



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Renata Ribeiro da Silva

**Efeito hipotalâmico do jejum intermitente em camundongos  
alimentados com frutose**

Rio de Janeiro  
2020

Renata Ribeiro da Silva

**Efeito hipotalâmico do jejum intermitente em camundongos  
alimentados com frutose**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarin de Lacerda

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S586 Silva, Renata Ribeiro da.  
Efeito hipotalâmico do jejum intermitente em camundongos alimentados com frutose / Renata Ribeiro da Silva. – 2020.  
72 f.

Orientadora: Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Frutose – Efeitos adversos - Teses. 2. Leptina – Teses. 3. Hipotálamo - Teses. 4. Jejum intermitente – Aspectos fisiológicos - Teses. 5. Metabolismo - Regulação – Teses. 7. Camundongos como animais de laboratório – Teses. I. Águila, Márcia Barbosa. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 613.21:664.16

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Renata Ribeiro da Silva

**Efeito hipotalâmico do jejum intermitente em camundongos  
alimentados com frutose**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 19 de fevereiro de 2020.

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarin de Lacerda (Orientadora)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Alessandra da Rocha Pinheiro Mulder  
Instituto de Nutrição – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Fernanda Ornellas Pinto da Cruz  
Centro Universitário Augusto Motta

Rio de Janeiro  
2020

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família que me apoiou em todas as minhas decisões e me incentivou a buscar o que amo, e, a todos os professores que passaram pela minha vida, pois foi graças a todo o ensinamento e paixão pela profissão transmitidos por eles que hoje sigo seus passos.

## AGRADECIMENTOS

Antes de qualquer agradecimento gostaria de dizer que para a realização deste sonho foi necessário muito trabalho em equipe, logo, o mérito não é apenas meu. Sendo assim, queria agradecer a toda equipe do LMMC por todo suporte para que este trabalho fosse finalizado.

Gostaria de agradecer ao meu companheiro de vida, Ricardo Freitas, que me ajudou e me apoiou na decisão de retomar meus estudos. Gratidão por sua paciência, compreensão, apoio e incentivo. Aos meus pais que sempre me ensinaram a correr atrás dos meus sonhos e nunca desistir, e também a toda minha família que sempre acreditou em mim e esteve ao meu lado.

Gratidão a minha orientadora professora D<sup>ra</sup>. Márcia Águila pela oportunidade que me foi dada. Ela que me recebeu tão bem e me permitiu iniciar essa caminhada, que me ensinou, me escutou e me guiou para a conclusão deste sonho.

Gratidão ao professor Dr. Mandarim-de-Lacerda por ser tão receptivo e disponível aos alunos, sempre disposto a sanar qualquer dúvida e incentivando a busca pelo conhecimento.

Gratidão a todos os amigos do LMMC, em especial a Tamiris Ingrid, Thatiany Marinho, Aline Penna, Fabiane Martins e Fernanda Ornellas por tanta ajuda, conversas e aprendizado.

Gratidão a minha amiga Renata Spezani, ou como todos diziam “minha dupla”. Foram tantos altos e baixos durante essa jornada e sou extremamente grata por ter você ao meu lado em todos esses momentos, compartilhando comigo cada alegria ou estresse. Gostaria que todos tivessem uma amiga como você ao lado.

Gratidão também a uma das pessoas que mais me inspiraram a seguir na vida acadêmica, Daniela Gurpilhares. Ela que me acolheu durante quase toda a minha graduação, acompanhou meu crescimento dentro e fora do laboratório de pesquisa, que me escutou e me aconselhou todas as vezes que precisei, até quando não estava mais na faculdade. Obrigada por tanta ajuda, por sempre torcer por mim e ser uma das minhas maiores incentivadoras.

Gratidão também a todos os meus amigos por tanta paciência durante essa trajetória.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço também a FAPERJ e ao CNPq pelo suporte financeiro para que este trabalho fosse concluído.

A vida nos ensina por meio dos nossos erros. Quando cometer um erro apenas se pergunte o que deve aprender com ele. Quando aceitamos essas lições com humildade e gratidão, evoluímos na mesma medida.

*Haemin Sunim*



## RESUMO

SILVA, Renata Ribeiro da. *Efeito hipotalâmico do jejum intermitente em camundongos alimentados com frutose*. 2020. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Atualmente estamos expostos a alimentos ricos em frutose, levando a um número crescente de distúrbios metabólicos, como a hiperleptinemia. A leptina regula a ingestão de alimentos através da sua atuação no hipotálamo. Por outro lado, existe uma busca contínua para uma vida mais saudável. Assim, o objetivo do trabalho foi estudar os efeitos do jejum intermitente (JI) sobre a sinalização da leptina e dos neurotransmissores que controlam o apetite/saciedade e a inflamação hipotalâmica em camundongos alimentados com dieta rica em frutose, como uma alternativa aos problemas causados por essa dieta, já que o JI pode melhorar a saúde de pessoas com doenças crônicas, modulando fatores de riscos metabólicos e funcionais. Camundongos C57BL/6 machos com 12 semanas de idade foram divididos em dois grupos, controle (C, dieta controle) e rico em frutose (HFru, dieta rica em frutose), durante 8 semanas. Após esse período, os animais foram divididos em 4 grupos, os que receberam ração *ad libitum* e os que fizeram JI (24h alimentado/24h de jejum): controle (C), rico em frutose (HFru), C-JI (controle-JI) e HFru-JI (rico em frutose-JI) durante 4 semanas, totalizando 12 semanas de experimento, momento em que os animais foram eutanasiados. A ingestão de frutose foi capaz de aumentar o colesterol total, triacilglicerol, glicemia, insulina, Índice de Resistência à Insulina em Jejum (FiRi), leptina e reduzir a adiponectina plasmática, enquanto o JI reduziu a massa corporal (MC) dos animais e melhorou todos os parâmetros citados. Apesar do protocolo de JI e perda de peso, não houve diferença no consumo alimentar e energético dos grupos. Os marcadores inflamatórios tiveram sua expressão gênica hipotalâmica aumentada após no grupo C-JI. O JI, assim como a frutose aumentou a expressão da *Leptina* hipotalâmica e também a expressão de *Obrb* e *Socs3* nos grupos C-JI e HFru, entretanto houve diminuição da expressão destes marcadores (*Obrb* e *Socs3*) no grupo HFru-JI. Foi observado aumento da expressão gênica de *Npy* e *Pomc* no grupo HFru-JI e redução do *Pomc* nos grupos HFru e C-JI. Na imunofluorescência foi observado uma intensa marcação verde ao redor do terceiro ventrículo que indicou a presença de NPY, sendo mais acentuada nos animais submetidos ao JI, enquanto para POMC, uma marcação verde menos intensa foi detectada nos grupos, principalmente nos grupos HFru e HFru-JI. Em conclusão, o JI foi capaz de diminuir a MC ao longo do estudo e beneficiar o metabolismo lipídico, glicêmico e a sensibilidade à insulina, a adiponectina e a leptina plasmática. No entanto, ocorreu um aumento de marcadores inflamatórios hipotalâmicos em camundongos submetidos ao JI, que, a longo prazo pode levar ao desequilíbrio do balanço energético corporal e da ingestão alimentar. Além disso, o JI levou ao aumento da leptina hipotalâmica com provável resistência à leptina. Portanto, ainda não podemos dizer, com segurança, que o JI pode ser usado como um tratamento não farmacológico para doenças metabólicas.

Palavras-chave: Frutose. Leptina. Hipotálamo. Inflamação. Intervenção dietética.

## ABSTRACT

SILVA, Renata Ribeiro da. *Hypothalamic effect of intermittent fasting in fructose-fed mice*. 2020. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

We are currently exposed to foods high fructose, leading to an increasing number of metabolic disorders, such as hyperleptinemia. Leptin regulates food intake by acting on the hypothalamus. On the other hand, there is a continuous search for a healthier life. Thus, the objective of the work was to study the effects of intermittent fasting (IF) on the signaling of leptin and neurotransmitters that control appetite/satiety and hypothalamic inflammation in mice fed a high fructose diet, as an alternative to the problems caused by this diet, since the IF can improve the health of people with chronic diseases by modulating metabolic and functional risk factors. C57BL / 6 male mice at 12 weeks of age were divided into two groups, control (C, control diet) and high in fructose (HFru, high fructose), for 8 weeks. After this period, the animals were divided into 4 groups, those that received ad libitum food and those that did JI (24h fed / 24h fasting): control (C), high fructose (HFru), C-JI (control- IF) and HFru-IF (high fructose-IF) for 4 weeks, totaling 12 weeks of experiment, when the animals were euthanized. Fructose intake was able to increase total cholesterol, triacylglycerol, glycemia, insulin, Fasting Insulin Resistance Index (FiRi), leptin and reduce plasma adiponectin, while JI reduced the animals' body mass (BM) and improved all parameters cited. Despite the IF protocol and weight loss, there was no difference in the food and energy consumption of the groups. The inflammatory markers had their hypothalamic gene expression increased afterwards in the C-IF group. IF, as well as fructose increased the expression of hypothalamic *Leptin* and also the expression of *Obrb* and *Socs3* in the groups C-IF and HFru, however there was a decrease in the expression of these markers (*Obrb* and *Socs3*) in the group HFru-IF. An increase in *Npy* and *Pomc* gene expression was observed in the HFru-IF group and a reduction in *Pomc* in the HFru and C-IF groups. In immunofluorescence, an intense green mark was observed around the third ventricle that indicated the presence of NPY, being more pronounced in animals submitted to IF, while for POMC, a less intense green mark was detected in the groups, mainly in the HFru and HFru-IF groups. In conclusion, IF was able to decrease BM throughout the study and benefit lipid, glycemic metabolism and sensitivity to insulin, adiponectin and plasma leptin. However, there was an increase in hypothalamic inflammatory markers in mice submitted to IF, which, in the long run, can lead to an imbalance in the body's energy balance and food intake. In addition, IF led to an increase in hypothalamic leptin with probable leptin resistance. Therefore, we cannot yet say with certainty that IF can be used as a non-pharmacological treatment for metabolic diseases.

Keywords: Fructose. Leptin. Hypothalamus. Inflammation. Dietary intervention.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Metabolismo da frutose .....	21
Figura 2 -	Mecanismo fisiológico da ação da leptina no hipotálamo .....	24
Figura 3 -	Núcleos hipotalâmicos de camundongo C57BL/6 envolvidos na homeostase energética .....	25
Figura 4 -	Via de sinalização da leptina .....	29
Tabela 1 -	Composição das dietas experimentais .....	37
Figura 5 -	Desenho esquemático dos grupos experimentais, de acordo com as diferentes dietas oferecidas .....	38
Figura 6 -	Citoarquitetura das áreas do hipotálamo do camundongo C57BL/6 .....	40
Figura 7 -	Ilustração da localização do núcleo arqueado (ARC) seguindo as coordenadas estereotáxicas (Bregma) para camundongos C57BL/6 e demonstração dos diferentes formatos do terceiro ventrículo (3V) .....	40
Quadro -	Primers utilizados no q-PCR e suas respectivas sequências .....	43
Figura 8 -	Análises biométricas .....	45
Figura 9 -	Análises plasmáticas (colesterol total e triacilglicerol) .....	46
Figura 10 -	Análises plasmáticas (glicemia, insulina e FiRi) .....	47
Figura 11 -	Análises plasmáticas (leptina e adiponectina) .....	47
Figura 12 -	Expressão gênica hipotalâmica ( <i>Il6</i> , <i>Il1<math>\beta</math></i> e <i>Tnfa</i> ) .....	48
Figura 13 -	Expressão gênica hipotalâmica ( <i>Leptina</i> , <i>Obrb</i> e <i>Socs3</i> ) .....	49
Figura 14 -	Expressão gênica hipotalâmica ( <i>Npy</i> e <i>Pomc</i> ) .....	50
Tabela 2 -	ANOVA de dois fatores: Dieta vs. Jejum intermitente .....	51
Figura 15 -	Microscopia Confocal a Laser. Imunofluorescência de cortes coronais hipotalâmicos (NPY) .....	52
Figura 16 -	Microscopia Confocal a Laser. Imunofluorescência de cortes coronais hipotalâmicos (POMC) .....	53
Figura 17 -	Resumo gráfico dos resultados .....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3V	Terceiro ventrículo
AdipoR	Receptor da adiponectina
AgRP	Proteína relacionada ao <i>agouti</i>
AIN	Instituto Americano de Nutrição
AKT/PKB	Proteína quinase B
Alfa-MSH	Hormônio estimulador dos melanócitos alfa
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ARC	Núcleo arqueado
ATP	Trifosfato de adenosina
BHE	Barreira hematoencefálica
BSA	Albumina do soro bovino
C	Controle
CART	Transcrito regulado por cocaína e anfetamina
CCK	Colecistoquinina
ChREBP	Proteína ligada ao elemento responsivo ao carboidrato
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CT	Colesterol total
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindole
DMH	Núcleo dorsomedial do hipotálamo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FiRi	Índice de resistência à insulina em jejum
FOX	<i>Forkhead box protein</i>
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GIP	Polipeptídeo insulínico dependente de glicose ou peptídeo inibidor gástrico
GLP	Peptídeo semelhante a glucagon

GLUT	Transportador de glicose
HFru	Rico em frutose
IL	Interleucina
IRS	Substrato do receptor de insulina
JAK	Janus quinase
JI	Jejum Intermitente
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hipotálamo lateral
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MC	Massa Corporal
MCH	Hormônio concentrador de melanina
MCP	Proteína quimiotática de monócitos
ME	Eminência mediana
NIH	Instituto Nacional de Saúde
NPY	Neuropeptídeo Y
ob	Gene da obesidade
OBRb	Receptor de leptina de forma longa
OCT	Temperatura ótima de corte (Meio de inclusão específico de corte)
ORE	Orexina
PBS	Tampão fosfato-salino
PI3-K	Fosfatidilinositol-3-Quinase
POMC	Pró-ópiomelanocortina
PPAR	Receptor ativado por proliferador de peroxissomo
PVN	Núcleo paraventricular
q-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
S3	Segmento 3
SNC	Sistema Nervoso Central
SOCS	Proteína supressora de sinalização de citocina
SREBP	Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TAG	Triacilglicerol
TNF	Fator de necrose tumoral

TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
UCP	Proteína desacopladora
VMH	Núcleo ventromedial do hipotálamo

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
1.1	<b>Frutose</b> .....	18
1.1.1	<u>Metabolismo da Frutose</u> .....	19
1.2	<b>Hipotálamo e neurotransmissores hipotalâmicos</b> .....	22
1.3	<b>Leptina e Adiponectina</b> .....	25
1.3.1	<u>Leptina</u> .....	26
1.3.2	<u>Adiponectina</u> .....	29
1.4	<b>Jejum Intermitente</b> .....	32
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	35
2.1	<b>Geral</b> .....	35
2.2	<b>Específicos</b> .....	35
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
3.1	<b>Animais e dieta</b> .....	36
3.2	<b>Massa corporal e Ingestão alimentar</b> .....	38
3.3	<b>Sacrifício e extração do hipotálamo</b> .....	38
3.4	<b>Microtomia do cérebro do camundongo para análise do hipotálamo</b> .....	39
3.5	<b>Imunofluorescência e microscopia confocal a laser do hipotálamo</b>	41
3.6	<b>Expressão gênica (q-PCR)</b> .....	41
3.7	<b>Análises plasmáticas</b> .....	43
3.8	<b>Análise estatística</b> .....	44
4	<b>RESULTADOS</b> .....	45
4.1	<b>Massa corporal, ingestão alimentar e ingestão energética</b> .....	45
4.2	<b>Concentrações plasmáticas de triacilglicerol, colesterol total, glicemia de jejum, insulina, FiRi, leptina e adiponectina</b> .....	46
4.3	<b>Expressão gênica</b> .....	48
4.4	<b>Imunofluorescência para NPY e POMC no hipotálamo</b> .....	52
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	54
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	58
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	59

<b>ANEXO A - Comitê de ética .....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO B – Submissão do artigo .....</b>	<b>72</b>



## INTRODUÇÃO

O consumo de alimentos industrializados resultou em aumento significativo no consumo de açúcares, incluindo a frutose. O açúcar de mesa (sacarose) é um dissacarídeo composto por uma molécula de frutose e uma de glicose. A frutose é um monossacarídeo presente naturalmente em alimentos como frutas, cana-de-açúcar, beterraba, mel, entre outros. Por ter sabor mais doce que a glicose e a sacarose, a indústria alimentícia utiliza a frutose como um de seus principais adoçantes. Formulações com alto teor de frutose, vendidas na forma de xarope de milho rico em frutose, são a principal forma empregada para adicionar frutose aos alimentos<sup>(1)</sup>. A prática do uso da frutose em alimentos industrializados teve início na década de 70, em parte pelo baixo custo da frutose frente ao açúcar extraído da cana-de-açúcar, e por se misturar facilmente ao alimento processado, aumentando assim sua palatabilidade<sup>(2)</sup>. O consumo de xarope de milho rico em frutose aumentou nas últimas décadas por ter se tornado o adoçante preferido das indústrias alimentícias, graças ao seu maior poder adoçante, maior vida útil, menor custo e capacidade de manter a umidade mais duradoura nos alimentos<sup>(3)</sup>. Sendo assim o consumo per capita de frutose dietética aumentou 100 vezes<sup>(4)</sup>. Esse consumo tão alto de frutose tem o seu preço e uma das consequências é a predisposição ao desenvolvimento da resistência à insulina<sup>(5, 6)</sup>. Dentre os eventos propostos que poderiam explicar o desenvolvimento da resistência à insulina é o aparecimento da resistência à leptina que favorece o aumento do consumo alimentar e, conseqüentemente, aumento da deposição de gordura corporal<sup>(7)</sup>. É sempre bom lembrar que todos os malefícios atribuídos à ingestão de frutose são devido a frutose industrializada consumida em excesso e não a frutose natural dos alimentos<sup>(8)</sup>.

O sistema regulatório do apetite, localizado primordialmente no hipotálamo, necessita informação aferente sobre a condição nutricional do corpo e níveis de estoque de energia para controlar o consumo alimentar. Esta informação aferente se dá, principalmente, por meio da leptina, um hormônio sintetizado nos adipócitos, componente do complexo sistema fisiológico que regula o armazenamento, equilíbrio e utilização de energia pelo organismo<sup>(9)</sup>. A leptina existente na circulação sanguínea se liga a receptores de leptina de forma longa (OBRbs) no cérebro, levando ao sistema nervoso central (SNC) um sinal de saciedade que reflete a quantidade existente de

energia em forma de gordura no corpo. Agindo por intermédio destes receptores que fazem uso da via janus quinase/transdutor de sinal e ativador de transcrição (JAK/STAT) de transdução do sinal intracelular, a leptina modifica a expressão e a atividade de inúmeros peptídeos hipotalâmicos que regulam o apetite e o gasto de energia<sup>(10)</sup>.

