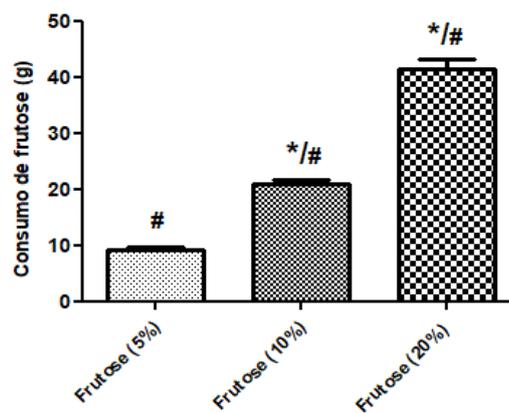


Figura 19 – Avaliação do consumo total de frutose por camundongos, submetidos a ingestão hídrica, com diferentes concentrações de frutose, e após período de 11 semanas. Valores expressos em média  $\pm$  EPM por animal e grupo; \* vs. Frutose (5%); # vs. demais grupos;  $p < 0.05$  (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

O somatório e análise dos resultados aqui apresentados, puderam dimensionar alterações corporais desencadeadas pelo consumo de frutose. Mesmo não havendo diferenças significativas no peso corporal dos animais, a gordura visceral se apresentou elevada frente as maiores quantidades ingeridas de frutose. Além disso, a própria distribuição da gordura acumulada ao longo das 11 semanas, demonstrou uma maior especificidade para a gordura epididimal. Na análise dessa, não foi declarada a presença do estresse oxidativo, mas os resultados de TBARS, expressam uma tendência ao dano a lipídeos, frente ao consumo das maiores quantidades e volume de frutose (10 e 20%). Fato que pode ter sido reflexo dos achados de alteração mitocondrial, a partir do aumento da atividade do complexo II e diminuição do complexo IV, nos grupos frutose 10 e 20%.

No hipotálamo dos animais se constatou a presença do estresse oxidativo, com indicativo de dano a lipídeos nos grupos frutose 10% e frutose 20%, e com dano a proteínas no grupo 10%. Nesse formato foi possível revelar de maneira inédita, o comportamento dos parâmetros de estresse oxidativo no hipotálamo, frente ao consumo de diferentes quantidades de frutose. Fato que evidencia ainda mais, a participação da frutose no metabolismo cerebral e na homeostase do hipotálamo. Na avaliação dos complexos da cadeia respiratória, não foram encontradas diferenças pertinentes entre os grupos.

Ao avaliar os dados de consumo alimentar (sólido e líquido) dos animais, foi possível constatar que os grupos que consumiam mais líquidos, diminuíram proporcionalmente, sua ingestão sólida. Os grupos frutose 10% e frutose 20%, apresentaram um aumento significativo de consumo líquido, se comparado aos grupos controle (H<sub>2</sub>O) e frutose 5%. O que pode já ser um indício, de alterações hipotalâmicas resultantes do estresse oxidativo encontrado, contribuindo negativamente aos mecanismos de controle alimentar.

Os resultados obtidos nessa dissertação, podem sinalizar para novos paradigmas dentro de um contexto dietético. Ao constatar, importantes indícios de alterações cerebrais, desencadeados pelo consumo de frutose, se faz necessário uma ampla discussão, centrada principalmente, na disponibilidade de seu consumo. Sabe-se que os modelos dietéticos atuais, disponibilizam a frutose de maneira demasiada e com elevados níveis de processamento industrial, que podem estar colaborando para a progressão de doenças metabólicas, como a obesidade. Achados aqui descritos, fomentam para a relação da frutose com alterações

bioquímicas no hipotálamo, que podem ser pertinentes ao pior prognóstico da doença. Dessa forma, um hábito alimentar que popularmente não se associa a doenças do SNC, pode significar uma progressão negativa de funcionamento, degeneração e morte celular.

## 5. CONCLUSÃO

Com os dados apresentados no presente trabalho, foi possível avaliar alguns efeitos bioquímicos na gordura epididimal e no hipotálamo de camundongos, submetidos a ingestão hídrica contínua de frutose e com diferentes concentrações. Além disso, foram levantadas informações comparativas do ganho de peso corporal, do acúmulo de gordura visceral e do consumo alimentar (sólido e líquido), frente aos diferentes consumos de frutose.

