

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ERNESTO ANTÔNIO MACONGONDE

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA
DE FRUTOSE SOBRE PARÂMETROS DO METABOLISMO
ENERGÉTICO EM CÉREBRO E TECIDOS PERIFÉRICOS DE
RATOS JOVENS**

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde para obtenção
do título de Doutor em Ciências da
Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia
Fernanda Schuck.

**CRICIÚMA
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M171i Macongode, Ernesto António.

Investigação do efeito da administração aguda de frutose sobre parâmetros do metabolismo energético em cérebro e tecidos periféricos de ratos jovens / Ernesto António Macongode ; orientadora : Patrícia Fernanda Schuck. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2015.

61 p. : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2015.

1. Frutose - Administração. 2. Intolerância a frutose. 3. Erros inatos do metabolismo. 4. Ciclo de Krebs. 5. Metabolismo energético. I. Título.

CDD. 22. ed. 616.042

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pelo candidato **Ernesto Antônio Macongonde** sob o título “**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE FRUTOSE SOBRE PARÂMETROS BIOENERGÉTICOS EM CÉREBRO E TECIDOS PERIFÉRICOS DE RATOS JOVENS**”, para obtenção do grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese, com conceito B.

Criciúma, SC, 02 de outubro de 2015.


Prof.ª Dr.ª SAMIRA DA SILVA VALVASSORI
Membro Relator - UNESC


Prof.ª Dr.ª JOSIANE BUDNI
Membro Interno - UNESC


Prof. Dr. MARCOS ROBERTO DE OLIVEIRA
Membro Externo - UFMT


Prof. Dr. ALEXANDRE AMARAL
Membro Externo - UFRGS


Prof.ª Dr.ª Patricia Fernanda Schuck
Orientadora


Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Aos meus pais, António e Madalena por carinho, amor e perseverança que me deram e me ensinaram.

Aos meus irmãos; Alberto António, Francisco António, Justina António e Sabina Wiliam que me encorajaram a prosseguir o meu desejo de me formar ainda mais. Ao meu acompanhante Magnésio António pelo apoio que me incentivou nos momentos difíceis da minha formação aqui no Brasil.

AGRADECIMENTOS

A CAPES, agência que forneceu a bolsa de estudos de doutorado.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Patrícia Fernanda Schuck, pela ajuda, paciência e carinho, na correção da minha tese.

À UNESC e especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, em especial aos Prof. Dr. Emílio Luiz Streck e Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, que me receberam quando solicitei estudar o curso de pós-graduação.

Aos professores, Prof^a. Dr^a. Tatiana Barichello e Prof. Dr. Gustavo da Costa Ferreira, pelos conhecimentos transmitidos.

À banca, pela disponibilidade em participarem da avaliação deste trabalho, enriquecendo-o com as suas preciosas opiniões e críticas positivas.

À minha amiga Eliene Benta de Campos Ferreira, professora de Psicologia da UNESC, pelo apoio nos momentos difíceis de elaboração e na correção da presente tese.

À Maria Luiza Gomes pelo apoio na revisão e na correção dessa tese.

Aos meus colegas do grupo de Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (LEIM), pela amizade, apoio e ajuda que foi com certeza muito importante nesta minha trajetória, ensinando sempre para ser persistente e por me fazer acreditar que era possível.

Enfim, a todos os que de uma forma direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho de pesquisa.