Atualmente, estamos expostos a um ambiente com alimentos excessivamente industrializados e ricos em frutose, onde um número cada vez maior de pessoas apresenta algum distúrbio metabólico. Por outro lado, estamos em busca de uma solução para se ter uma vida longa e saudável. A genética é fundamental, mas entre os fatores ambientais, o que podemos interferir é a nossa alimentação. E uma das intervenções mais estudada em humanos e em modelos animais, é a restrição energética, e dentre esse mote, o jejum intermitente (JI) se adequa perfeitamente. Em várias espécies de animais, a restrição energética, iniciada no começo ou no meio da vida e mantida por um longo período, aumenta a longevidade<sup>(11)</sup>. O JI é uma intervenção dietética que envolve ciclos de jejum e alimentação, como por exemplo, 24 horas de jejum, seguidos de 24 horas de alimentação<sup>(12)</sup>. Esta é uma prática antiga, que possui uma variedade de formatos<sup>(13)</sup>. Este tipo de intervenção tem grande aceitação pelas pessoas<sup>(14)</sup> porque é mais fácil diminuir o consumo de alimentos em dias específicos do que diariamente<sup>(15)</sup>. Estudos mostram que diferentes protocolos de JI são capazes de melhorar a saúde de pessoas com doenças crônicas<sup>(16)</sup> e já se sabe que o JI pode amenizar as alterações no metabolismo dos carboidratos e de lipídios em animais alimentados com dieta hiperlipídica e dieta rica em frutose<sup>(17-19)</sup>.

A partir deste cenário, foi criada a hipótese para este trabalho, a de que o JI poderia trazer benefícios para animais que receberam dieta rica em frutose. Uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares que o JI desencadeia no hipotálamo de camundongos que receberam dieta rica em frutose não só poderia explicar o fenômeno da fisiologia do comportamento alimentar, mas também revelar abordagens nutricionais para a prevenção e tratamento de doenças metabólicas.

Durante a leitura deste trabalho, será apresentada uma revisão da literatura com um breve relato de tópicos acerca do tema. Em seguida, descreveremos os objetivos definidos durante a elaboração do projeto. Os materiais e métodos apresentarão o desenho experimental planejado e executado durante todas as etapas da realização do trabalho, desde a manutenção dos animais no biotério até a

execução dos experimentos. Ao final, descreveremos os resultados encontrados e posteriormente haverá a discussão desses resultados, relacionando-os com o que já está descrito na literatura. Durante a elaboração do estudo, um artigo científico foi redigido e submetido para revista internacional *Journal of Nutritional Biochemistry* que atualmente encontra-se sob análise.

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Frutose

A frutose é um monossacarídeo, um açúcar simples com uma fórmula química ( $C_6H_{12}O_6$ ) semelhante à da glicose. Ela difere da glicose pela presença de um grupo cetona ligado ao carbono 2 da molécula, enquanto a glicose apresenta um grupo aldeído no carbono 1. Assim, a frutose contendo o grupamento carbonila no final da cadeia, quando hidrolisada, fornecerá cetona, e será denominada ceto-hexose. A glicose, por sua vez, quando hidrolisada, dará origem a aldeído, sendo chamada de aldohexose<sup>(20)</sup>.

As fontes naturais de frutose incluem principalmente frutas, mel e vegetais. Embora a frutose livre esteja presente em quantidades significativas em frutas, atualmente a maior fonte de frutose na dieta é na forma de frutose industrializada adicionada em sobremesas, doces, refrigerantes e outras bebidas adoçadas<sup>(21)</sup> ou como xarope de milho rico em frutose<sup>(22, 23)</sup>. A frutose vem sendo muito utilizada na indústria por ser o açúcar mais doce entre todos os carboidratos produzidos naturalmente<sup>(24)</sup>, ela é pelo menos 1,5 vezes mais doce que a sacarose e é barata de produzir. No passado, a ingestão de frutose era entre 16 e 20 g/dia, no entanto, atualmente, o consumo de frutose pode atingir 60-150 g/dia, principalmente se somada a frutose proveniente da sacarose<sup>(25)</sup>.

O xarope de milho rico em frutose é um adoçante e conservante comum produzido por isomerização enzimática industrial de glicose a frutose. Embora o xarope de milho rico em frutose possa conter até 90% de frutose, a maioria dos xaropes de milho rico em frutose usados em bebidas contém cerca de 55% de frutose. O consumo de xarope de milho rico em frutose aumentou nas últimas décadas em grande parte devido ao aumento do consumo de bebidas e alimentos adoçados com ele, incluindo bebidas e sucos gaseificados, cereais matinais, pães e outros produtos assados, frutas enlatadas e geleias, condimentos e sobremesas preparadas<sup>(20)</sup>.

Estudos mostram que a sobrecarga de frutose em camundongos leva a alterações metabólicas, incluindo resistência à insulina, hiperleptinemia, dislipidemia, além de diminuição da adiponectina<sup>(5)</sup>, hiperuricemia e hipertensão arterial

sistêmica<sup>(6)</sup>. Esses fatores estão intimamente relacionados à produção anormal de citocinas inflamatórias e à ativação de uma rede de vias de sinalização inflamatória<sup>(26)</sup>.

Vale ressaltar que em modelos experimentais se utiliza até 50% de frutose do total de energia adicionada à dieta. Este é um modelo bastante utilizado para o estudo de efeitos do consumo excessivo de frutose, e valores de 50% do valor energético total de frutose na dieta não são tão distantes da realidade quando aplicados à população humana, pois é o equivalente a cerca de 250 g/dia de frutose, uma quantidade facilmente alcançada com a ingestão de refrigerantes e alimentos ultraprocessados<sup>(27)</sup>. Por isso, os dados obtidos em estudos com esta sobrecarga de frutose podem ser usados como projeções do que pode acontecer no organismo de humanos.

Na prática nutricional, a ingestão de frutose presente nas frutas tem efeitos benéficos, pois além das frutas *in natura* possuem cerca de 3-8 g de frutose por 100 g, ou seja, uma baixa quantidade de frutose, elas também contêm fibras e outros nutrientes que trazem benefícios à saúde, como vitaminas, minerais, e compostos como o ácido clorogênico e resveratrol<sup>(28)</sup>.

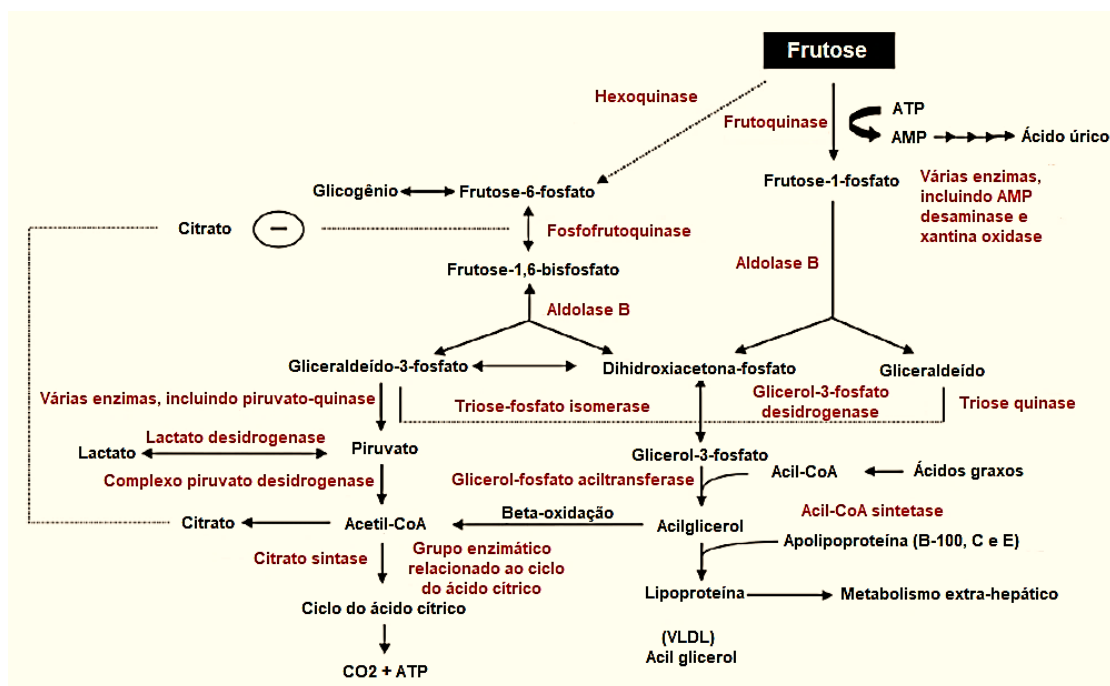
### 1.1.1 Metabolismo da Frutose

Apesar da similaridade na estrutura química ( $C_6H_{12}O_6$ ), frutose e glicose são metabolizadas de maneiras completamente diferentes e utilizam diferentes transportadores. O transporte da frutose difere da glicose e ocorre de maneira independente de insulina<sup>(29)</sup>. Embora o fígado seja o principal responsável pela metabolização da frutose ingerida, o intestino pode metabolizar até 30% de uma carga oral de frutose. Todas as enzimas frutolíticas são altamente expressas no intestino delgado e principalmente no jejuno, onde são observados os níveis mais altos do transportador de glicose 5 (GLUT5)<sup>(30)</sup>. Sendo assim, o intestino é capaz de converter a frutose em glicose e outros metabólitos circulantes e proteger o fígado da exposição a frutose; entretanto, grandes quantidades de frutose podem superar essa capacidade de proteção<sup>(4)</sup>, visto que a capacidade do intestino de absorver frutose é saturável<sup>(30)</sup>. Jang et al.<sup>(4)</sup> resumiram que o equilíbrio entre o consumo de frutose e a capacidade intestinal de eliminação dela determinaria a exposição do fígado a frutose na dieta e,

assim, a toxicidade da frutose, e que a extensão da passagem de frutose não metabolizada através do intestino delgado para o fígado depende da dose de frutose ingerida<sup>(4)</sup>.

No intestino delgado a frutose, seja aquela proveniente da ingestão de frutose pura, ou da digestão da sacarose, é lentamente transportada do lúmen intestinal para o citosol do enterócito através do transportador GLUT5, que predominantemente transporta a frutose. O GLUT5 localiza-se na parte apical do enterócito e é expresso abundantemente também no túbulo proximal dos néfrons, especificamente no segmento 3 (S3)<sup>(31)</sup>. O transporte específico da frutose nesta fase através do GLUT5 não requer hidrólise de trifosfato de adenosina (ATP). Uma vez dentro do enterócito a frutose difunde-se para a circulação sanguínea via outro transportador, o GLUT2, localizado na parte basolateral do enterócito, que transporta frutose ou glicose<sup>(32)</sup>. Dessa maneira, uma grande quantidade de frutose chega ao fígado<sup>(33)</sup>, via transportador GLUT2, onde sofre metabolismo de primeira passagem pela ação de uma enzima altamente seletiva para frutose, a frutoquinase, que é expressa no fígado, intestino delgado e rim de humanos e de roedores<sup>(34)</sup>. Essa etapa do metabolismo da frutose, diferentemente do que ocorre para a glicose, não possui um sistema de *feedback* negativo e pode gerar depleção de ATP, ocorrendo a formação de monofosfato de adenosina (AMP) que, por sua vez, é metabolizado pela AMP deaminase produzindo ácido úrico dentro das células<sup>(35)</sup>. A ação da aldolase b sobre a frutose-1-fosfato tem como produto o gliceraldeído e o fosfato de dihidroxiacetona<sup>(36)</sup>, ambos podem ser convertidos em gliceraldeído-3-fosfato e formar glicose após a gliconeogênese convencional<sup>(37)</sup>. O gliceraldeído e o fosfato de dihidroxiacetona podem convergir rapidamente para a via glicolítica fornecendo piruvato e liberando energia. Ou seguir outro caminho na via metabólica ao ser reduzido a glicerol-3-fosfato, o que é necessário para a síntese de lipídios. A frutose pode entrar de forma contínua nesta via metabólica e resultar em uma grande produção de triacilgliceróis<sup>(36)</sup>, levando ao acúmulo de lipídios no fígado<sup>(38)</sup> (Figura 1).

Figura 1 - Metabolismo da frutose



Nota: A primeira etapa do metabolismo da frutose está relacionada à conversão a frutose-1-fosfato ou frutose-6-fosfato, ocorrendo principalmente a conversão em frutose-1-fosfato, visto que a frutose tem baixa afinidade pela hexoquinase, portanto, ela é preferencialmente metabolizada pela frutoquinase. A etapa de conversão de frutose para frutose-1-fosfato pela frutoquinase pode gerar depleção de ATP, levando a formação de AMP que é metabolizado produzindo ácido úrico dentro das células. A frutose-1-fosfato é então metabolizada pela aldolase B, convertendo-a em 2 produtos, fosfato de diidroxiacetona e gliceraldeído, que podem participar da via glicolítica fornecendo piruvato e liberando energia e participar da síntese de lipídeos através da conversão a glicerol-3-fosfato. O gliceraldeído-3-fosfato proveniente do fosfato de diidroxiacetona e gliceraldeído também pode levar a formação de glicose após a gliconeogênese convencional.

Fonte: adaptado de Dornas<sup>(25)</sup>.

## 1.2 Hipotálamo e neurotransmissores hipotalâmicos

O controle do balanço energético e os mecanismos que regulam a fome, saciedade e termogênese são feitos por circuitos neurais presentes na região hipotalâmica no SNC, onde se localizam neurônios capazes de captar sinais nutricionais e neurônios com receptores específicos para hormônios periféricos, como a insulina e leptina, que sensibilizam neurônios localizados no núcleo arqueado (ARC) (neurônios de primeira ordem). Esses, por sua vez, projetam conexões neurais para outros neurônios situados nos núcleos paraventricular (PVN) e lateral (LH), chamados de neurônios de segunda ordem<sup>(9)</sup>. Essas projeções de neurônios de primeira ordem são responsáveis por coordenar a síntese e expressão de peptídeos anorexígenos como pró-ópiomelanocortina (POMC), que é clivado em hormônio estimulador dos melanócitos alfa (alfa-MSH) e que atua nos receptores 3 e 4 da melanocortina (MC3R e MC4R) presentes em outras regiões hipotalâmicas, e, transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) que inibem a fome. Ainda, os neurônios de primeira ordem coordenam a expressão e síntese de peptídeos orexigênicos como o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado ao *Agouti* (AgRP), localizados no núcleo ARC, e, esses neurônios de primeira ordem emitem projeções excitatórias para o hipotálamo lateral e inibitórias para o paraventricular<sup>(9)</sup>. Dentro do núcleo ARC localizado acima da eminência mediana (ME), os neurônios que expressam NPY e AgRP são encontrados medialmente, enquanto os neurônios que expressam POMC e CART estão localizados lateralmente<sup>(39)</sup>. Estudos mostram que os neurônios NPY podem inibir diretamente os neurônios POMC<sup>(40)</sup>.

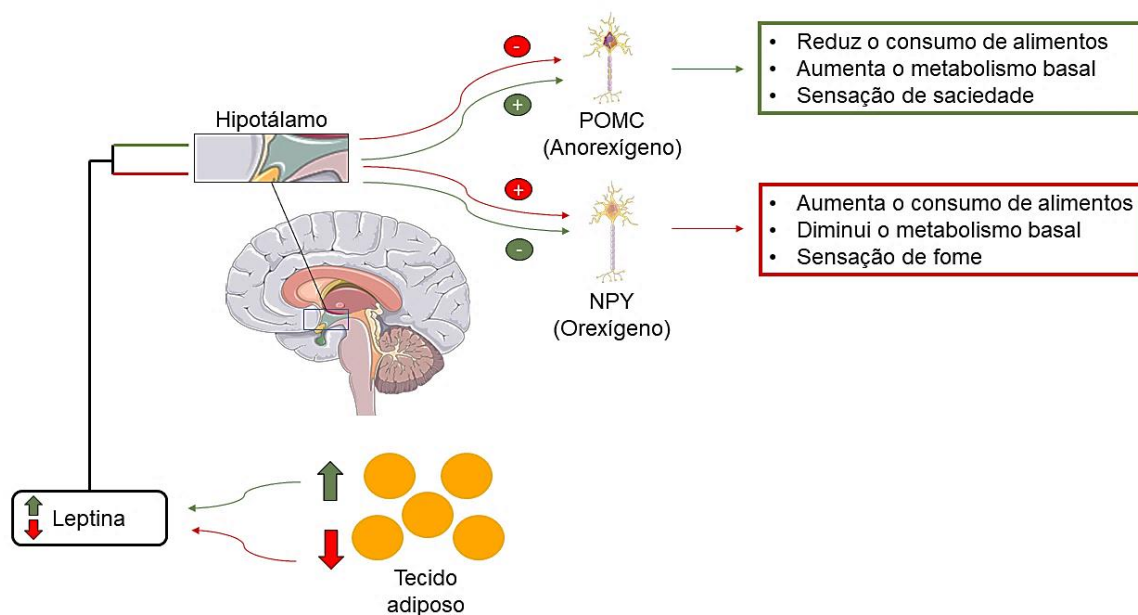
Em resposta aos estímulos excitatórios, os neurônios do núcleo PVN produzem tanto o hormônio liberador de tireotrofinas (TRH), quanto o hormônio liberador de corticotrofinas (CRH) que possuem ação anorexígena e pró-termogênica, enquanto no núcleo hipotalâmico lateral são sintetizados o hormônio concentrador de melanina (MCH) e a orexina (ORE), que possuem ação orexígena e anti-termogênica<sup>(41)</sup>. Essa resposta coordenada é dependente da disponibilidade de nutrientes, da quantidade de leptina e insulina no sangue, e de hormônios intestinais como a colecistoquinina (CCK), peptídeo 1 semelhante a glucagon (GLP1) e o polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP)<sup>(42)</sup>.



A homeostase energética resulta do equilíbrio entre o consumo e o gasto de energia. Nesse sentido, vários determinantes do comportamento alimentar são estudados, abrangendo a regulação homeostática da ingestão de alimentos, geralmente atribuída a um circuito hipotálamo-tronco cerebral<sup>(43)</sup>. A base do controle eficaz da ingestão de alimentos é a capacidade das moléculas de sinalização em circulação de alcançar o hipotálamo<sup>(44)</sup>. Em indivíduos eutróficos, a homeostase energética, e subseqüentemente o controle da fome, é rigidamente controlada através de vários fatores de sinalização periféricos e centrais. O hipotálamo, portanto, serve como um sensor para o estado metabólico do corpo<sup>(21)</sup>, controlando a saciedade e a fome e mantendo a homeostase energética<sup>(24)</sup>.

Em situações de jejum, em que a disponibilidade de nutrientes está diminuída, a concentração de insulina/leptina está baixa e esse sinal periférico leva à indução da expressão de neuropeptídeos como o NPY e o AgRP e concomitantemente uma inibição do POMC e CART. Assim, acontece um aumento da atividade dos neurônios ORE e MCH no núcleo LH do hipotálamo, ambos com efeito orexigênico. Em contrapartida, quando a situação de disponibilidade de nutrientes é alta e os níveis de insulina e leptina circulantes estão altos (período pós-prandial), os neurônios produtores de neuropeptídeos POMC e CART são estimulados e ativam os neurônios do núcleo PVN do hipotálamo para expressarem TRH e CRH, que vão promover a sinalização anorexígena e pró-termogênica. Assim, o hipotálamo controla, de forma sinérgica, o balanço energético corporal, a ingestão alimentar e o gasto energético corporal<sup>(45)</sup>. Estudos recentes demonstraram que a organização estrutural da barreira sangue-hipotálamo é alterada por ciclos de jejum, melhorando o acesso de fatores orexígenos ao núcleo ARC<sup>(12)</sup>. E o núcleo ARC parece ser o principal local de resistência à leptina<sup>(46)</sup> (Figura 2).