Conclui-se que, o consumo das maiores concentrações de frutose (10 e 20%), influenciaram no aumento do dano oxidativo no hipotálamo, mas sem apresentar alterações significativas na atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial. Na gordura epididimal, novamente os grupos que consumiram as maiores concentrações de frutose (10 e 20%), apresentaram um aumento tendencioso ao dano a lipídios (TBARs), e um desequilíbrio entre os complexos da cadeia respiratória mitocondrial. Não foram encontradas diferenças no ganho de peso corporal, ao final das 11 semanas, no entanto, os grupos frutose 10% e 20%, aumentaram de maneira significativa a gordura epididimal e conseqüentemente, a gordura visceral. No comparativo do consumo alimentar, os grupos frutose 10 e 20%, diminuíram de forma linear o consumo sólido e aumentaram a ingestão hídrica. Fato que acabou por impulsionar diferenças de quantidade de frutose consumida ao longo do experimento, com maior valor encontrado no grupo 20%, seguidos dos grupos frutose 10% e frutose 20%, respectivamente.

Esses resultados evidenciam que o consumo excessivo de frutose, muito comum em diferentes populações, pode gerar danos bioquímicos na gordura epididimal e principalmente, na região do hipotálamo. Que acaba por controlar uma série de mecanismos fisiológicos, incluindo fatores de saciedade. Além de outros malefícios já declarados, como a obesidade, a esteatose hepática não alcoólica e a síndrome metabólica. Nesse contexto, novas diretrizes para o consumo de frutose, principalmente originária de produtos industrializados, podem ser implementadas e atribuídas a saúde preventiva.

Estudos futuros poderiam avaliar o estresse oxidativo em outras regiões do cérebro e elucidar possíveis alterações de memória e/ou comportamento, frente ao

consumo das diferentes concentrações de frutose. Além, da utilização do protocolo e resultados aqui expressos, para a verificação do potencial antioxidante de extratos de plantas e de nutrientes isolados.

## REFERÊNCIAS

1. Popkin B, Gordon-Larsen P. The nutrition transition: worldwide obesity dynamics and their determinants. *Int J Obes.* 2004; 28:2–9.
2. Popkin BM. The Nutrition Transition in the Developing World. *Dev Policy Rev.* 2003; 21(5–6):581–97.
3. Popkin BM. Contemporary nutritional transition: determinants of diet and its impact on body composition. *Proc Nutr Soc.* 2011; 70(1):82–91.
4. Le K, Introduction I. Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity. *Physiol Ver.* 2010; 90(1):23–46.
5. Tappy L, Lê K-A. Health effects of fructose and fructose-containing caloric sweeteners: where do we stand 10 years after the initial whistle blowings? *Curr Diab Rep.* 2015; 15(8):54.
6. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer A a, Graham JL, et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increase visceral adiposity and lipids and decrease insulin sensitivity in overweight/obese men. *J Clin Invest.* 2009; 1334(5):1322–34.
7. Rosset R, Surowska A, Tappy L. Pathogenesis of Cardiovascular and Metabolic Diseases: Are Fructose-Containing Sugars More Involved Than Other Dietary Calories? *Curr Hypertens Rep.* 2016; 18(6):44.
8. Bray GA, Popkin BM. Dietary Sugar and Body Weight: Have We Reached a Crisis in the Epidemic of Obesity and Diabetes? *Diabetes Care.* 2014; 37(4):950–6.
9. Lozano I, Van der Werf R, Bietiger W, Seyfritz E, Peronet C, Pinget M, et al. High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. *Nutr Metab.* 2016; 13(1):15.
10. Baena M, Sangüesa G, Hutter N, Beltrán JM, Sánchez RM, Roglans N, et al. Liquid fructose in Western-diet-fed mice impairs liver insulin signaling and causes cholesterol and triglyceride loading without changing calorie intake and body weight. *J Nutr Biochem.* 2017; 40:105–15.
11. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest.* 2011; 121(6):2094–101.
12. Agrawal R, Noble E, Vergnes L, Ying Z, Reue K, Gomez-Pinilla F. Dietary fructose aggravates the pathobiology of traumatic brain injury by influencing energy homeostasis and plasticity. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015.
13. Lustig RH, Schmidt L a., Brindis CD. Public health: The toxic truth about sugar. *Nature.* 2012; 482(7383):27–9.