RESUMO

A intolerância hereditária à frutose (IHF) é uma doença de herança autossômica recessiva caracterizada pelo acúmulo de frutose em tecidos e fluidos biológicos de pacientes. Esta doença resulta da deficiência de enzima aldolase B, enzima presente em fígado, rins e intestino delgado. Os principais sinais e sintomas incluem alterações hepáticas, renais, musculares e cerebrais. No presente trabalho, investigou-se o efeito de administração aguda de frutose sobre parâmetros bioquímicos em córtex cerebral, fígado, rim, músculo esquelético, soro e líquido cefalorraquidiano (LCR) de ratos Wistar machos com 30 dias de idade. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: grupo frutose, cujos animais receberam uma única administração subcutânea de frutose (5 $\mu\text{mol/g}$), e grupo controle, cujos animais receberam uma única administração de solução salina nas mesmas condições. Uma, doze ou vinte e quatro horas após as administrações, os animais foram anestesiados e foi coletado o LCR por punção na cisterna magna. Imediatamente após a punção, os animais sofreram eutanásia por decapitação e o córtex cerebral, o fígado, os rins e amostras de músculo esquelético foram dissecados, limpos e homogeneizados em tampão específico para cada técnica. Também foi coletado sangue periférico para obtenção do soro. Foi observado um aumento da atividade do complexo I-III em fígado de animais do grupo frutose 1 h após a administração deste carboidrato. Adicionalmente, observou-se um aumento da atividade da enzima malato desidrogenase (MDH) em rins dos mesmos animais, bem como uma inibição das atividades dos complexos II e II-III em músculo esquelético em comparação ao grupo controle. Também foram encontrados níveis aumentados de triacilgliceróis em soro dos animais do grupo frutose. Doze horas após a administração do mesmo carboidrato, os níveis de colesterol total em LCR encontraram-se aumentados, enquanto que os níveis de albumina foram diminuídos, sem ocorrer nenhuma alteração dos níveis de glicose. Também houve aumento dos níveis séricos de lactato nos animais que receberam administração de frutose. Vinte e quatro horas após a administração deste monossacarídeo houve um aumento da atividade da enzima MDH em córtex cerebral de animais do grupo frutose em comparação com o grupo controle. Tomados em conjunto, os resultados do presente estudo indicam que administração aguda de frutose induz

alterações do metabolismo energético em diferentes tecidos, o que poderia contribuir para a patogênese da IHF.

Palavras-chave: cadeia respiratória; ciclo de Krebs; frutose; frutosemia; intolerância hereditária à frutose; metabolismo energético.

ABSTRACT

Hereditary fructose intolerance (HFI) is an inherited autosomal recessive disease characterized by fructose accumulation in tissues and biological fluids of patients. The disease arises from a deficiency of aldolase B, an enzyme expressed in liver, kidney and small intestine. The main symptoms include liver, kidney, muscle and brain alterations. In the present work it was investigated the effect of acute fructose administration on biochemical parameters in cerebral cortex, liver, kidney, skeletal muscle, serum and cerebrospinal fluid (CSF) of 30 day-old male Wistar rats. The animals were divided into two experimental groups: fructose group, which received a single subcutaneous injection of fructose (5 $\mu\text{mol/g}$), and control group, which received a single injection of saline solution in the same volume. One, twelve or twenty-four hour after the administration, animals were anesthetized and CSF was collected by puncture of magna cistern. Immediately after the puncture, animals were euthanized by decapitation and cerebral cortex, liver, kidney and skeletal muscle samples were dissected and homogenized in specific buffer for each technique. Peripheral blood was collected to obtain the serum. It was observed an increase of complex I-III activity in liver of animals from fructose group one hour after the administration of this sugar. Additionally, it was observed an increase of malate dehydrogenase (MDH) enzyme activity in kidney of these animals, as well as an inhibition of complex II and II-III in skeletal muscle, as compared to control group. It was also found increased triglyceride levels in serum of animals from fructose group. Twelve hours after the administration of this sugar, total cholesterol levels in CSF were found increased, whilst albumin levels were decreased, without any alteration in glucose levels. Serum lactate levels were also increased in the animals receiving fructose. Twenty-four hour after fructose administration, it was found an increased MDH activity in cerebral cortex from fructose group, as compared to control group. Taken together, the data of the present study indicate that acute fructose administration induces alterations in energy metabolism in different tissues, which may contribute to the pathogenesis of HFI.