Figura 2 - Mecanismo fisiológico da ação da leptina no hipotálamo



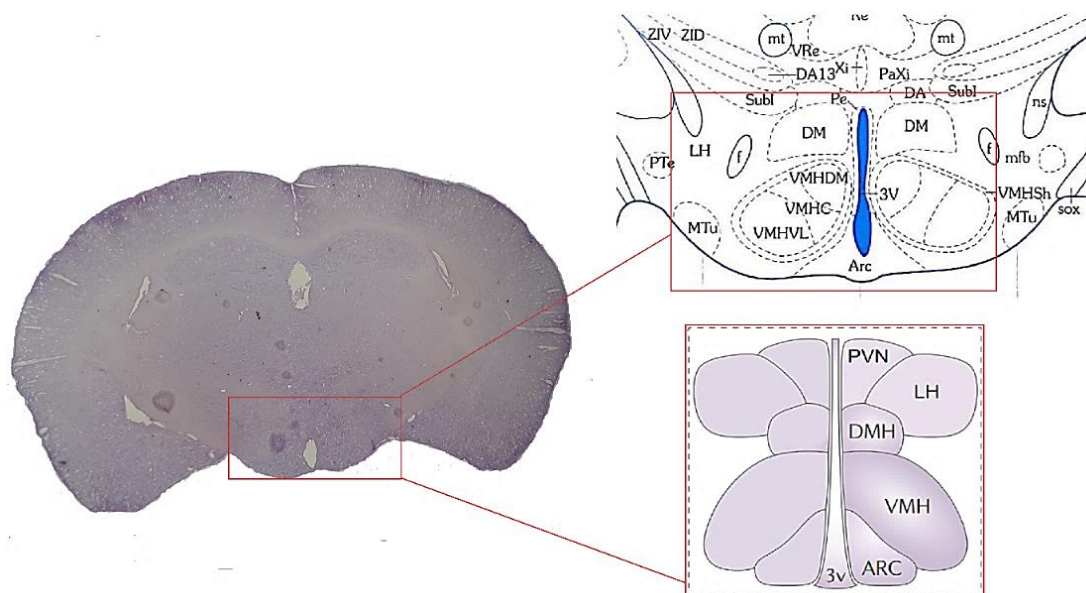
Legenda: Neuropeptídeo Y (NPY), pró-opiomelanocortina (POMC), proteína relacionada ao *agouti* (AgRP), peptídeo derivado de cocaína (CART).

Nota: Quando há uma redução do tecido adiposo, há também uma redução dos níveis de leptina, levando a um aumento dos neurônios orexígenos, aumentando a sensação de fome e reduzindo o metabolismo basal, enquanto um aumento dos níveis de leptina aumentam a ativação de neurônios anorexígenos o que leva a uma redução da fome e um aumento no metabolismo basal.

Fonte: A autora, 2020.

O hipotálamo localiza-se dorsalmente ao tálamo, rostralmente ao quiasma óptico e caudalmente aos corpos mamilares. Dentro dele, o núcleo ARC, o núcleo PVN e o núcleo ventromedial (VMH), dorsomedial (DMH) e LH<sup>(43, 44, 47)</sup> estão envolvidos na homeostase energética. O núcleo ARC do hipotálamo está localizado na parte inferior do terceiro ventrículo (3V), próximo a eminência mediana (ME), uma estrutura da barreira hematoencefálica (BHE) que evoluiu para permitir a troca seletiva entre peptídeos transportados pelo sangue e líquido cefalorraquidiano e neurônios do núcleo ARC<sup>(43)</sup>. A Figura 3 esquematiza as regiões do hipotálamo de um camundongo.

Figura 3 - Núcleos hipotalâmicos de camundongo C57BL/6 envolvidos na homeostase energética



Legenda: Terceiro ventrículo (3V), núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH ou DM), núcleo lateral do hipotálamo (LH), núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH).

Fonte: adaptado de Paxinos e Franklin<sup>(48)</sup> e Cui, Lopez<sup>(49)</sup>.

### 1.3 Leptina e Adiponectina

O principal papel do tecido adiposo era tradicionalmente servir como local de armazenamento de energia na forma de triacilgliceróis, mas hoje em dia o tecido adiposo é reconhecido como o maior órgão endócrino do corpo humano<sup>(50)</sup>. O tecido adiposo é conhecido por expressar e secretar uma variedade de proteínas conhecidas como "adipocinas", que inclui a leptina, adiponectina, resistina, visfatina<sup>(51, 52)</sup>, vaspina<sup>(53)</sup> e omentina<sup>(54, 55)</sup> além de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), interleucina (IL)-6 e proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1<sup>(56)</sup>.

As adipocinas contribuem para a regulação do apetite e saciedade, distribuição de gordura corporal, secreção e sensibilidade à insulina, gasto de energia, função endotelial, inflamação, pressão arterial e hemostasia<sup>(10)</sup>. Os níveis plasmáticos das adipocinas são regulados sob diferentes condições metabólicas, como obesidade, jejum, diabetes mellitus, entre outros<sup>(57)</sup>. A seguir a leptina e adiponectina serão

brevemente descritas uma vez que foram as duas adipocinas que foram estudadas no atual trabalho.

### 1.3.1 Leptina

A leptina é um produto do gene da obesidade (*ob*), que foi descoberto em 1994, em camundongos obesos *ob/ob* por Zhang e et al.<sup>(58)</sup>. Quase ao mesmo tempo, o gene *ob* foi descoberto no cromossomo 7q31 em humanos. O produto desse gene foi chamado leptina (da palavra grega *leptos* que significa magro). A leptina regula a ingestão de alimentos diminuindo o apetite e aumentando o gasto energético através de sua atuação no SNC<sup>(59, 60)</sup>.

A leptina é quase exclusivamente expressa e produzida pelo tecido adiposo branco<sup>(61)</sup>, mas também pode ser secretada em menor quantidade por outros tecidos, como o epitélio gástrico e o cérebro<sup>(62)</sup>. Seus níveis aumentam e diminuem em proporção direta a massa de tecido adiposo<sup>(39, 43)</sup>, sendo assim, o aumento da massa adiposa está associada com aumento da quantidade de leptina, o que torna a leptina um indicador do total da massa adiposa<sup>(56)</sup>.

O efeito da leptina no SNC é de promover diminuição do consumo alimentar e do peso corporal, além de aumentar o gasto energético<sup>(63)</sup>. O hipotálamo tem um complexo circuito neural de regulação do balanço energético, na qual a leptina tem um papel importante. Mais especificamente, as regiões basomediais do hipotálamo relacionadas com a regulação do comportamento alimentar (núcleos arqueado, ventromedial e área hipotalâmica lateral), contêm a maioria de receptores de leptina no cérebro<sup>(64)</sup>.

A isoforma de seu receptor envolvida na regulação do peso corporal é o de forma longa (OBRb), que possui o domínio intracelular apto de transmitir o sinal transducional da ligação da leptina<sup>(65)</sup>. O receptor OBRb faz parte da família de receptores classe I de citocinas, que após sua ligação com a leptina ativa o sistema JAK/STAT<sup>(66)</sup>.

A ligação com a leptina resulta no recrutamento do Janus quinase 2 (JAK2) que se liga de forma não covalente ao receptor OBRb e inicia a fosforilação de resíduos de tirosina do domínio intracelular do OBRb. A fosforilação do resíduo Tyr1138 recruta

o sinal de transdução e ativador de transcrição 3 (STAT3) que, uma vez fosforilado, dimeriza e é translocado para o núcleo onde se liga com sequências promotoras do ácido desoxirribonucleico (DNA) e regula a transcrição de genes-alvo<sup>(67)</sup>. A ação da leptina também envolve a fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS) e posterior ativação da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-K), resultando na fosforilação de proteínas quinase B (AKT)<sup>(68)</sup>.

A ligação da leptina com o seu receptor acontece em neurônios secretores de neuropeptídeos e neurotransmissores que aumentam (orexígenos) ou diminuem (anorexígenos) a ingestão alimentar. O aumento da leptina plasmática leva à supressão da atividade de neurônios que co-expressam o NPY, AgRP e o ácido gama-aminobutírico (GABA). Esses neurônios agem estimulando a ingestão alimentar. Por outro lado, o aumento da leptina plasmática estimula a atividade de neurônios que secretam POMC e CART<sup>(9)</sup>. Os neurônios produtores de POMC têm efeito anorexígeno, uma vez que a clivagem proteica do POMC produz o hormônio alfa-MSH, que ao se ligar aos receptores de melanocortina (MC4R) provoca a redução do consumo alimentar. Por outro lado, o AgRP atua como antagonista endógeno do MC4R, bloqueando o efeito anorexígeno do alfa-MSH<sup>(69)</sup>.

Embora o principal efeito biológico da leptina no SNC seja o controle da ingestão alimentar e do gasto energético, existe correlação significativa entre hiperleptinemia e estado inflamatório que ocorre nas doenças crônicas, o que sugere outros efeitos biológicos associados à leptina<sup>(61)</sup>. De fato, observa-se um aumento da resposta pró-inflamatória na presença de hiperleptinemia<sup>(70, 71)</sup>. A leptina em altas concentrações é capaz de aumentar a produção de TNF-alfa e a ativação de macrófagos<sup>(70)</sup> e, por outro lado, parece que o TNF-alfa e a IL-6 são capazes de estimular a produção de leptina pelos adipócitos<sup>(71, 72)</sup>. Além disso, a hiperleptinemia promove agregação plaquetária<sup>(73, 74)</sup> e aumento de colesterol nos macrófagos<sup>(75)</sup>.

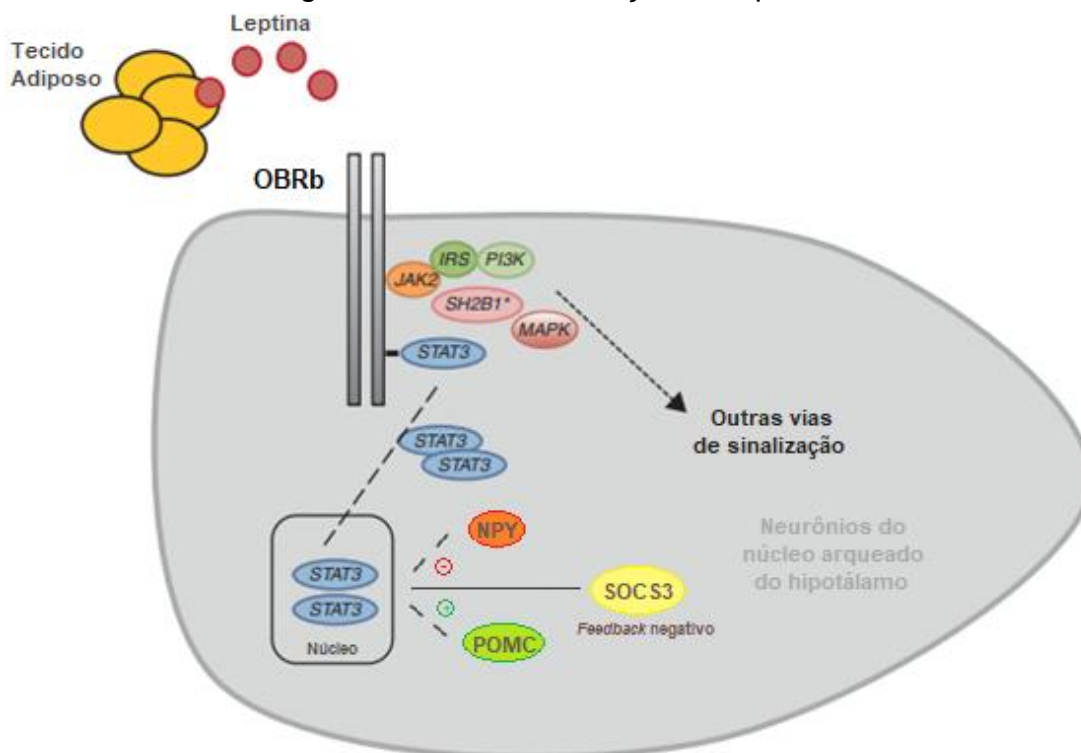
Dentre os mecanismos envolvidos no controle da sinalização da leptina, o que tem maior destaque são os membros da família dos supressores de sinalização de citocinas (SOCS) que atuam no controle negativo da sinalização da leptina no hipotálamo. Os SOCS são conhecidos como reguladores negativos da sinalização de citocinas via inibição da transdução do sinal JAK/STAT<sup>(76)</sup>. Em condições basais, os SOCS são expressos em um valor relativamente baixo, mas quando são estimulados por citocinas têm a sua expressão muito aumentada<sup>(77)</sup>. No hipotálamo, após ligação da leptina ao seu receptor OBRb e ativação do JAK/STAT, um dos genes alvo de

regulação da transcrição é o SOCS3<sup>(78)</sup>. A regulação de feedback negativo promovido pelo SOCS na atividade das citocinas ocorre por interferir na sinalização do receptor OBRb por se combinar aos resíduos tirosina no domínio intracelular<sup>(79)</sup>. Sabe-se que a resistência à leptina vem acompanhada por aumento da expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) de SOCS3 no hipotálamo. Uma das explicações seria por sua ação na inibição da sinalização do receptor OBRb e, conseqüentemente, da inibição da fosforilação do JAK2<sup>(80)</sup>. O SOCS3 também diminui a sinalização do receptor de insulina contribuindo para a resistência à insulina<sup>(81)</sup>. Ou seja, o aumento da expressão do SOCS3 favorece o aparecimento de alterações metabólicas como hiperfagia, ganho de peso, diminuição da sensibilidade dos hormônios leptina e insulina<sup>(82)</sup>. Baseado nisso, abre uma perspectiva para que algum fator que atue na diminuição da expressão de SOCS3 ou na inibição de fatores responsáveis por aumentar o SOCS3 possam ser estudados como um tratamento em potencial nos distúrbios metabólicos (Figura 4).

Vale a pena ressaltar, que existe uma interação significativa entre a leptina e a insulina no hipotálamo, para a regulação da sensibilidade à insulina periférica e a glicemia<sup>(81)</sup>. Não existem diferenças estruturais entre os receptores de insulina expressos nos tecidos periféricos e no SNC<sup>(83)</sup>. Esta sobreposição de vias, também conhecida como *cross-talk* molecular, sugere que ambos os hormônios exerçam um papel regulador sobre os efeitos fisiológicos de cada um deles. A transdução do sinal da leptina sofre um controle por vias paralelas de sinalização celular, sendo que a insulina se destaca como o principal modulador do sinal da leptina no hipotálamo<sup>(58)</sup>. Assim, é plausível dizer que a resistência à leptina e a resistência à insulina compartilham uma causa em comum, já que as vias de sinalização intracelular de leptina e insulina nos neurônios hipotalâmicos apresentam convergência entre si<sup>(84)</sup>. No hipotálamo, a insulina promove a ativação de duas vias principais de sinalização. A primeira depende do recrutamento e fosforilação de substratos do IRSs em tirosina, promovendo a ligação e ativação da enzima PI3K, controlando assim, o ritmo de disparos neuronais e a liberação de neurotransmissores nas sinapses efectoras<sup>(84)</sup>. A segunda via depende da enzima JAK2 a qual possui atividade tirosina quinase, que recruta e fosforila o STAT3, responsável por conectar o sinal da insulina ao controle de transcrição de genes de neurotransmissores envolvidos na regulação da fome e da termogênese<sup>(65, 66)</sup>. Ambos os hormônios, insulina e leptina, atuam sobre vias de sinalização no hipotálamo reprimindo os circuitos neuronais anabólicos que estimulam

a busca por alimento e inibem o gasto energético, incitando circuitos neuronais catabólicos que dão saciedade e aumentam o gasto energético<sup>(85)</sup>.

Figura 4 - Via de sinalização da leptina



Legenda: Substrato do receptor de insulina (IRS), janus quinase (JAK), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), neuropeptídeo Y (NPY), receptor de leptina de forma longa (OBRb), pró-ópiomelanocortina (POMC), proteína supressora de sinalização de citocina (SOCS), transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT).

Nota: A leptina é secretada pelo tecido adiposo e circula pela corrente sanguínea para atuar nos neurônios hipotalâmicos, principalmente no núcleo arqueado do hipotálamo. No balanço energético, a leptina se liga ao seu receptor (OBRb) estimulando a autofosforilação do resíduo de tirosina encontrada na proteína JAK2, o que permite o recrutamento e fosforilação do fator de transcrição STAT3. O STAT3 modula a transcrição dos neuropeptídeos, ativando POMC e inibindo NPY. Quando há alterações nesta via, como na hiperleptinemia, o STAT3 estimula a transcrição de SOCS3, que atua como feedback negativo desta via.

Fonte: adaptado de Farooqi e O'Rahilly<sup>(86)</sup>.

### 1.3.2 Adiponectina

A descoberta da adiponectina ocorreu em 1990 por quatro diferentes grupos independentes, sendo também denominada como Acrp-30 (adipocyte complement-related protein of 30kDa)<sup>(87)</sup>, ADIPOQ<sup>(88)</sup>, Apm1 (Adipose Most Abundant Gene

Transcript 1)<sup>(89)</sup> e GBP28 (gelatine-binding protein of 28kDa)<sup>(90)</sup>. A adiponectina é o produto da transcrição do gene apMI, sendo a proteína mais abundantemente secretada pelo tecido adiposo<sup>(89)</sup>. A adiponectina é composta por 244 aminoácidos e dividida em três domínios, domínio colágeno-terminal, uma região variável e um domínio globular carboxi-terminal<sup>(88)</sup>. A maioria da adiponectina circulante é composta por complexos da proteína íntegra<sup>(91)</sup>. A regulação transcricional do gene da adiponectina envolve fatores de transcrição como a proteína ligada ao elemento regulador de esterol (SREBP), receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR) e da proteína ligada ao elemento responsivo ao carboidrato (ChREBP)<sup>(92)</sup>. A adiponectina é produzida e secretada exclusivamente por adipócitos<sup>(63)</sup>.

Os receptores da adiponectina foram descobertos por Yamauchi et al.<sup>(93)</sup>. Yamauchi identificou dois receptores principais, o receptor da adiponectina 1 (AdipoR1) e receptor da adiponectina 2 (AdipoR2) e a ação da adiponectina nas células é mediada, principalmente por esses dois receptores<sup>(93)</sup>. Entretanto, outro receptor de adiponectina foi identificado, a T-caderina<sup>(94)</sup>. O AdipoR1 é abundantemente expresso no músculo esquelético de humanos e de roedores, enquanto o AdipoR2 é predominantemente expresso no fígado de roedores e no fígado e músculo esquelético de humanos<sup>(93)</sup>. A ligação da adiponectina com AdipoR1 ativa principalmente a via da proteína quinase ativada por AMP, ao passo que a ligação com o AdipoR2 está mais relacionada à ativação do PPAR-alfa<sup>(95)</sup>. A T-caderina não tem o domínio intracelular para a transdução de sinal, mas pode participar da cascata de sinalização intracelular, competindo com os receptores AdipoR1 e AdipoR2<sup>(96)</sup>.