14. Jaiswal N, Maurya CK, Arha D, Avisetti DR, Prathapan A, Raj PS, et al. Fructose induces mitochondrial dysfunction and triggers apoptosis in skeletal muscle cells by provoking oxidative stress. *Apoptosis*. 2015; 20(7):930–47.
15. Oppelt SA, Zhang W, Tolan DR. Specific regions of the brain are capable of fructose metabolism. *Brain Res*. 2017; 1657:312–22.
16. Wilder-Smith CH, Li X, Ho SS, Leong SM, Wong RK, Koay ES, et al. Fructose transporters GLUT5 and GLUT2 expression in adult patients with fructose intolerance. *United Eur Gastroenterol J*. 2014; 2(1):14–21.
17. Li J-M, Ge C-X, Xu M-X, Wang W, Yu R, Fan C-Y, et al. Betaine recovers hypothalamic neural injury by inhibiting astrogliosis and inflammation in fructose-fed rats. *Mol Nutr Food Res*. 2015; 59(2):189–202.
18. Dekker MJ, Su Q, Baker C, Rutledge AC, Adeli K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *AJP Endocrinol Metab*. 2010; 299(5):E685–94.
19. Page KA, Chan O, Arora J, Belfort-Deaguiar R, Dzuira J, Roehmholdt B, 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.
20. Ross AP, Bartness TJ, Mielke JG, Parent MB. A high fructose diet impairs spatial memory in male rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2009; 92(3):410–6.
21. Englyst HN, Hudson GJ. The classification and measurement of dietary carbohydrates. *Food Chem*. 1996; 57(1):15–21.
22. Popkin BM, Adair LS, Ng SW. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr Rev*. 2012; 70(1):3–21.
23. Swinburn BA, Caterson I, Seidell JC, James WPT. Diet, nutrition and the prevention of excess weight gain and obesity. *Public Health Nutr*. 2004; 7(1A):123–46.
24. Bray GA, Popkin BM. Dietary Sugar and Body Weight: Have We Reached a Crisis in the Epidemic of Obesity and Diabetes? *Diabetes Care*. 2014; 37(4):950–6.
25. Havel PJ. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev*. 2005; 63(5):133–57.
26. White JS. Challenging the Fructose Hypothesis: New Perspectives on Fructose Consumption and Metabolism. *Adv Nutr An Int Rev J*. 2013; 4(2):246–56.
27. Tappy L, Le K-A. Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity. *Physiol Rev*. 2010; 90(1):23–46.

28. WHO| Guideline Sugars intake for adults and children i Sugars intake for adults and children. Acesso em 02/09/2017. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/149782/1/9789241549028\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/149782/1/9789241549028_eng.pdf?ua=1)
29. Tappy L, Lê K-A. Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity. *Physiol Rev.* 2010; 90(1).
30. Douard V, Ferraris RP. The role of fructose transporters in diseases linked to excessive fructose intake. *J Physiol.* 2013; 591(2):401–14.
31. Levy RB, Claro RM, Bandoni DH, Mondini L, Monteiro CA. Disponibilidade de “açúcares de adição” no Brasil: distribuição, fontes alimentares e tendência temporal. *Rev Bras Epidemiol.* 2012; 15(1):3–12.
32. Levy-Costa RB, Sichieri R, Pontes N dos S, Monteiro CA. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: distribuição e evolução (1974-2003). *Rev Saude Publica.* 2005; 39(4):530–40.
33. Claro RM, Santos MAS, Oliveira TP, Pereira CA, Szwarcwald CL, Malta DC. Consumo de alimentos não saudáveis relacionados a doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. *Epidemiol e Serviços Saúde.* 2015; 24(2):257–65.
34. Gaby AR. Adverse effects of dietary fructose. *Altern Med Rev.* 2005; 10(4):294–306.
35. Evans RA, Frese M, Romero J, Cunningham JH, Mills KE. Fructose replacement of glucose or sucrose in food or beverages lowers postprandial glucose and insulin without raising triglycerides: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2017; 106(2):506–18.
36. Wilder-Smith CH, Li X, Ho SS, Leong SM, Wong RK, Koay ES, et al. Fructose transporters GLUT5 and GLUT2 expression in adult patients with fructose intolerance. *United Eur Gastroenterol J.* 2014; 2(1):14–21.
37. Barone S, Fussell SL, Singh AK, Lucas F, Xu J, Kim C, et al. Slc2a5 (Glut5) Is Essential for the Absorption of Fructose in the Intestine and Generation of Fructose-induced Hypertension. *J Biol Chem.* 2009; 284(8):5056–66.
38. Patel C, Douard V, Yu S, Gao N, Ferraris RP. Transport, metabolism, and endosomal trafficking-dependent regulation of intestinal fructose absorption. *FASEB J.* 2015; 29(9):4046–58.
39. Ebert K, Witt H. Fructose malabsorption. *Mol Cell Pediatr.* 2016; 3(1):10.
40. DeBosch BJ, Chen Z, Saben JL, Finck BN, Moley KH. Glucose transporter 8 (GLUT8) mediates fructose-induced de novo lipogenesis and macrosteatosis. *J Biol Chem.* 2014; 289(16):10989–98.