Keywords: energy metabolism; fructose; fructosemia; hereditary fructose intolerance; Krebs cycle; respiratory chain complexes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- α -KGDH – Alfa-cetogluturato desidrogenase (do inglês *alpha-ketoglutarate dehydrogenase*)
- ADP- Difosfato de adenosina (do inglês *adenosine diphosphate*)
- ATP- Trifosfato de adenosina (do inglês *adenosine triphosphate*)
- CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais
- CoA- Coenzima A
- CoQ- Coenzima Q
- CTE- Cadeia transportadora de elétrons
- CS- Citrato sintase
- DCIP- 2,6-Dicloroindofenol (do inglês *2,6-dichlorophenol indophenol*)
- DTNB- 5',5''- ditiobis-(2-nitrobenzoato) (do inglês *5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid*)
- DHAP- di-hidroxiacetona-fosfato (do inglês *dihydroxyacetone phosphate*)
- EC- Comissão de enzima (do inglês *enzyme commission*)
- EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês *ethylenediaminetetraacetic acid*)
- EIM- Erros inatos do metabolismo.
- ERO- Espécie reativa de oxigênio
- FAD- Forma oxidada do dinucleotídeo de flavina e adenina (do inglês *flavin adenine dinucleotide, oxidized form*)
- FADH₂- Forma reduzida do dinucleotídeo de flavina e adenina (do inglês *flavin adenine dinucleotide, reduced form*)
- FBfase- Frutose-1,6-bisfosfatase
- FE- Frutosúria essencial
- GLUT 5- Transportador de glicose 5 (do inglês *glucose transporter 5*)
- GLUT 2- Transportador de glicose 2 (do inglês *glucose transporter 2*)
- GTP- Trifosfato de guanosina (do inglês *guanosine triphosphate*)
- IHF-Intolerância hereditária à frutose
- IDH- Isocitrato desidrogenase (do inglês *isocitrate dehydrogenase*)
- LCR- Líquido cefalorraquidiano

LDH- Lactato desidrogenase (do inglês *lactate dehydrogenase*)
MAPK8 - Proteína cinase ativada por mitógeno 8 (do inglês *mitogen-activated protein kinase 8*)
MDH- Malato desidrogenase (do inglês *malate dehydrogenase*)
mRNA- Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês *Messenger ribonucleic acid*)
NAD⁺- Forma oxidada do dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized form*)
NADH- Forma reduzida de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form*)
OMIM- Herança mendeliana em humanos disponível na rede (do inglês *Online Mendelian Inheritance in Man*)
s.c. - subcutânea
PDH- Piruvato desidrogenase (do inglês *pyruvate dehydrogenase*)
SDH- Succinato desidrogenase (do inglês *succinate dehydrogenase*)
SPSS- Pacote de Programa Estatístico para Ciências Sociais (do inglês *Statistical Package for the Social Sciences*)
TAG- Triacilglicerol
TNB- 5-Tio-2-nitrobenzoato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da frutose e da glicose.	27
Figura 2: Vias metabólicas de frutose e inter-relação com metabolismos lipídico e glicídico. Formação de frutose a partir de glicose no organismo.....	29
Figura 3. Metabolismo da frutose nas frutosemias.....	31
Figura 4 – Esquema de reações do ciclo de Krebs	35
Figura 5. Esquema do fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia transportadora de elétrons	36
Figura 6. Delineamento experimental e linha do tempo das administrações de frutose.....	40
Figura 7. Efeitos da frutose 1 h após a sua administração aguda sobre as atividades dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial em córtex cerebral, fígado, rins e músculo esquelético de ratos jovens. (A) Atividade do complexo I-III; (B) Atividade do complexo II; (C) Atividade do complexo II-III; (D) Atividade do complexo IV. Os dados representam médias \pm erro padrão para 6 animais por grupo e estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparados ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes).	455
Figura 8. Efeitos da frutose 1 h após a sua administração aguda sobre as atividades dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial em córtex cerebral, fígado, rins e músculo esquelético de ratos jovens. (A) Atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH); (B) Atividade da enzima malato desidrogenase (MDH). Os dados representam médias \pm erro padrão para 6 animais por grupo e estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes).	466
Figura 9. Efeitos da administração aguda de frutose sobre as atividades das enzimas (A) citrato sintase (CS), (B) isocitrato desidrogenase (IDH), (C) succinato desidrogenase (SDH), (D) fumarase e (E) malato desidrogenase em córtex cerebral de ratos após 24 h após a administração de frutose. Os dados representam médias \pm erro padrão para n igual 6 animais por grupo e estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$. * $p < 0,05$ comparados ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes).....	499

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis glicose, triacilgliceróis (TAG), colesterol total e albumina em líquidos biológicos 1, 12 e 24 h após a administração aguda de frutose em animais submetidos a um modelo experimental de frutosemia.....	477
Tabela 2. Níveis séricos de lactato desidrogenase (LDH) e de lactato em animais submetidos a um modelo experimental de frutosemia 12 h e 24 h após a administração de frutose.....	488
Tabela 3. Conteúdo de glicogênio em músculo esquelético e fígado de ratos 24 h após a administração de frutose.....	488