A adiponectina é a adipocina mais abundante no plasma, compondo 0,01% do total de proteínas plasmáticas<sup>(97)</sup> e a expressão de AdipoR1 e AdipoR2 no músculo e no fígado está negativamente associada ao estado pós-prandial e à resistência à insulina<sup>(98)</sup>. Demonstrou-se ainda que o PPAR-gama, um ativador transcricional de genes de vários adipócitos, é necessário para a indução da expressão da adiponectina, por outro lado, o TNF-alfa e a Il-6 diminuem a transcrição e secreção deste hormônio<sup>(87)</sup>. Desse modo, a resistência à insulina não leva apenas a redução da concentração circulante de adiponectina, mas também a diminuição da expressão de seus receptores, o que, por sua vez, pode resultar em uma resistência à insulina mais pronunciada. Por outro lado, o aumento da adiponectina ocorre na privação calórica<sup>(63)</sup>, que é facilmente alcançado quando o indivíduo tem o hábito de fazer jejum.



A adiponectina que circula no plasma desempenha um papel potencializador da ação da insulina e diminui a resistência à insulina em humanos e em modelos experimentais. Estudos em animais indicam um efeito protetor da adiponectina sobre a resistência à insulina, agindo na supressão da gliconeogênese hepática por meio da redução da expressão gênica das enzimas fosfoenolpiruvato carboxilase e glicose-6-fosfato, e no aumento da captação da glicose e da oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético. Um dos principais eventos mediadores desses efeitos é a fosforilação e subsequente ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), enzima central para a homeostase energética da célula<sup>(99, 100)</sup>. Cabe destacar que, além de seus efeitos sobre a sensibilidade à insulina, a adiponectina parece atuar na secreção de insulina<sup>(101)</sup> e na prevenção da apoptose de células beta-pancreáticas, o que parece estar relacionado à ativação das quinases regulada por sinal extracelular 1 e 2 (ERK 1/2) ou à proteína quinase B (PKB/Akt)<sup>(102)</sup>.

Observa-se ainda que, em camundongos, a adiponectina atua em diversos processos no fígado diminuindo a esteatose hepática e à hipertrigliceridemia, como por exemplo, na promoção da oxidação de ácidos graxos pelo aumento da atividade da enzima carnitina palmitoil transferase I, na inibição da síntese de ácidos graxos pela redução da atividade das enzimas acetil-CoA carboxilase e da ácido graxo sintase, e na redução da produção de mediadores pró-inflamatórios<sup>(103)</sup>. No tocante aos efeitos da adiponectina sobre processos inflamatórios, destacam-se a inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF-alfa e a IL-8<sup>(104, 105)</sup>. A inflamação sistêmica, condição envolvida na resistência à insulina, também pode sofrer influência da adiponectina. Nesse contexto, a adiponectina influencia a redução da expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios (IL-6 e TNF-alfa)<sup>(106)</sup> e no aumento de mediadores anti-inflamatórios (IL-10)<sup>(107)</sup>. Para comprovar tal fato, pessoas com hipoadiponectinemia apresentam resistência à insulina, dislipidemia e elevada concentração de citocinas inflamatórias, como a IL-6, IL-8 e proteína C-reativa<sup>(108, 109)</sup>.

Em paralelo às suas ações clássicas em tecidos periféricos, a adiponectina pode desempenhar uma importante função como controladora da fome e da termogênese ao atuar no SNC<sup>(110, 111)</sup>. A ação da adiponectina no hipotálamo se dá através do receptor AdipoR1, que ativa o sinal de transdução através da via IRS 1/2-

Akt-FOXO1\* e da via JAK2-STAT3<sup>(111)</sup>. Entretanto, a ação da adiponectina no SNC ainda não um consenso. Em um trabalho os autores demonstraram que o tratamento sistêmico com adiponectina em roedores não inibiu o apetite, mas diminuiu o peso corporal e aumentou o gasto energético e que a ação termogênica da leptina se deu através do aumento da expressão do RNAm da proteína desacopladora 1 (UCP-1) no tecido adiposo marrom<sup>(112)</sup>.

#### 1.4 Jejum Intermitente (JI)

Ao longo dos anos os animais evoluíram levando a adaptações comportamentais e fisiológicas que lhes permitiram sobreviver a períodos de escassez ou ausência de alimentos. Os mamíferos têm órgãos como o fígado e o tecido adiposo, que funcionam como depósitos de energia que permitem o jejum/inanição por períodos variáveis dependendo da espécie. É importante ressaltar que os sistemas metabólico, endócrino e nervoso evoluíram de maneira que permitiram altos níveis de desempenho físico e mental quando em jejum<sup>(16)</sup>.

O JI consiste em períodos de abstinência voluntária de comida e bebida e tem uma variedade de formatos diferentes. Existem muitos modelos de JI (jejum por tempo restrito, modelo 5:2 ou seja, cinco dias se alimentando e dois dias com jejum total, alternância de dias com alimentação livre com dieta de 500 Kcal, jejum em dias alternados, entre outros)<sup>(13)</sup>. O jejum em dias alternados, que é um dos muitos tipos de JI, envolve dias alternados de jejum, durante os quais não são consumidas calorias, e dias de alimentação, durante os quais alimentos e bebidas são consumidos *ad libitum*<sup>(13)</sup>. Cada um tem a sua particularidade. Existe uma parcela das pessoas que acha mais fácil seguir planos como esses do que fazer uma restrição calórica monótona todos os dias<sup>(14)</sup>

Inúmeros indicadores fisiológicos de saúde são melhorados em roedores mantidos em JI, incluindo: níveis reduzidos de insulina e leptina plasmáticas, que aumentam paralelamente a sensibilidade à insulina e à leptina; massa corporal (MC) reduzida; pressão arterial reduzida; inflamação no fígado reduzida<sup>(17-19)</sup>. Um estudo

---

\* Forkhead box protein (FOX).

com JI em humanos mostrou que o grupo que fazia JI no modelo dias alternados, basicamente ocorreu redução do número de calorias ingeridas, como acontece com qualquer outra dieta, e, este fato por si só, pode ser o que levou ao emagrecimento<sup>(113)</sup>. Varady e Hellerstein (2007) sugeriram que o JI, mais especificamente o jejum de dias alternados, pode efetivamente modular os fatores de risco metabólicos e funcionais, prevenindo ou retardando a ocorrência futura de doenças crônicas, pelo menos em modelos animais<sup>(15)</sup>. E estudos randomizados controlados recentes em seres humanos demonstraram que o JI melhora muitos indicadores de saúde em indivíduos saudáveis e naqueles com alguma doença crônica<sup>(16)</sup>. Além disso, o JI pode retardar o início e a progressão da disfunção e degeneração neuronal em modelos animais das doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington<sup>(16)</sup>. O aumento de corpos cetônicos, que podem ser usados como fonte de energia, são conhecidos por fornecer alguns efeitos protetores como neuroproteção e resistência a ataques epiléticos<sup>(114)</sup>.

Por outro lado, existem estudos que mostram efeitos adversos provocados pela prática do JI. Tatulli et al.<sup>(115)</sup> mostraram que o JI não exerce efeitos neuroprotetivos, pelo contrário, exacerba a morte neuronal em consequência das concentrações de lipídeos pró-inflamatórios em camundongos<sup>(115)</sup>. Em outro estudo com camundongos hipercolesterolêmicos submetidos ao JI, houve aumento das reservas de tecido adiposo corporal e das concentrações plasmáticas de colesterol total (CT), da lipoproteína de baixa densidade (LDL), glicose e insulina, sugerindo o desenvolvimento de intolerância à glicose e resistência à insulina<sup>(116)</sup>. Além disso, o JI por seis semanas em ratas aumentou as concentrações plasmáticas de triacilglicerol (TAG), a reserva de tecido adiposo mesentérico e total, e causou hiperglicemia e comportamento alimentar compulsivo, indicando risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 e houve também recuperação do peso perdido após a interrupção do JI<sup>(117)</sup>.

Estudos em humanos mostraram que indivíduos diabéticos praticantes de JI desenvolveram hipoglicemia, cetoacidose, desidratação, hipotensão e trombose<sup>(118)</sup>. Em adolescentes, a prática de fazer jejum foi relatada como possível causador de distúrbios alimentares<sup>(119)</sup>. Homens de meia idade tiveram elevação significativa da pressão sanguínea e do colesterol total após fazer JI<sup>(120)</sup>. Aumento das concentrações plasmáticas de cortisol noturno também foi reportado em vários estudos após o jejum do Ramadã, sugerindo alteração no ciclo circadiano<sup>(121, 122)</sup>. Em atletas, o jejum

ocasionou um aumento significativo da sensação de fadiga e diminuição do desempenho anaeróbico<sup>(123)</sup>.

Os trabalhos com JI tendem a mostrar que ele afeta negativamente a reprodução e o ciclo estral de fêmeas, alterando as concentrações plasmáticas de estradiol e hormônio luteinizante<sup>(124)</sup>. Em mulheres não obesas, o JI piorou a tolerância à glicose<sup>(125)</sup> e diminuiu o gasto energético basal<sup>(126)</sup>. E um estudo que acompanhou homens saudáveis que fizeram JI de três dias e observaram que houve picos mais acentuados na concentração de insulina e quedas mais abruptas nas concentrações de insulina e glicose, sugerindo que em longo prazo este seria um ambiente hormonal mais favorável para o desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2<sup>(127)</sup>.

Esses resultados aparentemente conflitantes podem ser consequência do elevado número de modelos experimentais existentes e variáveis que podem interferir nos resultados, como duração do jejum, período do dia que é praticado, tipo de alimentação que se tem antes de fazer o jejum. Além disso, os estudos clínicos se concentraram principalmente em jovens com sobrepeso e adultos de meia idade, e não podemos generalizar para outras faixas etárias os benefícios e a segurança do JI que foram observados nesses estudos. Por isso, ainda não há um consenso sobre a prática do JI em longo prazo. É evidente que devemos sempre ter parcimônia ao extrapolar para humanos os resultados obtidos em modelo experimental.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo geral**

Estudar os efeitos do jejum intermitente sobre a sinalização da leptina e neurotransmissores que controlam o apetite/saciedade e a inflamação hipotalâmica em camundongos alimentados com dieta rica em frutose.

### **2.2 Objetivos específicos:**

- a) avaliar a evolução da massa corporal, ingestão alimentar e energética;
- b) avaliar o metabolismo glicêmico e lipídico;
- c) verificar a expressão gênica dos mediadores da via de sinalização da leptina (JAK/STAT) no hipotálamo, assim como de neurotransmissores reguladores do apetite (NPY e POMC);
- d) avaliar a expressão gênica de marcadores inflamatórios no hipotalâmico.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e Dieta

Camundongos machos C57BL/6 foram mantidos em gaiolas ventiladas (Nexgen system, Allentown Inc., PA, EUA) sob condições controladas de temperatura ( $21\pm 2$  °C) e umidade ( $60\pm 10\%$ ). Os animais foram submetidos a um ciclo invertido de 12/12 h claro-escuro e tiveram livre acesso a comida e água.

Os procedimentos seguiram o guia de experimentação com animais (Publicação do Instituto Nacional de Saúde (NIH) 85-23, revisada em 1996) e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Cuidados e Uso de Animais Experimentais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (protocolo nº CEUA 040/2016). Todo esforço foi feito para minimizar o sofrimento dos animais.

Quarenta camundongos com 12 semanas de idade foram divididos aleatoriamente em dois grupos ( $n=20$  cada grupo) e alimentados com dietas distintas por oito semanas: dieta controle (C, 10% de energia provenientes de lipídios, 14% de energia provenientes de proteínas, 76% de energia provenientes de carboidratos, totalizando 1590 kJ/100g de dieta) ou dieta rica em frutose (*high fructose*, 10% de energia provenientes de lipídios, 14% de energia provenientes de proteínas, 76% de energia provenientes de carboidratos (sendo 50% do valor energético total provenientes da frutose), totalizando 1590kJ/100g de dieta). As dietas foram feitas por PragSoluções (Jaú, SP, Brasil) de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição para roedores (AIN93M)<sup>(128)</sup> (Tabela 1).

Após oito semanas com as suas respectivas dietas experimentais, os animais foram separados em quatro grupos ( $n=10$  cada grupo): Grupo controle (C); Controle submetido ao jejum intermitente (C-JI); grupo com dieta rica em frutose (HFru); e grupo com dieta rica em frutose submetido ao jejum intermitente (HFru-JI). Os camundongos submetidos ao JI foram alimentados *ad libitum* por 24 h, seguidos por 24 h de restrição alimentar (jejum intermitente) por quatro semanas, enquanto o grupo que não foi submetido ao jejum teve livre acesso ao alimento, totalizando 12 semanas do experimento. Veja o desenho esquemático dos grupos experimentais na Figura 5.

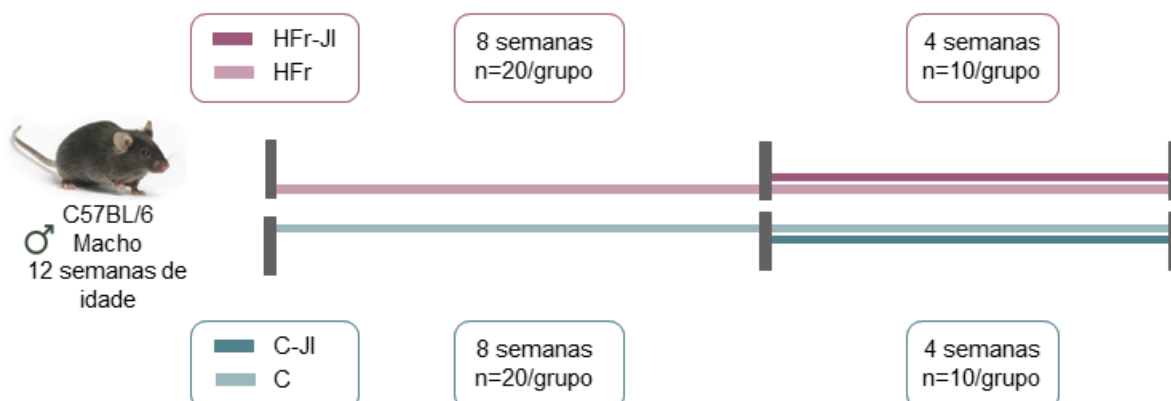
Tabela 1 - Composição das dietas experimentais

<b>Ingredientes (g/kg)</b>	<b>Controle</b>	<b>Frutose</b>
Caseína	140,0	140,0
Amido de Milho	620,692	146,392
Sacarose	100,0	100,0
Frutose	-	474,3
Óleo de soja	40,0	40,0
Fibra	50,0	50,0
Mistura de Vitaminas*	10,0	10,0
Mistura de Minerais**	35,0	35,0
Cisteína	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5
Antioxidantes	0,008	0,008
Massa total	1000,0	1000,0
Carboidratos (% energia)	76	76
(Frutose) (% energia)	(0)	(50)
Proteína (% energia)	14	14
Lipídios (% energia)	10	10
Energia Total (kJ/kg)	15915,9	15915,9

Legenda: Mistura de vitaminas\* e de minerais\*\* segundo a recomendação da AIN-93M.

Fonte: Reeves et al. <sup>(128)</sup>

Figura 5 - Desenho esquemático dos grupos experimentais, de acordo com as diferentes dietas oferecidas



Legenda: Controle (C), rico em frutose (HFr, *high fructose*), jejum intermitente (JI).

Nota: As linhas rosa claro e azul claro representam os animais com dieta *ad libitum*, enquanto as linhas rosa escuro e azul escuro representam os animais submetidos ao jejum intermitente.

Fonte: A autora, 2020.

### 3.2 Massa corporal e Ingestão alimentar

A massa corporal dos animais foi verificada semanalmente (todas as sextas-feiras, 11 horas). A ingestão alimentar (a diferença entre o alimento oferecido e a quantidade de alimento deixado na gaiola após 24 h em gramas) foi determinada diariamente às 8 horas. A ingestão energética foi calculada com base na quantidade de alimento ingerido (g/dia), multiplicada pela energia fornecida pela dieta (kJ).

### 3.3 Sacrifício e extração do hipotálamo

Após 12 semanas de tratamento, os animais foram submetidos ao jejum por 6 horas e depois sacrificados. Todos os animais (n=40) foram heparinizados (200 mg/kg) e anestesiados profundamente com pentobarbital de sódio (150 mg/kg). Uma parte dos animais (5 animais/grupo) foi separada aleatoriamente para estudar o hipotálamo (totalizando 20 animais). As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca (átrio direito), o plasma separado por centrifugação e congelado a -80 °C para posteriores análises plasmáticas. O crânio foi aberto, o encéfalo removido



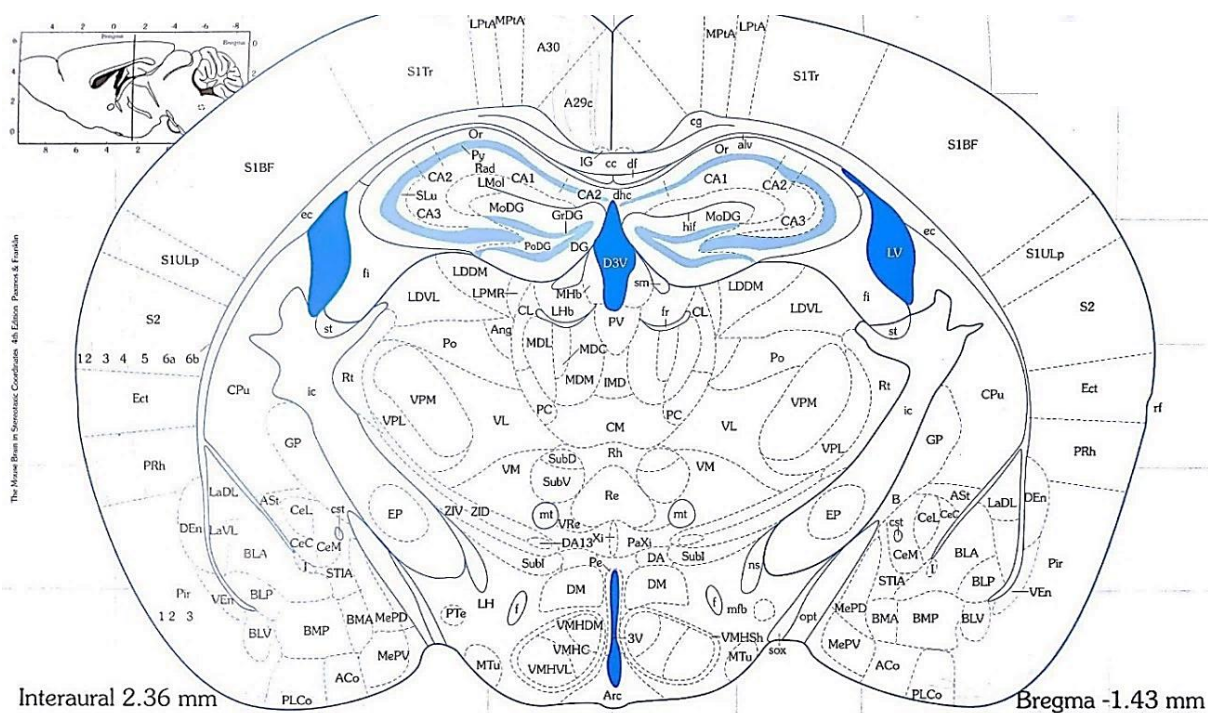
e o hipotálamo, delimitado dorsalmente pelo tálamo, rostralmente pelo quiasma óptico e caudalmente pelos corpos mamilares, foi removido com o auxílio de um *punch* de biópsia (3 mm). Este foi então congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para posterior análise molecular<sup>(129)</sup>.