41. Dekker MJ, Su Q, Baker C, Rutledge AC, Adeli K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010; 299(5):E685–94.
42. Schalkwijk CG, Stehouwer CDA, van Hinsbergh VWM. Fructose-mediated non-enzymatic glycation: sweet coupling or bad modification. *Diabetes Metab Res Rev.* 2004; 20(5):369–82.
43. Dekker MJ, Su Q, Baker C, Rutledge AC, Adeli K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *AJP Endocrinol Metab.* 2010; 299(5):E685–94.
44. Laughlin MR. Normal roles for dietary fructose in carbohydrate metabolism. *Nutrients.* 2014;6(8):3117–29.
45. Zhang D-M, Jiao R-Q, Kong L-D. High Dietary Fructose: Direct or Indirect Dangerous Factors Disturbing Tissue and Organ Functions. *Nutrients.* 2017; 9(4):335.
46. Crescenzo R, Bianco F, Coppola P, Mazzoli A, Valiante S, Liverini G, et al. Adipose tissue remodeling in rats exhibiting fructose-induced obesity. *Eur J Nutr.* 2014; 53(2):413–9.
47. Heinz F, Lamprecht W, Kirsch J. Enzymes of fructose metabolism in human liver. *J Clin Invest.* 1968; 47(8):1826–32.
48. Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Diehl AM, et al. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2008; 48(6):993–9.
49. Horst K ter, Serlie M. Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients.* 2017; 9(9):981.
50. Roncal Jimenez CA, Ishimoto T, Lanaspa MA, Rivard CJ, Nakagawa T, Ejaz AA, et al. Fructokinase activity mediates dehydration-induced renal injury. *Kidney Int.* 2014; 86(2):294–302.
51. Panepistēmio tēs Krētēs. M-H, Jijakli H, Courtois P, Zhang Y, Sener A, Malaisse WJ. Fructokinase activity in rat liver, ileum, parotid gland, pancreas, pancreatic islet, B and non-B islet cell homogenates. *International journal of molecular medicine.* 2006; 17(3):517–522.
52. Ling KH, Paetkau V, Marcus F, Lardy HA. Phosphofructokinase. *Methods in Enzymology.* 1966; 9:425–9.
53. Diggle CP, Shires M, Leitch D, Brooke D, Carr IM, Markham AF, et al. Ketohexokinase: Expression and Localization of the Principal Fructose-metabolizing Enzyme. *J Histochem Cytochem.* 2009; 57(8):763–74.

54. Laughlin M. Normal Roles for Dietary Fructose in Carbohydrate Metabolism. *Nutrients*. 2014; 6(8):3117–29.
55. Funari VA, Voevodski K, Leyfer D, Yerkes L, Cramer D, Tolan DR. Quantitative gene expression profiles in real time from expressed sequence tag databases. *Gene Expr*. 2010; 14(6):321–36.
56. Funari VA, Crandall JE, Tolan DR. Fructose metabolism in the cerebellum. *Cerebellum*. 2007; 6(2):130–40.
57. McQuade DT, Plutschack MB, Seeberger PH. Passive fructose transporters in disease: a molecular overview of their structural specificity. *Org Biomol Chem*. 2013; 11(30):4909.
58. Stanhope KL. Role of fructose-containing sugars in the epidemics of obesity and metabolic syndrome. *Annu Rev Med*. 2012; 63:329–43.
59. Wylie-Rosett J, Segal-Isaacson C, Segal-Isaacson A. Carbohydrates and Increases in Obesity: Does the Type of Carbohydrate Make a Difference? *Obes Res*. 2004; 12(S11):124S–129S.
60. Berkey CS, Rockett HRH, Field AE, Gillman MW, Colditz GA. Sugar-Added Beverages and Adolescent Weight Change. *Obes Res*. 2004; 12(5):778–88.
61. Slyper AH. The Pediatric Obesity Epidemic: Causes and Controversies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(6):2540–7.
62. Tappy L, Lê K-A. Health Effects of Fructose and Fructose-Containing Caloric Sweeteners: Where Do We Stand 10 Years After the Initial Whistle Blowings? *Curr Diab Rep*. 2015; 15(8):54.
63. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest*. 2009; 119(5):1322–34.
64. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998; 395(6704):763–70.
65. Tillman EJ, Morgan DA, Rahmouni K, Swoap SJ. Three months of high-fructose feeding fails to induce excessive weight gain or leptin resistance in mice. *PLoS One*. 2014; 9(9):1–8.
66. Shapiro A, Mu W, Roncal C, Cheng KY, Johnson RJ, Scarpace PJ. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008; 295(5):R1370–1375.