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 FRUTOSE	27
1.2 INTOLERÂNCIA HEREDITÁRIA À FRUTOSE	29
1.3 METABOLISMO ENERGÉTICO	33
1.3.1 Ciclo de Krebs	34
1.3.2 Fosforilação oxidativa	36
1.4 JUSTIFICATIVA	37
2. OBJETIVOS	38
2.1 OBJETIVO GERAL	388
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	388
3 MATERIAL E MÉTODOS	399
3.1 ANIMAIS	399
3.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DE FRUTOSE	399
3.3 EXPERIMENTOS	399
3.3.1 Modelo animal de frutosemia	399
3.4 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS BIOENERGÉTICOS ..	411
3.5 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	433
3.5.1 Determinação dos níveis de glicose, albumina, TAG, colesterol	433
3.5.2 Determinação do conteúdo de glicogênio	433
3.6 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	433
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	433
4 RESULTADOS	444
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÃO	544
REFERÊNCIAS	555
ANEXO	699
ANEXO A- CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 FRUTOSE

A frutose é um monossacarídeo com seis carbonos unidos em ligações covalentes simples apresentando um grupo hidroxila e um grupo carbonila ($C_6H_{12}O_6$) (Figura 1) (Nelson e Cox, 2011). É isômero da glicose, apresentando grupo ceto na posição 2 da cadeia de carbonos (Tappy e Lê, 2010). A frutose está presente no mel, no xarope de milho rico em frutose, em adoçantes e néctares (Foster-Powell et al., 2002; Dutra-de-Oliveira e Marchini; 2008). Também está presente em frutas e vegetais, predominantemente em maçãs, laranjas, melões, soja, ervilha e feijões (Hallfrisch, 1990; Raitheletal., 2013).

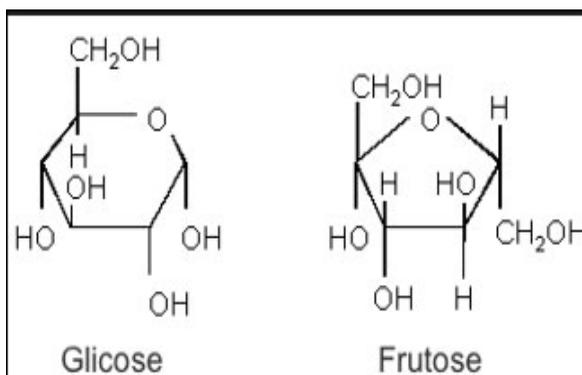


Figura 1. Estrutura molecular da frutose e da glicose. Fonte: Nelson e Cox (2011).

O metabolismo da frutose ocorre principalmente no fígado, mas também no epitélio proximal dos túbulos renais e no intestino delgado (Barreiros et al., 2005). No intestino delgado, a frutose é obtida através da clivagem da sacarose pela ação da enzima sacarase (EC 3.2.1.26). A frutose é, então, absorvida na membrana apical do enterócito pelo transportador de glicose (GLUT) 5, que é um transportador independente de insulina e específico para esse monossacarídeo (Smith et al., 2007; Lozinsky et al., 2013). O GLUT5 transporta a frutose da região apical dos enterócitos do intestino delgado para a região basolateral e desta através da veia porta para o fígado ou através da artéria renal para o rim em humanos. A ação do GLUT5 em humanos começa a se notabilizar a partir dos 6 meses de idade, quando crianças

começam a se alimentar de frutas e vegetais (Ananth et al., 2003; Quintana et al., 2009).

Outro transportador de frutose, embora de baixa afinidade, é o GLUT2, que também reconhece outros monossacarídeos como glicose e galactose (Lustig, 2010). A frutose é absorvida mais lentamente do que a glicose. Porém, é rapidamente captada e metabolizada pelo fígado (Cui et al., 2004). A absorção da frutose é aumentada na presença de glicose, de galactose e de alguns aminoácidos e diminuída pela presença de sorbitol (Hoekstra e Van den Aker, 1996; Cui et al., 2004).