Os animais restantes foram perfundidos através do ventrículo esquerdo do coração com solução salina a 0,9% e depois com solução fixadora (paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4). Após a perfusão, o crânio foi aberto e o encéfalo removido e mantido em solução fixadora de sacarose a 20% por 2h a 4 °C e depois transferido para uma solução tampão de fosfato 0,1 M a pH 7,4 com sacarose a 30%, à noite). Após, os encéfalos foram inseridos no meio meio de inclusão específico de corte (OCT, Tissue-Tek, Sakura Finetek Europe, Holanda) e congelados por imersão em nitrogênio líquido e armazenados em um freezer a -20 °C.

#### **3.4 Microtomia do cérebro do camundongo para análise do hipotálamo (cortes congelados no criostato)**

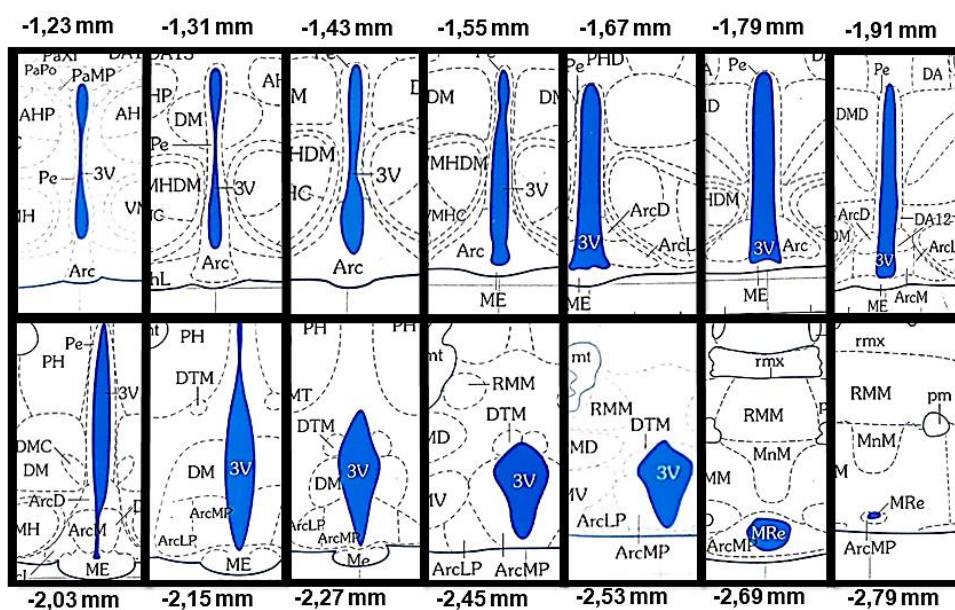
Os cérebros foram cortados em plano coronal para observar o hipotálamo usando as coordenadas estereotáticas (Bregma -1,23 mm a -2,79 mm) para camundongos <sup>(48)</sup> (Figuras 6 e 7). Utilizamos o criostato (Leica Biosystems modelo CM 1860, Wetzlar, Alemanha) a -20 °C e espessura nominal de 25 µm, e os cortes foram colocados em lâminas gelatinizadas e mantidas a -20 °C até realizar a técnica de imunofluorescência.

Figura 6 - Citoarquitetura das áreas do hipotálamo do camundongo C57BL/6



Fonte: Paxinos e Franklin<sup>(48)</sup>.

Figura 7 - Ilustração da localização do núcleo arqueado (ARC) seguindo as coordenadas estereotáxicas (Bregma) para camundongos C57BL/6 e demonstração dos diferentes formatos do terceiro ventrículo (3V)



Legenda: Terceiro ventrículo (3V), núcleo arqueado (Arc), núcleo dorsomedial (DM ou DMH), eminência mediana (ME).

Nota: Neste esquema destaca-se o terceiro ventrículo (3V), visto que ele é utilizado como referência anatômica para a localização do núcleo arqueado do hipotálamo.

Fonte: adaptado de Paxinos e Franklin<sup>(48)</sup>.

### 3.5 Imunofluorescência e microscopia confocal a laser do hipotálamo

Os cortes foram tratados com solução de tampão fosfato-salino/Triton (PBS/Triton) a 0,3% e bloqueados com albumina de soro bovino (BSA) a 5% por uma hora, marcadas imunologicamente com os anticorpos primários NPY e POMC diluídos com 1% de PBS/BSA, permanecendo refrigerados durante a noite. Na manhã seguinte, as amostras foram lavadas e marcadas com um anticorpo secundário conjugado com fluoróforo Alexa, contrastado com 4,6-diamino-2-fenilindole (DAPI, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e, em seguida, as lâminas foram montadas com slow-fade (Invitrogen, Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA), a fim de manter a fluorescência. Nos controles negativos, os anticorpos primários não foram adicionados. Observamos os cortes através do microscópio confocal de varredura a laser (Modelo C2; Nikon Instruments, Inc., Nova York, EUA).

### 3.6 Expressão gênica

Foram separados cinco hipotálamos diferentes de cada grupo, somando um total de 20 hipotálamos. Estes foram tratados com trizol (Invitrogen, Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA). Depois desta etapa, adicionou-se 200 µL de clorofórmio PA sobre o conteúdo extraído e em seguida o material foi centrifugado (12min a 120G a 4°C) para separar o DNA do RNA, e a porção correspondente ao extrato de RNA foi reservada. Adicionou-se 500 µL de isopropanol em cada eppendorf contendo RNA para que este precipitasse e novamente foi centrifugado (12min a 120G a 4°C). Em seguida o sobrenadante foi rejeitado, adicionou-se álcool 70% ao pellet para a purificação do RNA, os eppendorfs foram então centrifugados e o material foi descartado, posteriormente o material foi ressuscitado com 20 µL de água deionizada (MilliQ). O material foi levado ao spin por 10 segundos, depois submetido ao banho seco por 5 minutos a 50 °C e quantificado no espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA) para a padronização da concentração de RNA a ser utilizada.

Para a transcrição do RNA em DNA complementar (cDNA) foi utilizado 1µg de RNA que foi tratado com DNase I (Invitrogen) e depois foi adicionado ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para cessar a reação. A síntese da primeira cadeia de cDNA foi realizada usando iniciadores Oligo (dT) e a transcriptase reversa (ambos da Invitrogen, CA, EUA). Utilizou-se a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (q-PCR) com termociclador CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e SYBR Green (Invitrogen). Após a pré-desnaturação e ativação da polimerase por 4 minutos a 95°C, 40 ciclos foram realizados (90°C durante 10 segundos e 60°C por 15 segundos) seguido de uma curva de fusão (60 a 95°C com taxa de aquecimento de 0,1° C/s). A expressão gênica da beta-actina foi realizada em todas as amostras, sendo utilizada como controle endógeno para normalização do RNAm. Para os controles negativos adicionou-se aos poços água deionizada. A razão da expressão do mRNA foi calculada pelo Equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  onde  $-\Delta Ct$  representa a diferença entre o número de ciclos dos genes alvo e o controle endógeno<sup>(130)</sup>. Utilizamos os seguintes iniciadores: *Il-1beta*, *Il-6*, *Leptina*, *Npy*, *Obrb*, *Pomc*, *Socs3*, *Tnf-alfa* e *beta-actina* projetados usando o software Prime3<sup>(131, 132)</sup> conforme detalhado no Quadro. Os símbolos dos genes estão em itálico, com a primeira letra em maiúsculo<sup>(133)</sup>.

Quadro - Primers utilizados no q-PCR e suas respectivas sequências

Primer	5'-3'	3'-5'
<i>Il-1<math>\beta</math></i>	ACGGATTCCATGGTGAAGTC	CTCACAAGCAGAGCACAAGC
<i>Il6</i>	AGTTGCCTTCTTGGGAGTGA	ACAGGTCTGTTGGGAGTGGT
<i>Leptina</i>	CCTGTGGCTTTGGTCCTATC	TGATGAGGGTTTTGGTGTCA
<i>Npy</i>	TGGACTGACCCTCGCTCTAT	TAGTGTCGCAGAGCGGAGTA
<i>Obrb</i>	ACACTGTTAATTTACACCAGAG	TGGATAAACCCCTTGCTCTTCA
<i>Pomc</i>	CATTAGGCTTGGAGCAGGTC	CTTCTCGGAGGTCATGAAGC
<i>Socs3</i>	CTTCAGCTCCAAAAGCGAGT	AGCTGTGCGGGATAAGAAAG
<i>Tnf-<math>\alpha</math></i>	CCACCACGCTCTTCTGTCTA	CTGATGAGAGGGAGGCCATT
<i><math>\beta</math>-actina</i>	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTCTTGAAGGTCTCAA

Legenda: Interleucina (*Il*), neuropeptídeo Y (*Npy*), receptor de leptina de cadeia longa (*Obrb*), pró-opiomelanocortina (*Pomc*), proteína supressora da sinalização de citocina 3 (*Socs3*), fator de necrose tumoral (*Tnf*), beta-actina ( *$\beta$ -actin*).

Fonte: Untergasser et al.<sup>(131)</sup> e Koressaar e Remm<sup>(132)</sup>.

### 3.7 Análises plasmáticas

A glicemia de jejum, colesterol total e triacilglicerol foram medidos utilizando um espectrofotômetro automatizado com kits comerciais (Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil). Além disso, insulina (EZRMI-13K), leptina (EZML-82K) e adiponectina (EZMADP-60K) foram medidas com os kits de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (Millipore, Merck, Temecula, CA, EUA) com TP-Reader ELX800 (BioTek Instruments Winooski, VT, EUA). Além disso, foi realizado o índice de resistência à insulina em jejum (Fasting Insulin Resistance Indice, FIRi)<sup>(134)</sup>.

$$\text{FIRi (Mmol.IU/L}^2\text{)} = \text{glicose (mmol/L)} * \text{insulina (IU/L)} / 25 \quad (1)$$

### 3.8 Análise estatística

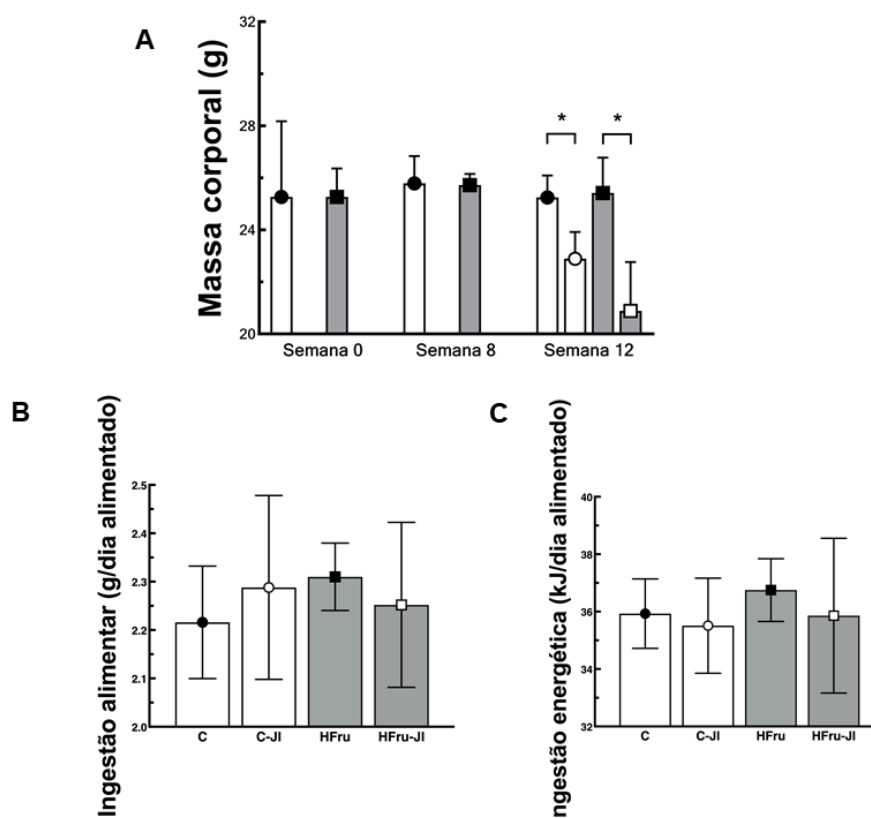
Os dados foram mostrados como média e desvio padrão (DP) e testados pelas análises de variância de Brown-Forsythe e Welch (ANOVA, que não assume DP igual entre os grupos) e pelos testes de comparação múltipla de Dunnett T3 (indicados para amostras pequenas)<sup>(135)</sup>. *Two-way* ANOVA foi usada comparando tipo de dieta *versus* JI. O teste *t-student* foi utilizado para comparar a massa corporal dos animais na semana 0 e 8 de experimento. O valor de  $P < 0,05$  foi consistente com o nível estatisticamente significativo (GraphPad Prism v. 8.2.1 para Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Massa corporal, ingestão alimentar e ingestão energética

Os resultados da massa corporal, ingestão alimentar e energética são mostrados na Figura 8. Antes do JI, não houve alterações na massa corporal (MC) quando comparados os grupos C vs. HFru, entretanto, após o JI, a MC diminuiu no grupo C-JI vs. C (-9,3%) e no grupo HFru-JI vs. HFru (-17,8%) (Figura 8A). Não houve diferenças na ingestão alimentar ou na ingestão energética nos dias de alimentação entre os grupos C, C-JI, HFru e HFru-JI (Figura 8B e 8C).

Figura 8 - Análises Biométricas



Legenda: (A) Massa corporal – Semana 0 (início do estudo), Semana 8 (após introdução das dietas experimentais), Semana 12 (após o protocolo de jejum intermitente) (B) Ingestão alimentar, (C) Ingestão energética; Grupos: Controle (C), rico em frutose (HFru, *high fructose*), jejum intermitente (JI); \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001.

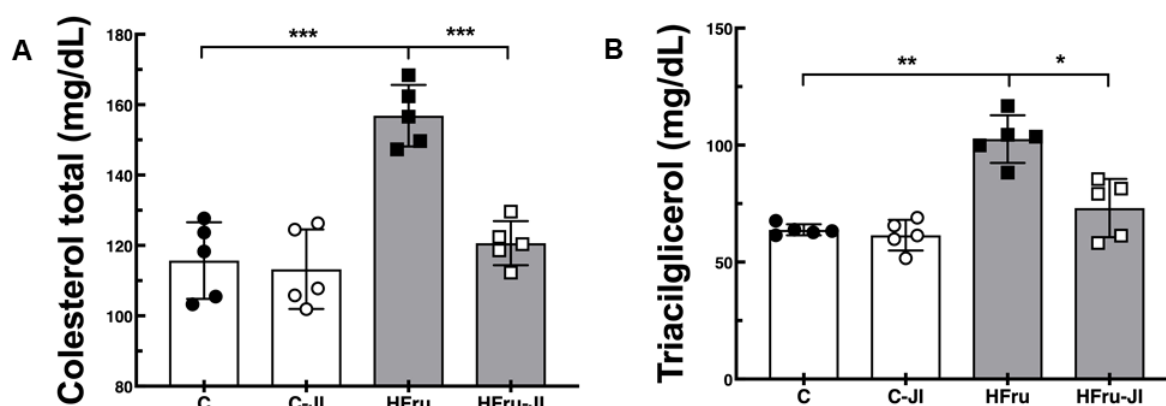
Nota: Média ± DP (n=10).

Fonte: A autora, 2020.

#### 4.2 Concentrações plasmáticas de triacilglicerol (TAG), colesterol total (CT), glicemia de jejum, insulina, Fasting Insulin Resistance Indice (FiRi), leptina e adiponectina

Colesterol Total e Triacilglicerol: o grupo HFru quando comparado ao grupo C, apresentou maior CT (+35,6%) e TAG (+60,8%), enquanto o JI diminuiu os níveis de CT (-23,1%) e TAG (-28,7%) no grupo HFru-JI quando comparado ao grupo HFru (Figura 9A e 9B).

Figura 9 - Análises plasmáticas (colesterol total e triacilglicerol)



Legenda: A) Colesterol Total, (B) Triacilglicerol; Grupos: Controle (C), rico em frutose (HFru, *high fructose*), jejum intermitente (JI); \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001.

Nota Média  $\pm$  DP (n=5).

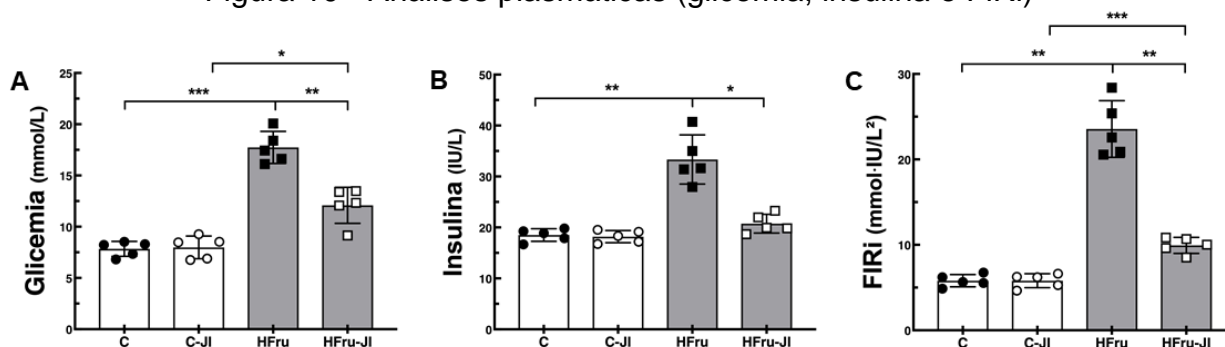
Fonte: A autora, 2020.

Glicemia e FiRi: houve um aumento no grupo HFru vs. C (+126,2% na glicemia; +297,2% no FiRi) e HFru-JI vs. C-JI (+51,4% na glicemia; +71,3% no FiRi), entretanto ocorreu redução da glicemia no grupo HFru-JI em comparação com o grupo HFru (-31,8% na glicemia; -56,9% no FiRi) (Figura 10A e 10C).

Insulina: a dieta rica em frutose levou a um aumento dos níveis de insulina no grupo HFru em comparação com o grupo C (80,2%), enquanto o JI levou a uma redução da insulina no grupo HFru-JI em comparação com o grupo HFru (-37,8%) (Figura 10B).



Figura 10 - Análises plasmáticas (glicemia, insulina e FiRi)



Legenda: (A) Glicemia, (B) Insulina, (C) FiRi; Grupos: Controle (C), rico em frutose (HFru, *high fructose*), jejum intermitente (JI); \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001.