67. Smeraglio AC, Kennedy EK, Horgan A, Purnell JQ, Gillingham MB. Change in postprandial substrate oxidation after a high-fructose meal is related to body mass index in healthy men. *Nutr Res.* 2013; 33(6):435–41.
68. Teff KL, Elliott SS, Tschöp M, Kieffer TJ, Rader D, Heiman 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):2963–72.
69. Meng Q, Ying Z, Noble E, Zhao Y, Agrawal R, Mikhail A, et al. Systems Nutrigenomics Reveals Brain Gene Networks Linking Metabolic and Brain Disorders. *EBioMedicine.* 2016; 7:157–66.
70. Lowette K, Desmet A-S, Farré RM, Tack J, Vanden Berghe P. Fructose consumption impairs serotonergic signaling in the murine enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil.* 2016; 28(9):1438–42.
71. Cha SH, Wolfgang M, Tokutake Y, Chohnan S, Lane MD. Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl-CoA and food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(44):16871–5.
72. McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. *Physiol Rev.* 2007; 87:873–904.
73. Kälén S, Heppner FL, Bechmann I, Prinz M, Tschöp MH, Yi C-X. Hypothalamic innate immune reaction in obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2015; 11(6):339–51.
74. Morton GJ, Meek TH, Schwartz MW. Neurobiology of food intake in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2014; 15(6):367–78.
75. SHIMIZU I, HIROTA M, OHBOSHI C, SHIMA K. Identification and Localization of Glucagon-Like Peptide-1 and Its Receptor in Rat Brain. *Endocrinology.* 1987; 121(3):1076–82.
76. Caron A, Richard D. Neuronal systems and circuits involved in the control of food intake and adaptive thermogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2017; 1391(1):35–53.
77. Cao H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *J Endocrinol.* 2014; 220(2):T47–59.
78. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology.* 2007; 132(6):2131–57.
79. Richards P, Parker HE, Adriaenssens AE, Hodgson JM, Cork SC, Trapp S, et al. Identification and characterization of GLP-1 receptor-expressing cells using a new transgenic mouse model. *Diabetes.* 2014; 63(4):1224–33.
80. Cantini G, Mannucci E, Luconi M. Perspectives in GLP-1 Research: New Targets, New Receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 2016; 27(6):427–38.