A primeira etapa do metabolismo de frutose, de forma semelhante ao da glicose, é a fosforilação e ocorre no fígado, onde esse carboidrato é fosforilado no carbono na posição 1, convertendo-se em frutose-1-fosfato pela ação da enzima frutocinase (EC 2.7.1.4) (Barreiros et al., 2005). A frutose-1-fosfato é convertida pela ação da aldolase B (frutose-1,6-bisfosfato aldolase; EC 4.1.2.13) em duas trioses: di-hidroxiacetona-fosfato (DHAP) e gliceraldeído, ambos intermediários glicolíticos (Figura 2) (Tappy et al., 2013). Essas duas trioses podem seguir três caminhos distintos, com finalidades diferentes: 1) participar da via glicolítica, fornecendo piruvato; 2) liberar energia para serem reduzidas até glicerol, necessário para a síntese de triacilgliceróis (TAG), fosfolípídeos e outros lipídeos, e 3) serem condensadas para formar frutose-1,6-bisfosfato e, a partir desta, formar glicose e/ou glicogênio (Lim et al., 2010; Nomura e Yamanouchi, 2012) (Figura 2).

A hexocinase (EC 2.7.1.1), presente no músculo e no tecido adiposo, também pode converter frutose a frutose-6-fosfato, embora de forma lenta (Smith et al., 2007). A enzima frutose-1,6-bisfosfatase (FBfase; EC 3.1.3.11) é a única enzima na via da gliconeogênese que converte frutose-1,6-bisfosfato em frutose-6-fosfato e fosfato inorgânico. Essa enzima tem a sua atividade mais relevante no fígado, nos rins e no intestino delgado (Steinmann et al., 2001).

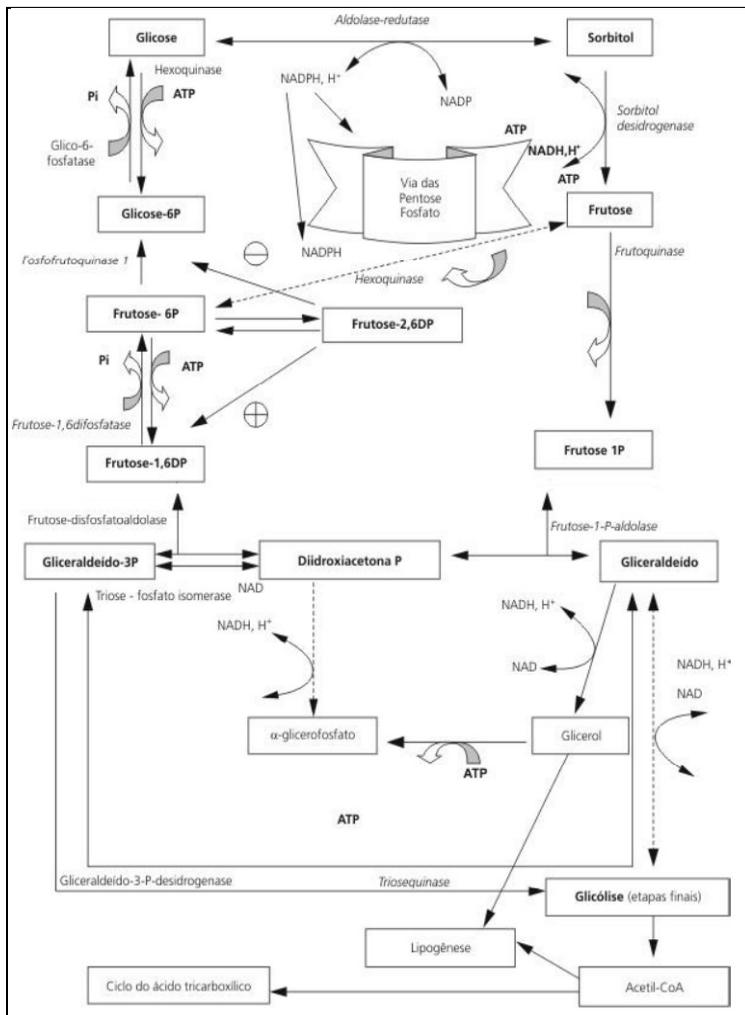


Figura 2. Vias metabólicas de frutose e inter-relação com metabolismos lipídico e glicídico. Formação de frutose a partir de glicose no organismo. Fonte: Barreiros et al. (2005).