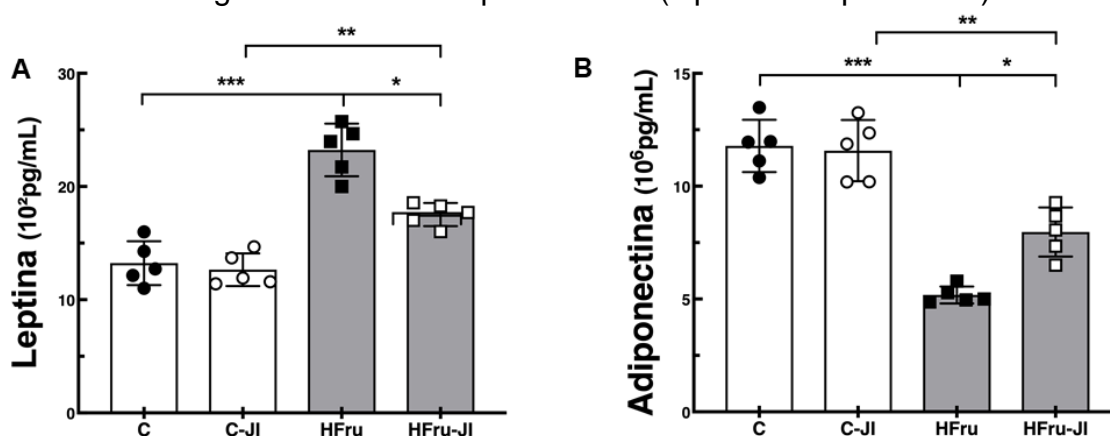
Nota: Média ± DP (n=5).

Fonte: A autora, 2020.

Leptina: ocorreu um aumento nos níveis de leptina nos grupos HFru vs. C (+75,5%) e no grupo HFru-JI vs. C-JI (+38,5%), enquanto houve redução da leptinemia no grupo HFru-JI em comparação ao grupo HFru (-24,5%) (Figura 11A).

Adiponectina: Os níveis de adiponectina diminuíram no grupo HFru em comparação ao grupo C (-56,1%) e no grupo HFru-JI em comparação ao C-JI (-31,2%). Por outro lado, foi observado aumento da adiponectina no grupo HFru-JI quando comparado ao grupo HFru (+53,9%) (Figura 11B).

Figura 11 - Análises plasmáticas (leptina e adiponectina)



Legenda: (A) Leptina, (B) Adiponectina; Grupos: Controle (C), rico em frutose (HFru, *high fructose*), jejum intermitente (JI); \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001.

Nota: Média ± DP (n=5).

Fonte: A autora, 2020.

A porcentagem de variação obtida do teste *two-way* ANOVA comparando tipo de dieta *versus* JI são mostrados na Tabela 2 (ver seção 4.3). Em todas as análises, a dieta teve um efeito dominante, exceto para a MC, onde o JI apresentou um impacto mais significativo.

### 4.3 Expressão gênica (q-PCR)

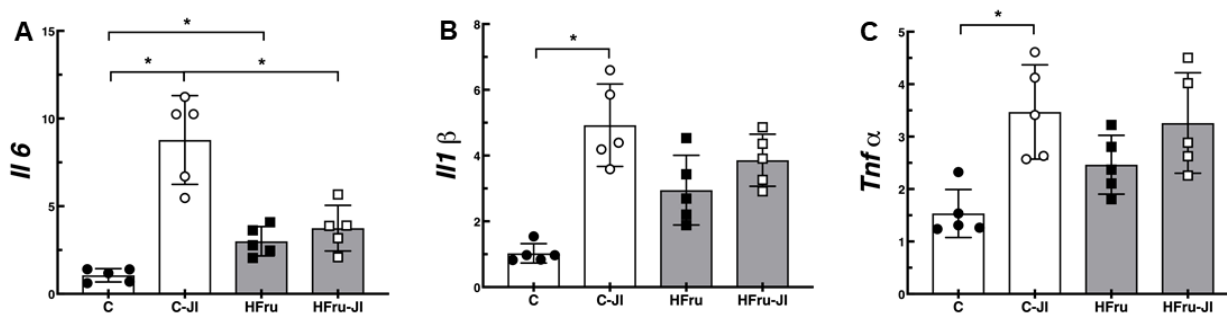
As Figuras 12 a 14 mostram os resultados da expressão dos genes analisados comparando os grupos experimentais.

*IL6*: tanto o JI quanto o tipo de dieta influenciaram a expressão gênica, levando a um aumento no grupo C-JI vs. C (+728%) e no grupo HFru vs. C (+183%). Entretanto, no grupo HFru-JI houve diminuição da *IL6* em comparação com o grupo C-JI (-57,3%) (Figura 12A).

*IL1 $\beta$* : a expressão gênica foi fortemente afetada pelo JI, com um aumento no grupo C-JI em comparação com o grupo C (+379%) (Figura 12B).

*Tnfa*: como na expressão da *IL1 $\beta$* , o *Tnfa* foi fortemente afetado pelo JI, levando a um aumento da expressão gênica no grupo C-JI em comparação com o grupo C (+126%) (Figura 12C).

Figura 12 - Expressão gênica hipotalâmica (*IL6*, *IL1 $\beta$*  e *Tnfa*)



Legenda: (A) interleucina 6 (*IL6*), (B) interleucina-1beta (*IL1 $\beta$* ), (C) fator de necrose tumoral alfa (*Tnfa*); Grupos: Controle (C), rico em frutose (HFru, *high fructose*), jejum intermitente (JI); \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001.

Nota: Média  $\pm$  DP (n=5).

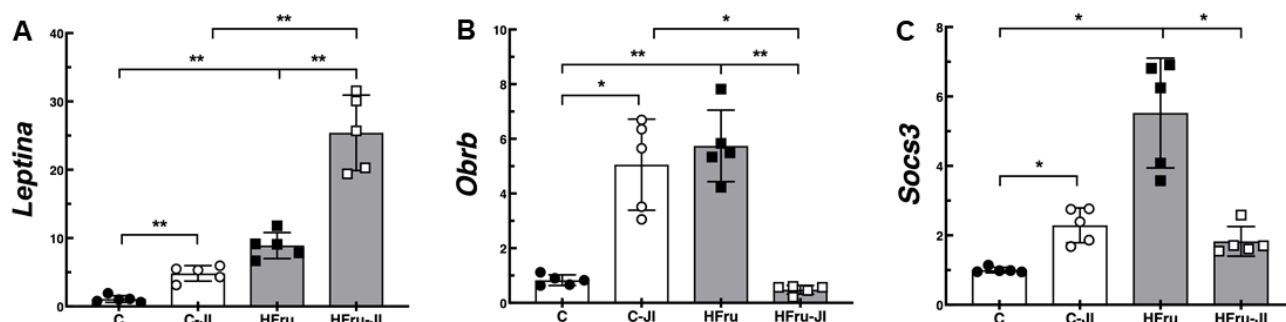
Fonte: A autora, 2020.

*Leptina*: houve um aumento na expressão gênica da *Leptina* no grupo HFru quando comparado ao grupo C (+725%). Enquanto o JI aumentou a expressão gênica no grupo C-JI vs. C (+ 348%). A expressão gênica de *Leptina* no hipotálamo também foi maior no grupo HFru-JI, quando comparado ao C-JI (+425%) e quando comparado ao grupo HFru (+185%) (Figura 13A).

*Obrb*: a expressão gênica do receptor *Obrb* foi menos expresso no grupo HFru-JI quando comparado ao grupo C-JI (-90%) e ao grupo HFru (-92%). No entanto, houve um aumento na expressão gênica do *Obrb* no grupo HFru quando comparado ao grupo C (+593%) e um aumento na expressão no grupo C-JI quando comparado ao grupo C (+509%) (Figura 13B).

*Socs3*: houve um aumento na expressão gênica do *Socs3* no grupo C-JI (+128%) e no grupo HFru (+451%) quando comparados ao grupo C, enquanto houve uma redução da expressão gênica no grupo HFru-JI quando comparado ao grupo HFru (-66,9%) (Figura 13C).

Figura 13 - Expressão gênica hipotalâmica (*Leptina*, *Obrb* e *Socs3*)



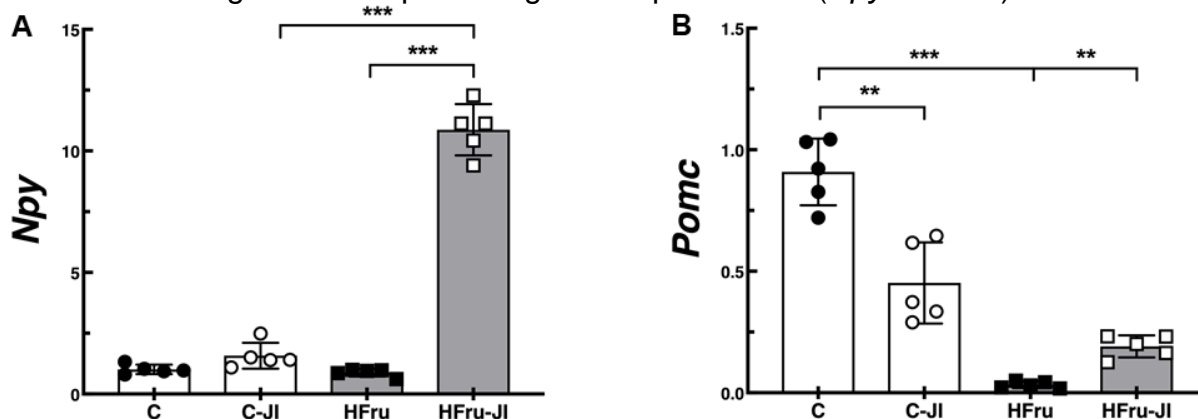
Legenda: (A) *Leptina*, (B) receptor de leptina de cadeia longa (*Obrb*), (C) supressor da sinalização de citocina 3 (*Socs3*); Grupos: Controle (C), rico em frutose (HFru, *high fructose*), jejum intermitente (JI); \*, \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001.

Nota: Média  $\pm$  DP (n=5).

Fonte: A autora, 2020.

*Npy*: houve um aumento acentuado na expressão gênica do *Npy* no hipotálamo no grupo HFru-JI. Este marcador foi maior comparando HFru-JI vs. C-JI (+589%) e comparando HFru-JI vs. HFru (+1137) (Figura 14A).

*Pomc*: houve uma redução acentuada na expressão gênica do *Pomc* no hipotálamo no grupo HFru (-97%) e no grupo C-JI (-50%) quando comparados ao grupo C. Por outro lado, houve um aumento na expressão gênica do *Pomc* no grupo HFru-JI quando comparado ao grupo HFru (+485%) (Figura 14B).

Figura 14 - Expressão gênica hipotalâmica (*Npy* e *Pomc*)

Legenda: (A) neuropeptídeo Y (*Npy*, orexígeno), (B) pró-opiomelanocortina (*Pomc*, anorexígeno); Grupos: Controle (C), rico em frutose (HFru, *high fructose*), jejum intermitente (JI); , \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

Nota: Média  $\pm$  DP (n=5).

Fonte: A autora, 2020.

A variação percentual da expressão gênica no hipotálamo devido ao JI foi mais pronunciada para *Tnfa*, *Il1 $\beta$* , *Il6* e *Npy*, o tipo de dieta foi mais pronunciada para *Leptina* e *Pomc*, enquanto a interação entre dieta e JI foi mais pronunciada para *Socs3* e *Obrb* (Tabela 2).

Tabela 2 - ANOVA de dois fatores: Dieta vs. Jejum Intermitente

Dados	% de variação e teste de significância					
	Dieta		Jejum Intermitente		Interação	
	%	<i>P</i>	%	<i>P</i>	%	<i>P</i>
<b>Massa corporal e Bioquímica plasmática</b>						
Massa corporal (semana 12)	4,27	ns	60,59	<0,001	5,96	ns
Colesterol Total	38,35	<0,001	24,29	<0,001	18,54	0,001
Triacilglicerol	48,17	<0,001	19,17	<0,001	13,98	0,003
Glicemia	69,21	<0,001	10,69	<0,001	11,85	<0,001
Insulina	42,31	<0,001	23,32	<0,001	21,12	<0,001
FiRi	53,73	<0,001	20,81	<0,001	20,79	<0,001
Leptina	67,74	<0,001	12,11	0,001	8,07	0,005
Adiponectina	77,61	<0,001	4,95	0,02	6,70	0,006
<b>Genes</b>						
<i>Il-6</i>	7,96	0,03	38,97	<0,001	30,15	<0,001
<i>Il-1beta</i>	0,87	ns	50,26	<0,001	20,34	0,004
<i>Tnf-alfa</i>	2,08	ns	30,05	0,01	9,54	ns
<i>Leptina</i>	50,12	<0,001	26,06	<0,001	10,78	0,002
<i>Obrb</i>	0,02	ns	0,63	ns	76,99	<0,001
<i>Socs3</i>	29,18	<0,001	10,27	0,006	43,91	<0,001
<i>Npy</i>	28,58	<0,001	37,54	<0,001	30,22	<0,001
<i>Pomc</i>	56,52	<0,001	6,66	0,02	19,74	<0,001

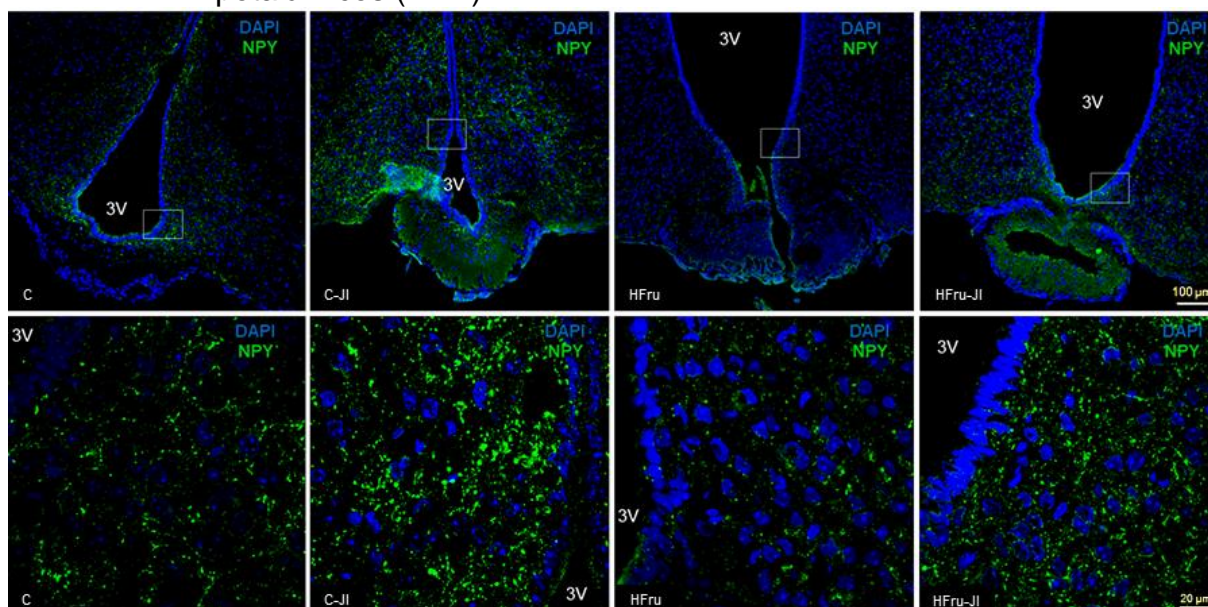
Legenda: Índice de resistência à insulina em jejum (FiRi), interleucina (*Il*), neuropeptídeo Y (*Npy*), receptor de leptina de cadeia longa (*Obrb*); pró-ópiomelanocortina (*Pomc*), proteína supressora da sinalização de citocina 3 (*Socs3*), fator de necrose tumoral alfa (*Tnf-alfa*).

Fonte: A autora, 2020.

#### 4.4 Imunofluorescência para NPY e POMC no hipotálamo

A imunofluorescência de NPY (orexigênico) e POMC (anorexigênico) no hipotálamo está mostrada nas Figuras 15 e 16. Nas seções, observamos a localização desses neurotransmissores nos núcleos arqueado e paraventricular do hipotálamo. A intensa marcação verde ao redor do terceiro ventrículo indicou a presença de NPY, sendo mais acentuada nos animais submetidos ao jejum intermitente (Figura 15). Para POMC, uma marcação verde menos intensa foi detectada, principalmente nos grupos HFru e HFru-JI (Figura 16).

Figura 15 - Microscopia Confocal a Laser. Imunofluorescência de cortes coronais hipotalâmicos (NPY)

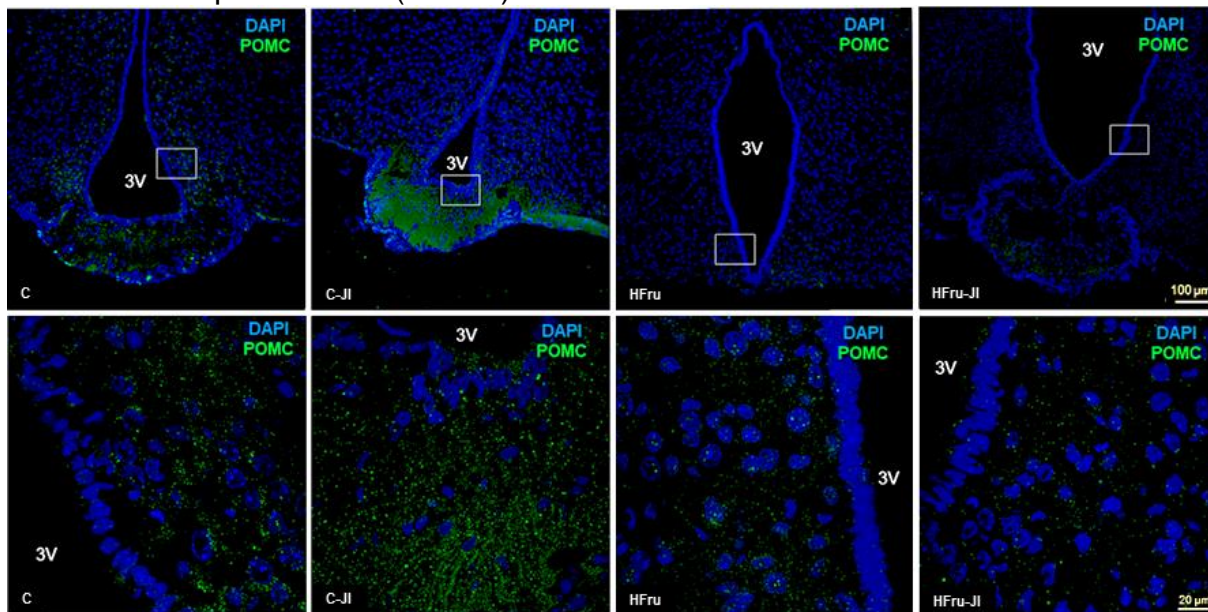


Legenda: Terceiro ventrículo (3V), neuropeptídeo Y (NPY). Grupos: Controle (C), rico em frutose (HFru, *high fructose*), jejum intermitente (JI).

Nota: A área delimitada na linha superior das imagens é mostrada com a ampliação mais significativa na linha inferior das imagens. Nas fotomicrografias temos NPY em verde (Alexa 488) e DAPI em azul.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 16 - Microscopia Confocal a Laser. Imunofluorescência de cortes coronais hipotalâmicos (POMC)



Legenda: Terceiro ventrículo (3V), neuropeptídeo Y (NPY). Grupos: Controle (C), rico em frutose (HFru, *high fructose*), jejum intermitente (JI).