81. Monami M, Dicembrini I, Marchionni N, Rotella CM, Mannucci E. Effects of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists on Body Weight: A Meta-Analysis. *Exp Diabetes Res*. 2012; 2012:1–8.
82. King PJ. The hypothalamus and obesity. *Curr Drug Targets*. 2005; 6(2):225–40.
83. Swinburn BA, Caterson I, Seidell JC, James WPT. Diet, nutrition and the prevention of excess weight gain and obesity. *Public Health Nutr*. 2004; 7(1A):123–46.
84. Haslam D. Obesity: a medical history. *Obes Rev*. 2007; 8(s1):31–6.
85. Hirsch J, Batchelor B. Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin Endocrinol Metab*. 1976; 5(2):299–311.
86. Halberg N, Wernstedt-Asterholm I, Scherer PE. The Adipocyte as an Endocrine Cell. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008; 37(3):753–68.
87. Mathieu P, Lemieux I, Després J-P. Obesity, Inflammation, and Cardiovascular Risk. *Clin Pharmacol Ther*. 2010; 87(4):407–16.
88. Smith MM, Minson CT. Obesity and adipokines: effects on sympathetic overactivity. *J Physiol*. 2012; 590(8):1787–801.
89. Nakamura K, Fuster JJ, Walsh K. Adipokines: A link between obesity and cardiovascular disease. *J Cardiol*. 2014; 63(4):250–9.
90. Hui E, Xu A, Bo Yang H, Lam KSL. Obesity as the common soil of non-alcoholic fatty liver disease and diabetes: Role of adipokines. *J Diabetes Investig*. 2013; 4(5):413–25.
91. Carmo-Silva S, Cavadas C. Hypothalamic Dysfunction in Obesity and Metabolic Disorders. In: *Advances in neurobiology*. 2017;73–116.
92. Williams LM. Hypothalamic dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc*. 2012; 71(4):521–33.
93. Langlet F, Levin BE, Luquet S, Mazzone M, Messina A, Dunn-Meynell AA, et al. Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting. *Cell Metab*. 2013; 17(4):607–17.
94. Li JM, Ge CX, Xu MX, Wang W, Yu R, Fan CY, et al. Betaine recovers hypothalamic neural injury by inhibiting astrogliosis and inflammation in fructose-fed rats. *Mol Nutr Food Res*. 2015; 59(2):189–202.
95. Frank-Cannon TC, Alto LT, McAlpine FE, Tansey MG. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Mol Neurodegener*. 2009; 4(1):47.

96. Sofroniew M V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci.* 2015; 16(5):249–63.
97. Arroyo DS, Soria JA, Gaviglio EA, Rodriguez-Galan MC, Iribarren P. Toll-like receptors are key players in neurodegeneration. *Int Immunopharmacol.* 2011; 11(10):1415–21.
98. Norden DM, Fenn AM, Dugan A, Godbout JP. TGF $\beta$  produced by IL-10 redirected astrocytes attenuates microglial activation. *Glia.* 2014; 62(6):881–95.
99. O'Neill LA. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol.* 2006; 18(1):3–9.
100. YU X-J, Zhang D-M, Jia L-L, Qi J, Song X-A, Tan H, et al. Inhibition of NF- $\kappa$ B activity in the hypothalamic paraventricular nucleus attenuates hypertension and cardiac hypertrophy by modulating cytokines and attenuating oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015; 284(3):315–22.
101. Hanisch U-K. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia.* 2002; 40(2):140–55.
102. Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A, Sofi MA, et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed Pharmacother.* 2015; 74:101–10.
103. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas R de CG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr.* 2010; 23(4):629–43.
104. Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr.* 2003; 133 Suppl 3:933S–940S.
105. Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci.* 2009; 84(21–22):705–12.
106. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 1991; 91(3C):31S–38S.
107. Chaudhari N, Talwar P, Parimisetty A, Lefebvre d'Hellencourt C, Ravanan P. A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Front Cell Neurosci.* 2014; 8:213.
108. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, et al. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *Int J Mol Sci.* 2014; 16(1):378–400.
109. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes.* 2006; 30(3):400–18.

110. Hsieh H-L, Yang C-M. Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:484613.
111. Chiurchiù V, Maccarrone M. Chronic Inflammatory Disorders and Their Redox Control: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 15(9):2605–41.
112. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.* 2012; 5(1):9–19.
113. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 1997; 324:1–18.
114. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003; 329(1–2):23–38.
115. Yoshida Y, Umeno A, Shichiri M. Lipid peroxidation biomarkers for evaluating oxidative stress and assessing antioxidant capacity in vivo. *J Clin Biochem Nutr.* 2013; 52(1):9–16.
116. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 2014:360438.
117. Maithilikarpagaselvi N, Sridhar MG, Swaminathan RP, Zachariah B. Curcumin prevents inflammatory response, oxidative stress and insulin resistance in high fructose fed male Wistar rats: Potential role of serine kinases. *Chem Biol Interact.* 2016; 244:187–94.
118. Lopes A, Vilela TC, Taschetto L, Vuolo F, Petronilho F, Dal-Pizzol F, et al. Evaluation of the Effects of Fructose on Oxidative Stress and Inflammatory Parameters in Rat Brain. *Mol Neurobiol.* 2014; 50(3):1124–30.
119. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* 2007; 12(5):913–22.
120. Berg JM. *Bioquímica.* 2014. 15cap p.
121. Nelson DL, Cox M. *Princípios de bioquímica de Lehninger.* 2014. P. 633-47.
122. Dashty M. A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism. *Clin Biochem.* 2013; 46(15):1339–52.
123. Ferreira M, Aguiar T, Vilarinho L. Aspectos clínicos, bioquímicos, enzimáticos e moleculares associados ao défice do complexo I. *Arq Med.* 2008; 22(2–3):49–56.