1.2 INTOLERÂNCIA HEREDITÁRIA À FRUTOSE

Os EIM são doenças hereditárias resultantes de uma deficiência enzimática, levando à interrupção de uma via metabólica (El Husny e Fernandes Caldato, 2006), alterando os processos de síntese, degradação, armazenamento ou do transporte de moléculas no

organismo (Chiaratti de Oliveira et al., 2001). A frutosemia é uma característica comum aos EIM da frutose, todas devido à deficiência de uma das enzimas responsáveis pelo metabolismo hepático, renal e intestinal da frutose adquirida pela dieta (Figura 3). Todas as formas de frutosemia são doenças genéticas de herança autossômica recessiva (Bouteldja e Timson, 2010; Wilder-Smith et al., 2014).

As mutações genéticas que resultam em alterações do metabolismo de frutose podem originar consequências clínicas importantes, como hipoglicemia, acidose metabólica e edema cerebral, além de alterações hepáticas, renais e musculares (Steinmann et al., 2001). Os três tipos conhecidos de frutosemia incluem frutossúria essencial (FE; OMIM 229800; deficiência da enzima frutocinase), intolerância hereditária à frutose (IHF; OMIM 229600; deficiência da enzima aldolase B) e deficiência da FBfase (OMIM 229700) (Barreiros et al., 2005) (Figura 3). A IHF é a forma mais comum e mais grave (Mayatepek et al., 2010).

Na IHF, a atividade da aldolase B hepática apresenta uma redução de 15% em relação aos valores normais, levando ao acúmulo de frutose e frutose-1-fosfato nos líquidos biológicos e tecidos de pacientes acometidos por essa doença (Hommes, 1993; Cox, 1994). Mais de 20 mutações foram identificadas até o momento no gene da aldolase B, incluindo mutações de translocação, inversão, duplicação e deleção (Coffee e Tolan, 2010). A IHF apresenta uma incidência geral estimada de 1:40.000 recém-nascidos independentemente do gênero (Smith et al., 2007; Coffee et al., 2010). Na Europa, a incidência dessa doença é de 1:20.000, enquanto que na América do Norte é de aproximadamente 1:40.000 (Tommaso, 2006).

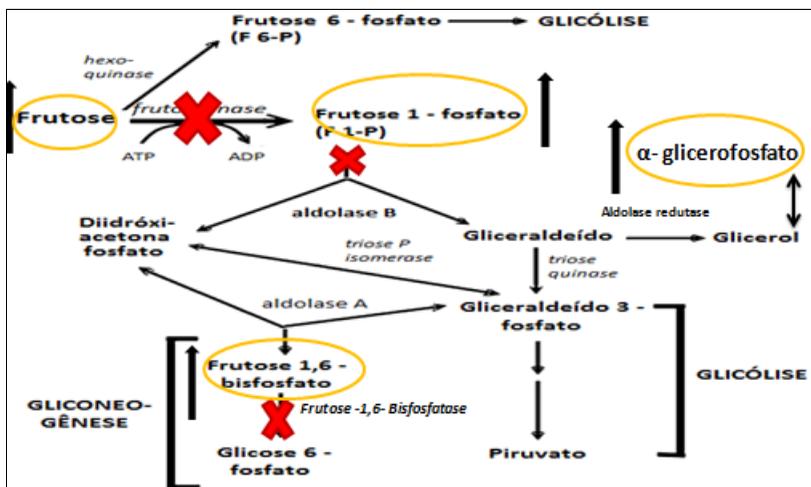


Figura 3. Metabolismo da frutose nas frutosemias. Fonte: Adaptado de Bouteldja e Timson (2010).

Pacientes afetados pela IHF são saudáveis e assintomáticos ao nascimento. O início dos sintomas se dá apenas quando alimentos contendo frutose, como frutas e vegetais, são introduzidos na dieta (Sánchez-Gutiérrez et al., 2002). O recém-nascido não apresenta nenhum distúrbio metabólico durante a lactação. Entretanto, ao se introduzir frutose à sua dieta, os primeiros sintomas aparecem de forma proporcional à ingestão desse monossacarídeo (Quintana et al., 2009). Crianças afetadas por IHF que sobrevivem até seis meses de idade apresentam melhor prognóstico, visto que, nessa idade, elas tendem a recusar alimentos contendo frutose (Froesch, 1976).