Nota: A área delimitada na linha superior das imagens é mostrada com a ampliação mais significativa na linha inferior das imagens. Nas fotomicrografias temos POMC em verde (Alexa 488) e DAPI em azul.

Fonte: A autora, 2020.

## 5 DISCUSSÃO

O estudo investigou os efeitos do JI em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta rica em frutose. Os nossos resultados mostraram que o consumo crônico da dieta rica em frutose foi capaz de alterar todos os parâmetros bioquímicos estudados, levando ao aumento da insulina plasmática e FiRi (provavelmente devido ao desenvolvimento de resistência à insulina), hiperleptinemia, e alteração no perfil lipídico, além de redução nos valores de adiponectina. Sabe-se que o consumo crônico e em grande quantidade de frutose é capaz de induzir resistência à insulina, aumentar os níveis de ácidos graxos livres, triacilglicerol, colesterol, causar hiperleptinemia e aumentar a glicemia<sup>(5, 6, 136-140)</sup>. O elevado consumo de frutose leva a estimulação da lipogênese *de novo* e um aumento substancial no triacilglicerol plasmático<sup>(20, 21)</sup>.

Os animais do grupo HFru, quando comparados aos animais do grupo C, não apresentaram alterações na massa corporal, nem na ingestão alimentar e energética (nos dias alimentados), portanto as alterações apresentadas por esses animais foram independentes do ganho de massa corporal. A ingestão calórica total dos animais foi medida ao longo do experimento. Ao final das quatro semanas usando o protocolo de JI, os grupos C-JI e HFru-JI apresentaram menor ingestão calórica cumulativa em relação aos grupos C e HFru, respectivamente (dados não mostrados). É importante ressaltar que os grupos C e HFru consumiram quantidades de calorias similares durante todo o experimento. Quando a frutose é adicionada na ração em grande quantidade<sup>(22)</sup> ou na água de beber no caso de trabalhos com roedores<sup>(141)</sup>, pode ocorrer aumento de peso corporal pelo simples fato de se aumentar o consumo energético. No entanto, no nosso caso, os animais do grupo HFru não ganharam peso porque este grupo recebeu uma dieta isoenergética em comparação com a dieta controle. A base para o cálculo da dieta rica em frutose foi a AIN-93M<sup>(128)</sup>, em que alteramos apenas o tipo de carboidrato. Na dieta rica em frutose (HFru) adicionamos 474,3g de frutose e removemos, concomitantemente, esta mesma quantidade de amido de milho e, assim, mantivemos o valor energético exatamente igual nas duas dietas experimentais, só variando o tipo de carboidrato entre elas. A composição desta dieta rica em frutose já foi amplamente usada no nosso laboratório e em todos os



casos, obtivemos sucesso na indução da síndrome metabólica nos camundongos<sup>(17, 19, 137, 138, 142)</sup>.

Nos animais do grupo HFru que fizeram JI, houve melhora significativa dos parâmetros bioquímicos estudados, assim como houve perda de peso nos dois grupos tratados com JI (C-JI e HFru-JI). Sabe-se que o JI leva a perda de peso<sup>(13, 16, 114, 143)</sup>, redução nos níveis plasmáticos de insulina, redução nos níveis de glicemia<sup>(13, 114)</sup>, o que leva a uma maior sensibilidade à insulina<sup>(15, 16)</sup>, diminuição dos níveis plasmáticos de triacilglicerol pelo aumento da lipólise<sup>(143)</sup>, e colesterol total<sup>(15)</sup>, redução dos níveis plasmáticos de leptina<sup>(16, 144)</sup> e aumento da concentração plasmática de adiponectina<sup>(16)</sup>, melhorando a saúde metabólica<sup>(13)</sup>, corroborando nossos achados. Em estudos recentes do nosso grupo, estudamos os efeitos do JI em dois grupos experimentais: animais que receberam dieta hiperlipídica e animais que receberam dieta rica em frutose. Nos animais que fizeram JI houve diminuição da massa corporal, melhora da dislipidemia e da resistência à insulina, aumento dos níveis plasmáticos de adiponectina e diminuição dos níveis plasmáticos de leptina, houve ainda diminuição de parâmetros envolvidos na lipogênese e aumento da beta-oxidação, diminuindo a esteatose e a inflamação no fígado<sup>(17, 19)</sup>.

Porém, talvez o ponto mais importante seja discutir as razões do emagrecimento e da melhora de parâmetros bioquímicos com o JI, será basicamente pela redução do número de calorias, como em qualquer outra dieta<sup>(13)</sup> ou apenas pelo jejum *per se*? Estudos em animais e humanos mostraram que muitos dos benefícios à saúde do JI não são causados pela simples perda de peso. O JI provoca respostas celulares adaptativas integradas nos órgãos de uma maneira que melhora a regulação da glicose, aumenta a resistência ao estresse e diminui a inflamação. Durante o jejum, as células ativam vias que aprimoram as defesas intrínsecas contra o estresse oxidativo e metabólico e removem ou reparam moléculas danificadas<sup>(145, 146)</sup>. Já durante o período de alimentação, as células nos tecidos se envolvem em processos específicos de crescimento e plasticidade e as vias de defesa contra o estresse oxidativo e metabólico ficam em segundo plano<sup>(147)</sup>.

A leptina pode agir apenas como um marcador de massa gordurosa em vez de um supressor do apetite, um exemplo disso seria que o consumo de açúcar pode levar a hiperleptinemia sem reduzir a ingestão calórica total, indicando que o apetite não foi diminuído<sup>(21)</sup>. A hiperleptinemia pode causar resistência à leptina pela regulação negativa do OBRb e/ou por indução de SOCS3<sup>(148)</sup>. Como esperado, os nossos

resultados mostraram que a frutose levou a um aumento da *Leptina* hipotalâmica; entretanto, o JI também aumentou sua expressão, mostrando que o jejum não foi capaz de minimizar os efeitos deletérios da frutose. Por outro lado, a expressão gênica do *Npy* no hipotálamo mostrou-se elevada no grupo HFru-JI, mas esse aumento significativo da expressão gênica do *Npy* não foi capaz de aumentar o consumo alimentar nos animais deste grupo. Talvez se estendêssemos o experimento por mais tempo, pudéssemos observar alguma alteração no comportamento alimentar dos animais do grupo HFru-JI. Existe relato de aumento na expressão de *Npy* no hipotálamo após JI. Sabe-se que a privação aguda de alimentos aumenta a expressão hipotalâmica de *Npy*, um efeito que pode ser acentuado pela natureza repetitiva de um protocolo de JI<sup>(149)</sup>. Ozawa et al.<sup>(150)</sup> demonstraram que há um atraso da resposta alimentar durante um repetido processo de glicoprivação, enquanto há um aumento dos neurônios *Npy* no núcleo arqueado, sugerindo que o atraso na alimentação pode ter ocorrido por uma resposta tardia ao *Npy*<sup>(150)</sup>. Vale a pena ressaltar que a expressão gênica do *Pomc* no hipotálamo foi menos expressa no grupo HFru em comparação ao grupo controle, e esse resultado está de acordo com trabalhos anteriores que observaram diminuição da expressão gênica do *Pomc* em animais que ingeriram dieta rica em frutose<sup>(21, 148)</sup>. A expressão gênica do *Npy* parece ser mais sensível a alterações hormonais e metabólicas durante o JI do que a expressão gênica do *Pomc*<sup>(144)</sup>. Assim, o jejum parece exercer respostas diferenciadas nos neurotransmissores responsáveis pelo balanço energético no hipotálamo.

Foi mostrado que o centro regulador fisiológico no hipotálamo pode ser desregulado pelo consumo de uma dieta rica em frutose, que causa resistência à leptina caracterizado pelo aumento do SOCS3 no hipotálamo e/ou inibição do OBRb. Os animais do grupo HFru, C-JI e HFru-JI apresentaram aumento da leptina hipotalâmica, levando a uma provável resistência à leptina no hipotálamo. O hipotálamo é muito vulnerável aos danos oxidativos devido ao baixo conteúdo antioxidante que possui, portanto qualquer estresse pode causar danos importantes nesta região do encéfalo. O estresse no hipotálamo pode estar implicado no desenvolvimento da resistência à insulina e da leptina. E, nesse contexto, a dieta rica em frutose pode ser considerada um fator de estresse por perturbar a expressão de enzimas antioxidantes<sup>(148)</sup>. Em um trabalho recente, Kovacevic et al.<sup>(148)</sup> mostraram aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias como *Il1beta*, *Il6* e *Tnfalfa* no hipotálamo de ratos que consumiram dieta rica em frutose e que foram expostas à

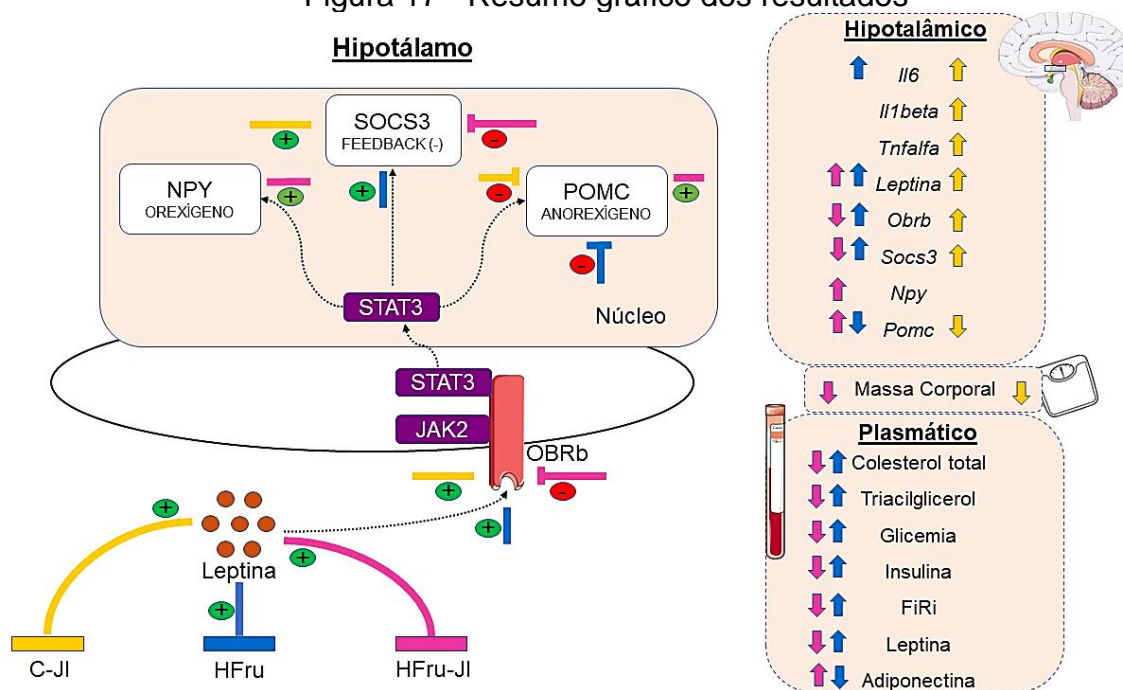
diferentes tipos de estresses, mostrando que a dieta rica em frutose potencializou os efeitos do estresse crônico<sup>(148)</sup>. Dentro desta perspectiva, analisamos a expressão de citocinas pró-inflamatórias *Tnfalfa*, *Il6* e *Il1beta* no hipotálamo. Muito surpreendentemente foi que observamos que houve um processo inflamatório acentuado nesta região nos animais do grupo C-JI. Sabe-se hoje, que o processo inflamatório hipotalâmico antecede os sinais inflamatórios periféricos, independente do ganho de peso<sup>(151)</sup> e esta inflamação no hipotálamo nos animais do grupo C-JI pode, com o tempo, acarretar a desregulação do balanço energético corporal e na ingestão de alimentos. Estes resultados podem ser um sinal de alerta de que o JI pode ter consequências ruins para organismo. Entretanto, o JI apresentou alguns efeitos benéficos para os animais do grupo HFru-JI a nível sistêmico, uma vez que houve melhora da resistência à insulina, leptina e retorno para níveis normais dos lipídios sanguíneos e da glicemia e melhora dos níveis de adiponectina.

Modelos animais mostram que o JI melhora a saúde ao longo da vida, enquanto os estudos clínicos envolvem principalmente intervenções de curto prazo, durante um período de meses. Resta saber se as pessoas podem manter o JI por anos e potencialmente acumular os benefícios observados em modelos animais. Mais estudos são necessários para conhecer todos os efeitos do JI no organismo.

## CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados atuais demonstram os efeitos do JI como mostrado no resumo gráfico (Figura 17), resultando em diminuição da massa corporal ao longo do estudo e beneficiando o metabolismo lipídico, glicêmico e a sensibilidade à insulina, a adiponectina e a leptina plasmática. No entanto, existe um aumento da expressão de marcadores inflamatórios no hipotálamo dos camundongos que fizeram JI, que progressivamente pode acarretar o desequilíbrio do balanço energético corporal e da ingestão alimentar. Além disso, o JI levou a um aumento da leptina hipotalâmica com provável resistência à leptina. Portanto, ainda não podemos dizer, com segurança, que o JI pode ser usado como um tratamento não farmacológico para doenças metabólicas.

Figura 17 - Resumo gráfico dos resultados



Fonte: A autora, 2020.

## REFERÊNCIAS

1. Johnson RJ, Perez-Pozo SE, Sautin YY, Manitius J, Sanchez-Lozada LG, Feig DI, et al. Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocr Rev.* 2009;30(1):96-116.
2. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(4):537-43.
3. Charrez B, Qiao L, Hebbard L. The role of fructose in metabolism and cancer. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2015;22(2):79-89.
4. Jang C, Hui S, Lu W, Cowan AJ, Morscher RJ, Lee G, et al. The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. *Cell Metab.* 2018;27(2):351-61 e3.
5. Schultz A, Barbosa-da-Silva S, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Differences and similarities in hepatic lipogenesis, gluconeogenesis and oxidative imbalance in mice fed diets rich in fructose or sucrose. *Food & function.* 2015;6(5):1684-91.
6. Schultz A, Neil D, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Hepatic adverse effects of fructose consumption independent of overweight/obesity. *Int J Mol Sci.* 2013;14(11):21873-86.
7. Ladyman SR, Augustine RA, Grattan DR. Hormone interactions regulating energy balance during pregnancy. *J Neuroendocrinol.* 2010;22(7):805-17.
8. Petta S, Marchesini G, Caracausi L, Macaluso FS, Camma C, Ciminnisi S, et al. Industrial, not fruit fructose intake is associated with the severity of liver fibrosis in genotype 1 chronic hepatitis C patients. *J Hepatol.* 2013;59(6):1169-76.
9. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature.* 2000;404(6778):661-71.
10. Fasshauer M, Bluher M. Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36(7):461-70.
11. Redman LM, Smith SR, Burton JH, Martin CK, Il'yasova D, Ravussin E. Metabolic Slowing and Reduced Oxidative Damage with Sustained Caloric Restriction Support the Rate of Living and Oxidative Damage Theories of Aging. *Cell Metab.* 2018;27(4):805-15 e4.

12. Chausse B, Solon C, Caldeira da Silva CC, Masselli Dos Reis IG, Manchado-Gobatto FB, Gobatto CA, et al. Intermittent fasting induces hypothalamic modifications resulting in low feeding efficiency, low body mass and overeating. *Endocrinology*. 2014;155(7):2456-66.
13. Patterson RE, Sears DD. Metabolic Effects of Intermittent Fasting. *Annu Rev Nutr*. 2017;37:371-93.
14. Varady KA, Bhutani S, Church EC, Klempel MC. Short-term modified alternate-day fasting: a novel dietary strategy for weight loss and cardioprotection in obese adults. *Am J Clin Nutr*. 2009;90(5):1138-43.
15. Varady KA, Hellerstein MK. Alternate-day fasting and chronic disease prevention: a review of human and animal trials. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(1):7-13.
16. Mattson MP, Longo VD, Harvie M. Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Res Rev*. 2017;39:46-58.
17. Marinho TS, Ornellas F, Barbosa-da-Silva S, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Beneficial effects of intermittent fasting on steatosis and inflammation of the liver in mice fed a high-fat or a high-fructose diet. *Nutrition*. 2019;65:103-12.
18. Marinho TS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Pancreatic Islet Stereology: Estimation of Beta Cells Mass. *Int J Morphol*. 2019;37(4):1331-4.
19. Marinho TS, Borges CC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Intermittent fasting benefits on alpha- and beta-cell arrangement in diet-induced obese mice pancreatic islet. *J Diabetes its Complicant*. 2020 Mar; 34(3):107497.
20. Ferder L, Ferder MD, Inserra F. The role of high-fructose corn syrup in metabolic syndrome and hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2010;12(2):105-12.
21. 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.
22. Rippe JM, Sievenpiper JL, Le KA, White JS, Clemens R, Angelopoulos TJ. What is the appropriate upper limit for added sugars consumption? *Nutr Rev*. 2017;75(1):18-36.
23. Vos MB, Lavine JE. Dietary fructose in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2013;57(6):2525-31.
24. Jiao G, Zhang G, Wang H, Zhao W, Cui Y, Liu Y, et al. Glucose Intake Alters Expression of Neuropeptides Derived from Proopiomelanocortin in the Lateral Hypothalamus and the Nucleus Accumbens in Fructose Preference Rats. *Neural Plast*. 2017;2017:6589424.

25. Dornas WC, de Lima WG, Pedrosa ML, Silva ME. Health implications of high-fructose intake and current research. *Adv Nutr.* 2015;6(6):729-37.
26. Orlandi L, Fonseca WF, Enes-Marques S, Paffaro VA, Jr., Vilela FC, Giusti-Paiva A. Sickness behavior is accentuated in rats with metabolic disorders induced by a fructose diet. *J Neuroimmunol.* 2015;289:75-83.
27. Rumessen JJ. Fructose and related food carbohydrates. Sources, intake, absorption, and clinical implications. *Scand J Gastroenterol.* 1992;27(10):819-28.
28. Sundborn G, Thornley S, Merriman TR, Lang B, King C, Lanaspá MA, et al. Are Liquid Sugars Different from Solid Sugar in Their Ability to Cause Metabolic Syndrome? *Obesity (Silver Spring).* 2019;27(6):879-87.
29. Zhao FQ, Keating AF. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr Genomics.* 2007;8(2):113-28.
30. Hannou SA, Haslam DE, McKeown NM, Herman MA. Fructose metabolism and metabolic disease. *J Clin Invest.* 2018;128(2):545-55.
31. Helliwell PA, Richardson M, Affleck J, Kellett GL. Stimulation of fructose transport across the intestinal brush-border membrane by PMA is mediated by GLUT2 and dynamically regulated by protein kinase C. *Biochem J.* 2000;350 Pt 1:149-54.
32. Douard V, Ferraris RP. The role of fructose transporters in diseases linked to excessive fructose intake. *J Physiol.* 2013;591(Pt 2):401-14.
33. Havel PJ. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev.* 2005;63(5):133-57.
34. Cheeseman CI. GLUT2 is the transporter for fructose across the rat intestinal basolateral membrane. *Gastroenterology.* 1993;105(4):1050-6.
35. Diggle CP, Shires M, Leitch D, Brooke D, Carr IM, Markham AF, et al. Kethexokinase: expression and localization of the principal fructose-metabolizing enzyme. *J Histochem Cytochem.* 2009;57(8):763-74.
36. Mayes PA. Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr.* 1993;58(5 Suppl):754S-65S.
37. Zhang DM, Jiao RQ, Kong LD. High Dietary Fructose: Direct or Indirect Dangerous Factors Disturbing Tissue and Organ Functions. *Nutrients.* 2017;9(4). DOI 10.3390/nu9040335.
38. Bergheim I, Weber S, Vos M, Kramer S, Volynets V, Kaserouni S, et al. Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. *J Hepatol.* 2008;48(6):983-92.