124. Hüttemann M, Lee I, Pecinova A, Pecina P, Przyklenk K, Doan JW. Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease. *J Bioenerg Biomembr.* 2008; 40(5):445–56.
125. Yu EPK, Bennett MR. Mitochondrial DNA damage and atherosclerosis. *Trends Endocrinol Metab.* 2014; 25(9):481–7.
126. Chaturvedi RK, Flint Beal M. Mitochondrial Diseases of the Brain. *Free Radic Biol Med.* 2013; 63:1–29.
127. Drougard A, Fournel A, Valet P, Knauf C. Impact of hypothalamic reactive oxygen species in the regulation of energy metabolism and food intake. *Front Neurosci.* 2015; 9:56.
128. Veličković N, Djordjevic A, Vasiljević A, Bursać B, Milutinović DV, Matić G. Tissue-specific regulation of inflammation by macrophage migration inhibitory factor and glucocorticoids in fructose-fed Wistar rats. *Br J Nutr.* 2013; 110(3):456–65.
129. Anderson ST, Commins S, Moynagh PN, Coogan AN. Lipopolysaccharide-induced sepsis induces long-lasting affective changes in the mouse. *Brain Behav Immun.* 2015; 43:98–109.
130. Biesmans S, Meert TF, Bouwknecht JA, Acton PD, Davoodi N, De Haes P, et al. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013:271359.
131. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186:421–31.
132. Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography–visible detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 43(2):619–24.
133. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186:464–78.
134. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265–75.
135. Bannister J V, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1987; 32:279–312.
136. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105:121–6.
137. Cassina A, Radi R. Differential Inhibitory Action of Nitric Oxide and Peroxynitrite on Mitochondrial Electron Transport. *Arch Biochem Biophys.* 1996; 328(2):309–16.

138. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta*. 1985; 153(1):23–36.
139. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta*. 1994; 228(1):35–51.
140. Alzamendi A, Zubiría G, Moreno G, Portales A, Spinedi E, Giovambattista A. High Risk of Metabolic and Adipose Tissue Dysfunctions in Adult Male Progeny, Due to Prenatal and Adulthood Malnutrition Induced by Fructose Rich Diet. *Nutrients*. 2016; 8(3):178.
141. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest*. 2009; 119(5):1322–34.
142. Zubiría MG, Fariña JP, Moreno G, Gagliardino JJ, Spinedi E, Giovambattista A. Excess fructose intake-induced hypertrophic visceral adipose tissue results from unbalanced precursor cell adipogenic signals. *FEBS J*. 2013; 280(22):5864–74.
143. Zubiría MG, Alzamendi A, Moreno G, Rey MA, Spinedi E, Giovambattista A. Long-Term Fructose Intake Increases Adipogenic Potential: Evidence of Direct Effects of Fructose on Adipocyte Precursor Cells. *Nutrients*. 2016; 8(4):198.
144. Ramos VW, Batista LO, Albuquerque KT. Effects of fructose consumption on food intake and biochemical and body parameters in Wistar rats. *Rev Port Cardiol*. 2017; 36(12):937–41.
145. Stanhope KL, Havel PJ. Fructose consumption: potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol*. 2008; 19(1):16–24.
146. Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Coppola P, Liverini G, Iossa S. Increased hepatic de novo lipogenesis and mitochondrial efficiency in a model of obesity induced by diets rich in fructose. *Eur J Nutr*. 2013; 52(2):537–45.
147. Zubiría MG, Alzamendi A, Moreno G, Rey MA, Spinedi E, Giovambattista A. Long-Term Fructose Intake Increases Adipogenic Potential: Evidence of Direct Effects of Fructose on Adipocyte Precursor Cells. *Nutrients*. 2016; 8(4):198.
148. Cao H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *J Endocrinol*. 2014; 220(2):T47–59.
149. Bondia-Pons I, Ryan L, Martinez JA. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J Physiol Biochem*. 2012; 68(4):701–11.