39. Ahima RS, Antwi DA. Brain regulation of appetite and satiety. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008;37(4):811-23.
40. Loh K, Herzog H, Shi YC. Regulation of energy homeostasis by the NPY system. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26(3):125-35.
41. Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. *J Endocrinol.* 2005;184(2):291-318.
42. Badman MK, Flier JS. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science.* 2005;307(5717):1909-14.
43. Joly-Amado A, Cansell C, Denis RG, Delbes AS, Castel J, Martinez S, et al. The hypothalamic arcuate nucleus and the control of peripheral substrates. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2014;28(5):725-37.
44. Klockars A, Levine AS, Olszewski PK. Hypothalamic Integration of the Endocrine Signaling Related to Food Intake. *Curr Top Behav Neurosci.* 2018.
45. Velloso LA. The brain is the conductor: diet-induced inflammation overlapping physiological control of body mass and metabolism. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009;53(2):151-8.
46. Munzberg H, Bjornholm M, Bates SH, Myers MG, Jr. Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(6):642-52.
47. Rui L. Brain regulation of energy balance and body weight. *Rev Endocr Metab Disord.* 2013;14(4):387-407.
48. Paxinos G, Franklin KBJ. *The mouse brain in stereotaxic coordinates.* 4th ed. San Diego: Academic Press; 2013.
49. Cui H, Lopez M, Rahmouni K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(6):338-51.
50. Bulcao C, Ferreira SR, Giuffrida FM, Ribeiro-Filho FF. The new adipose tissue and adipocytokines. *Curr Diabetes Rev.* 2006;2(1):19-28.
51. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw.* 2006;17(1):4-12.
52. Hida K, Wada J, Eguchi J, Zhang H, Baba M, Seida A, et al. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(30):10610-5.
53. Kloting N, Berndt J, Kralisch S, Kovacs P, Fasshauer M, Schon MR, et al. Vaspin gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;339(1):430-6.



54. de Souza Batista CM, Yang RZ, Lee MJ, Glynn NM, Yu DZ, Pray J, et al. Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. *Diabetes*. 2007;56(6):1655-61.
55. Yang RZ, Lee MJ, Hu H, Pray J, Wu HB, Hansen BC, et al. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290(6):E1253-61.
56. Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab*. 2008;34(1):2-11.
57. Sarmiento-Cabral A, Peinado JR, Halliday LC, Malagon MM, Castano JP, Kineman RD, et al. Adipokines (Leptin, Adiponectin, Resistin) Differentially Regulate All Hormonal Cell Types in Primary Anterior Pituitary Cell Cultures from Two Primate Species. *Sci Rep*. 2017;7:43537.
58. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425-32.
59. Friedman JM. The alphabet of weight control. *Nature*. 1997;385(6612):119-20.
60. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998;395(6704):763-70.
61. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:413-37.
62. Giralt M, Cereijo R, Villarroya F. Adipokines and the Endocrine Role of Adipose Tissues. *Handb Exp Pharmacol*. 2016;233:265-82.
63. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11(8):327-32.
64. Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol*. 1998;395(4):535-47.
65. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995;83(7):1263-71.
66. Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem*. 1997;272(10):6093-6.
67. Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:293-322.
68. Morton GJ, Gelling RW, Niswender KD, Morrison CD, Rhodes CJ, Schwartz MW. Leptin regulates insulin sensitivity via phosphatidylinositol-3-OH kinase signaling in mediobasal hypothalamic neurons. *Cell Metab*. 2005;2(6):411-20.

69. Elmquist JK, Coppari R, Balthasar N, Ichinose M, Lowell BB. Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. *J Comp Neurol*. 2005;493(1):63-71.
70. Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J*. 1998;12(1):57-65.
71. van Dielen FM, van't Veer C, Schols AM, Soeters PB, Buurman WA, Greve JW. Increased leptin concentrations correlate with increased concentrations of inflammatory markers in morbidly obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001;25(12):1759-66.
72. Simons PJ, van den Pangaart PS, van Roomen CP, Aerts JM, Boon L. Cytokine-mediated modulation of leptin and adiponectin secretion during in vitro adipogenesis: evidence that tumor necrosis factor-alpha- and interleukin-1beta-treated human preadipocytes are potent leptin producers. *Cytokine*. 2005;32(2):94-103.
73. Cooke JP, Oka RK. Does leptin cause vascular disease? *Circulation*. 2002;106(15):1904-5.
74. Konstantinides S, Schafer K, Koschnick S, Loskutoff DJ. Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity. *J Clin Invest*. 2001;108(10):1533-40.
75. O'Rourke L, Gronning LM, Yeaman SJ, Shepherd PR. Glucose-dependent regulation of cholesterol ester metabolism in macrophages by insulin and leptin. *J Biol Chem*. 2002;277(45):42557-62.
76. Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, et al. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J*. 1999;18(5):1309-20.
77. Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, et al. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*. 1997;387(6636):924-9.
78. Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell*. 1998;1(4):619-25.
79. Krebs DL, Hilton DJ. A new role for SOCS in insulin action. Suppressor of cytokine signaling. *Sci STKE*. 2003;2003(169):PE6.
80. Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG, Jr. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem*. 2000;275(19):14563-72.
81. Howard JK, Flier JS. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol Metab*. 2006;17(9):365-71.

82. Holemans K, Caluwaerts S, Poston L, Van Assche FA. Diet-induced obesity in the rat: a model for gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;190(3):858-65.
83. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414(6865):799-806.
84. Xu AW, Kaelin CB, Takeda K, Akira S, Schwartz MW, Barsh GS. PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J Clin Invest*. 2005;115(4):951-8.
85. Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*. 2004;116(2):337-50.
86. Farooqi IS, O'Rahilly S. 20 years of leptin: human disorders of leptin action. *J Endocrinol*. 2014;223(1):T63-70.
87. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 1995;270(45):26746-9.
88. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem*. 1996;271(18):10697-703.
89. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;221(2):286-9.
90. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem (Tokyo)*. 1996;120(4):803-12.
91. Turer AT, Scherer PE. Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia*. 2012;55(9):2319-26.
92. Seo JB, Moon HM, Noh MJ, Lee YS, Jeong HW, Yoo EJ, et al. Adipocyte determination- and differentiation-dependent factor 1/sterol regulatory element-binding protein 1c regulates mouse adiponectin expression. *J Biol Chem*. 2004;279(21):22108-17.
93. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003;423(6941):762-9.
94. Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao TS, Lodish HF. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(28):10308-13.

95. Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, et al. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med*. 2007;13(3):332-9.
96. Brochu-Gaudreau K, Rehfeldt C, Blouin R, Bordignon V, Murphy BD, Palin MF. Adiponectin action from head to toe. *Endocrine*. 2010;37(1):11-32.
97. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;257(1):79-83.
98. Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, et al. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem*. 2004;279(29):30817-22.
99. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. 2002;8(11):1288-95.
100. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med*. 2001;7(8):941-6.
101. Winzell MS, Nogueiras R, Dieguez C, Ahren B. Dual action of adiponectin on insulin secretion in insulin-resistant mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;321(1):154-60.
102. Holland WL, Miller RA, Wang ZV, Sun K, Barth BM, Bui HH, et al. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nat Med*. 2011;17(1):55-63.
103. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest*. 2003;112(1):91-100.
104. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, et al. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation*. 2000;102(11):1296-301.
105. Ouchi N, Walsh K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clin Chim Acta*. 2007;380(1-2):24-30.
106. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood*. 2000;96(5):1723-32.

107. Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, Higuchi A, Vita JA, Gokce N, et al. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J Biol Chem*. 2010;285(9):6153-60.
108. Salmenniemi U, Ruotsalainen E, Pihlajamaki J, Vauhkonen I, Kainulainen S, Punnonen K, et al. Multiple abnormalities in glucose and energy metabolism and coordinated changes in levels of adiponectin, cytokines, and adhesion molecules in subjects with metabolic syndrome. *Circulation*. 2004;110(25):3842-8.
109. Salmenniemi U, Zacharova J, Ruotsalainen E, Vauhkonen I, Pihlajamaki J, Kainulainen S, et al. Association of adiponectin level and variants in the adiponectin gene with glucose metabolism, energy expenditure, and cytokines in offspring of type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(7):4216-23.
110. Ahima RS, Qi Y, Singhal NS, Jackson MB, Scherer PE. Brain adipocytokine action and metabolic regulation. *Diabetes*. 2006;55 Suppl 2:S145-54.
111. Coope A, Milanski M, Araujo EP, Tambascia M, Saad MJ, Geloneze B, et al. AdipoR1 mediates the anorexigenic and insulin/leptin-like actions of adiponectin in the hypothalamus. *FEBS Lett*. 2008;582(10):1471-6.
112. Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, et al. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med*. 2004;10(5):524-9.
113. Trepanowski JF, Kroeger CM, Barnosky A, Klempel MC, Bhutani S, Hoddy KK, et al. Effect of Alternate-Day Fasting on Weight Loss, Weight Maintenance, and Cardioprotection Among Metabolically Healthy Obese Adults: A Randomized Clinical Trial. *JAMA internal medicine*. 2017;177(7):930-8.
114. Anson RM, Guo Z, de Cabo R, Iyun T, Rios M, Hagepanos A, et al. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(10):6216-20.
115. Tatulli G, Mitro N, Cannata SM, Audano M, Caruso D, D'Arcangelo G, et al. Intermittent Fasting Applied in Combination with Rotenone Treatment Exacerbates Dopamine Neurons Degeneration in Mice. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:4.
116. Dorighello GG, Rovani JC, Luhman CJ, Paim BA, Raposo HF, Vercesi AE, et al. Food restriction by intermittent fasting induces diabetes and obesity and aggravates spontaneous atherosclerosis development in hypercholesterolaemic mice. *Br J Nutr*. 2014;111(6):979-86.

117. Rosas Fernandez MA, Concha Vilca CM, Batista LO, Ramos VW, Cinelli LP, Tibau de Albuquerque K. Intermittent food restriction in female rats induces SREBP high expression in hypothalamus and immediately postfasting hyperphagia. *Nutrition*. 2018;48:122-6.
118. Corley BT, Carroll RW, Hall RM, Weatherall M, Parry-Strong A, Krebs JD. Intermittent fasting in Type 2 diabetes mellitus and the risk of hypoglycaemia: a randomized controlled trial. *Diabet Med*. 2018;35(5):588-94.
119. Akgul S, Derman O, Kanbur NO. Fasting during Ramadan: a religious factor as a possible trigger or exacerbator for eating disorders in adolescents. *Int J Eat Disord*. 2014;47(8):905-10.
120. Stote KS, Baer DJ, Spears K, Paul DR, Harris GK, Rumpler WV, et al. A controlled trial of reduced meal frequency without caloric restriction in healthy, normal-weight, middle-aged adults. *Am J Clin Nutr*. 2007;85(4):981-8.
121. al-Hadramy MS, Zawawi TH, Abdelwahab SM. Altered cortisol levels in relation to Ramadan. *Eur J Clin Nutr*. 1988;42(4):359-62.
122. Bogdan A, Bouchareb B, Touitou Y. Ramadan fasting alters endocrine and neuroendocrine circadian patterns. Meal-time as a synchronizer in humans? *Life Sci*. 2001;68(14):1607-15.
123. Chaouachi A, Coutts AJ, Chamari K, Wong del P, Chaouachi M, Chtara M, et al. Effect of Ramadan intermittent fasting on aerobic and anaerobic performance and perception of fatigue in male elite judo athletes. *J Strength Cond Res*. 2009;23(9):2702-9.
124. Kumar S, Kaur G. Intermittent fasting dietary restriction regimen negatively influences reproduction in young rats: a study of hypothalamo-hypophysial-gonadal axis. *PLoS One*. 2013;8(1):e52416.
125. Heilbronn LK, Civitarese AE, Bogacka I, Smith SR, Hulver M, Ravussin E. Glucose tolerance and skeletal muscle gene expression in response to alternate day fasting. *Obes Res*. 2005;13(3):574-81.
126. Reiches MW, Moore SE, Prentice AM, Ellison PT. Endocrine responses, weight change, and energy sparing mechanisms during Ramadan among Gambian adolescent women. *Am J Hum Biol*. 2014;26(3):395-400.
127. Munsters MJ, Saris WH. Effects of meal frequency on metabolic profiles and substrate partitioning in lean healthy males. *PLoS One*. 2012;7(6):e38632.
128. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123(11):1939-51.

129. Ornellas F, Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Combined parental obesity augments single-parent obesity effects on hypothalamus inflammation, leptin signaling (JAK/STAT), hyperphagia, and obesity in the adult mice offspring. *Physiol Behav.* 2016;153:47-55.
130. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath.* 2013;3(3):71-85.
131. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(15):e115.
132. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics.* 2007;23(10):1289-91.
133. Davisson MT. Rules and guidelines for nomenclature of mouse genes. International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. *Gene.* 1994;147(2):157-60.
134. Duncan MH, Singh BM, Wise PH, Carter G, Alaghband-Zadeh J. A simple measure of insulin resistance. *Lancet.* 1995;346(8967):120-1.
135. Dunnett CW. Pairwise multiple comparisons in the unequal variance case. *J Amer Statist Ass.* 1980;75:796-800.
136. Addison D, Aguilar D. Diabetes and cardiovascular disease: the potential benefit of incretin-based therapies. *Curr Atheroscler Rep.* 2011;13(2):115-22.
137. Guimaraes J, Bargut TCL, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Medium-chain triglyceride reinforce the hepatic damage caused by fructose intake in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2019;140:64-71.
138. Magliano DC, Penna-de-Carvalho A, Vazquez-Carrera M, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Short-term administration of GW501516 improves inflammatory state in white adipose tissue and liver damage in high-fructose-fed mice through modulation of the renin-angiotensin system. *Endocrine.* 2015;50(2):355-67.
139. Motta VF, Bargut TL, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Treating fructose-induced metabolic changes in mice with high-intensity interval training: insights in the liver, white adipose tissue and skeletal muscle. *Journal of applied physiology.* 2017;123:699-709.
140. Oliveira LS, Santos DA, Barbosa-da-Silva S, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. The inflammatory profile and liver damage of a sucrose-rich diet in mice. *J Nutr Biochem.* 2014;25(2):193-200.
141. Roglans N, Vila L, Farre M, Alegret M, Sanchez RM, Vazquez-Carrera M, et al. Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPARalpha activity in fructose-fed rats. *Hepatology.* 2007;45(3):778-88.

142. Nascimento FA, Barbosa-da-Silva S, Santos CF, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Adipose tissue, liver and pancreas structural alterations in C57BL/6 mice fed high-fat-high-sucrose diet supplemented with fish oil (n-3 fatty acid rich oil). *Exp Toxicol Pathol.* 2010;62(1):17-25.
143. Varady KA, Roohk DJ, Loe YC, McEvoy-Hein BK, Hellerstein MK. Effects of modified alternate-day fasting regimens on adipocyte size, triglyceride metabolism, and plasma adiponectin levels in mice. *J Lipid Res.* 2007;48(10):2212-9.
144. Palou M, Sanchez J, Rodriguez AM, Priego T, Pico C, Palou A. Induction of NPY/AgRP orexigenic peptide expression in rat hypothalamus is an early event in fasting: relationship with circulating leptin, insulin and glucose. *Cell Physiol Biochem.* 2009;23(1-3):115-24.
145. Di Francesco A, Di Germanio C, Bernier M, de Cabo R. A time to fast. *Science.* 2018;362(6416):770-5.
146. Longo VD, Mattson MP. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metab.* 2014;19(2):181-92.
147. Mattson MP. An Evolutionary Perspective on Why Food Overconsumption Impairs Cognition. *Trends Cogn Sci.* 2019;23(3):200-12.
148. Kovacevic S, Nestorov J, Matic G, Elakovic I. Chronic Stress Combined with a Fructose Diet Reduces Hypothalamic Insulin Signaling and Antioxidative Defense in Female Rats. *Neuroendocrinology.* 2019;108(4):278-90.
149. Gotthardt JD, Verpeut JL, Yeomans BL, Yang JA, Yasrebi A, Roepke TA, et al. Intermittent Fasting Promotes Fat Loss With Lean Mass Retention, Increased Hypothalamic Norepinephrine Content, and Increased Neuropeptide Y Gene Expression in Diet-Induced Obese Male Mice. *Endocrinology.* 2016;157(2):679-91.
150. Ozawa Y, Arima H, Watanabe M, Shimizu H, Ito Y, Banno R, et al. Repeated glucoprivation delayed hyperphagic responses while activating neuropeptide Y neurons in rats. *Peptides.* 2011;32(4):763-9.
151. Thaler JP, Yi CX, 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.



## ANEXO A – Comitê de ética



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO  
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)

**ibrag** Instituto  
de Biologia  
Roberto  
Alcantara  
Gomes

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Jejum intermitente, metabolismo e fígado em camundongos C57BL/6 obesos", registrada com o nº 40/2016, sob a responsabilidade de **Márcia B. A. Mandarin de Lacerda** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da UERJ, em reunião de 27/09/2016.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	27/09/2020
Espécie/linhagem/raça	camundongos C57BL/6
Nº de animais	135
Peso/Idade	18 g / 3 meses
Sexo	Macho
Origem	Bioterio setorial

Rio de Janeiro, 27 de Setembro de 2016.

Prof. Dr. Alex C. Manhães  
Coordenador  
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa  
Vice-Coordenadora  
CEUA/IBRAG/UERJ

## ANEXO B – Submissão de artigo

Received revision JNB\_2019\_969\_R1

Caixa de entrada x



**The Journal of Nutritional Biochemistry** <EvisSupp... qui., 9 de jan. 17:27 (há 13 dias)   

para mandarim ▾

*This message was sent automatically.*

Ref: JNB\_2019\_969\_R1

Title: Intermittent fasting, adipokines, insulin sensitivity, and hypothalamic neuropeptides in a dietary overload with high-fat or high-fructose diet in mice

Journal: The Journal of Nutritional Biochemistry

Dear Professor. Mandarim-de-Lacerda,

Thank you for submitting your revised manuscript for consideration for publication in The Journal of Nutritional Biochemistry . Your revision was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® [http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL\\_ACR=JNB](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=JNB) and locate the submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

We appreciate your submitting your revision to this journal.

Kind regards,

The Journal of Nutritional Biochemistry

**Have questions or need assistance?**


For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.


-----  
Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

...

[Mensagem cortada] [Exibir toda a mensagem](#)

 Responder

 Encaminhar