150. Chou C-L, Lin H, Chen J-S, Fang T-C. Renin inhibition improves metabolic syndrome, and reduces angiotensin II levels and oxidative stress in visceral fat tissues in fructose-fed rats. *PLoS One*. 2017; 12(7):e0180712.
151. Macongonde EA, Vilela TC, Scaini G, Gonçalves CL, Ferreira BK, Costa NLF, et al. Evaluation of the In Vivo and In Vitro Effects of Fructose on Respiratory Chain Complexes in Tissues of Young Rats. *Dis Markers*. 2015; 2015:312530.
152. Frohnert BI, Bernlohr DA. Protein carbonylation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance. *Adv Nutr*. 2013; 4(2):157–63.
153. Hernández-Aguilera A, Rull A, Rodríguez-Gallego E, Riera-Borrull M, Luciano-Mateo F, Camps J, et al. Mitochondrial dysfunction: a basic mechanism in inflammation-related non-communicable diseases and therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013:135698.
154. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 2000; 29(3–4):222–30.
155. JUGE AUBRY C, SOMM E, PERNIN A, ALIZADEH N, GIUSTI V, DAYER J, et al. Adipose tissue is a regulated source of interleukin-10. *Cytokine*. 2005; 29(6):270–4.
156. Buckman LB, Hasty AH, Flaherty DK, Buckman CT, Thompson MM, Matlock BK, et al. Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. *Brain Behav Immun*. 2014; 35:33–42.
157. Thaler JP, Yi C-X, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest*. 2012; 122(1):153–62.
158. Ross AP, Bartness TJ, Mielke JG, Parent MB. A high fructose diet impairs spatial memory in male rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2009; 92(3):410–6.
159. Agrawal R, Noble E, Vergnes L, Ying Z, Reue K, Gomez-Pinilla F. Dietary fructose aggravates the pathobiology of traumatic brain injury by influencing energy homeostasis and plasticity. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016; 36(5):941–53.
160. Kälin S, Heppner FL, Bechmann I, Prinz M, Tschöp MH, Yi C-X. Hypothalamic innate immune reaction in obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2015; 11(6):339–51.
161. Boulamery A, Desplat-Jégo S. Regulation of Neuroinflammation: What Role for the Tumor Necrosis Factor-Like Weak Inducer of Apoptosis/Fn14 Pathway? *Front Immunol*. 2017; 8:1534.
162. Yin Q, Ma Y, Hong Y, Hou X, Chen J, Shen C, et al. Lycopene attenuates insulin signaling deficits, oxidative stress, neuroinflammation, and cognitive

- impairment in fructose-drinking insulin resistant rats. *Neuropharmacology*. 2014; 86:389–96.
163. Amri Z, Ghorbel A, Turki M, Akrouf FM, Ayadi F, Elfeki A, et al. Effect of pomegranate extracts on brain antioxidant markers and cholinesterase activity in high fat-high fructose diet induced obesity in rat model. *BMC Complement Altern Med*. 2017; 17(1):339.
  164. Rose J, Brian C, Woods J, Pappa A, Panayiotidis MI, Powers R, et al. Mitochondrial dysfunction in glial cells: Implications for neuronal homeostasis and survival. *Toxicology*. 2017; 391:109–15.
  165. Sil R, Chakraborti AS. Oxidative Inactivation of Liver Mitochondria in High Fructose Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats: Effect of Glycyrrhizin Treatment. *Phyther Res*. 2016; 30(9):1503–12.
  166. Ramos VW, Batista LO, Cordeiro EM, Oliveira GV, Albuquerque KT. High-monosaccharide intake inhibits anorexigenic hypothalamic insulin response in male rats. *Nutr Neurosci*. 2017; 1–4.
  167. Dekker MJ, Su Q, Baker C, Rutledge AC, Adeli K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2010; 299(5).
  168. Catrysse L, van Loo G. Inflammation and the Metabolic Syndrome: The Tissue-Specific Functions of NF- $\kappa$ B. *Trends Cell Biol [Internet]*. 2017:1–13.
  169. Levy A, Marshall P, Zhou Y, Kreek M, Kent K, Daniels S, et al. Fructose:Glucose Ratios—A Study of Sugar Self-Administration and Associated Neural and Physiological Responses in the Rat. *Nutrients*. 2015; 7(5):3869–90.
  170. Lindqvist A, Baelemans A, Erlanson-Albertsson C. Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. *Regul Pept*. 2008; 150(1–3):26–32.