Os principais sinais e sintomas da IHF incluem hipoglicemia, náuseas, vômitos, anorexia e distúrbios do desenvolvimento (Sánchez-Gutiérrez et al., 2002). Outros achados clínicos são diarreia, dor abdominal, insuficiência renal e hepática, hepatoesplenomegalia, icterícia, edema, oligúria, anúria, ascite, recusa de alimentação, febre, convulsões e choque grave, podendo levar à morte durante as crises (Ali et al., 1998; Ananth et al., 2003; Coffee et al., 2010). Dentre as principais manifestações cerebrais estão letargia, irritabilidade, coma e edema cerebral (Steinmann et al., 2001).

Com o aumento da idade, os sintomas clínicos adicionais podem incluir episódios de irritabilidade, sonolência, dispnéia, taquicardia, hipotonia muscular, hepatomegalia, doença febril com a recusa de alimentos e vômitos, podendo evoluir a coma e óbito (Steinmann et al.,

2006). Os achados laboratoriais durante as crises metabólicas apresentam níveis de glicose sanguínea geralmente abaixo de 40 mg/dL e acúmulo de ácido láctico de até 20 mmol/L, com pH abaixo de 7,1 (Barreiros et al., 2005; Coffee e Tolan, 2010). A IHF é diagnosticada pela quantificação de frutose na urina, dosagem de fosfato inorgânico sérico e de glicose sanguínea após a ingestão de frutose (Mayatepek et al., 2010). O diagnóstico confirmatório se dá pela determinação da atividade da enzima deficiente em biópsia hepática (Coffee e Tolan, 2010; Mayatepek et al., 2010; Choi et al., 2012).

O tratamento da IHF consiste basicamente na retirada de frutose, sorbitol e sacarose da dieta, com o intuito de evitar os sinais e sintomas de intoxicação (Tappy e Mittendorfer, 2012). A completa exclusão da frutose na alimentação é geralmente difícil e há risco constante para os indivíduos acometidos por IHF, devido ao uso generalizado de frutose como edulcorante comercial e como componente de alguns medicamentos e infusões parenterais (Coffee et al., 2010). O tratamento das crises é realizado por meio de infusão endovenosa ou administração oral de glicose e bicarbonato para controle de hipoglicemia e acidose metabólica, respectivamente, e a terapia de manutenção consiste em evitar o jejum prolongado e o fornecimento de dieta adequada nos episódios febris (Asberg et al., 2010). Em crianças com idades entre 6 meses e 2 anos, a restrição de frutose, sacarose e sorbitol é especialmente recomendada (Mayatepek et al., 2010; Wirth et al., 2014).

Apesar da IHF ser conhecida há mais de 58 anos, ainda existem questões que permanecem desconhecidas quanto à toxicidade da frutose e de seus metabólitos (Tappy e Mittendorfer, 2012). Os sintomas gastrointestinais como diarreia, dor abdominal e meteorismo decorrentes da má absorção da frutose são associados à permanência do açúcar no intestino, resultando no aumento da osmolaridade. Alia-se a isso o fato da frutose servir como substrato para fermentação bacteriana no cólon (Rana e Malik, 2014; Berg et al., 2015). Recém-nascidos e crianças na primeira infância são mais suscetíveis aos sintomas gastrointestinais em decorrência do atraso no desenvolvimento da capacidade do intestino de absorver a frutose (Nobigrot et al., 1997; Jones et al., 2011; Melchior et al., 2014).

Estudos com animais e seres humanos têm demonstrado que tanto o consumo crônico como agudo de quantidades elevadas de frutose aumentam níveis de TAG, quando comparado às dietas com carboidratos complexos (Crescenzo et al., 2015). Isso sugere que ocorra aumento da síntese de lipídeos em detrimento da gliconeogênese (Song et al., 2012). O consumo de alto teor de frutose contribui para o

surgimento de doença hepática gordurosa não alcoólica, obesidade e resistência à insulina (Basaranoglu et al., 2015).

Um dos principais efeitos tóxicos da frutose parece ser o acúmulo de frutose-1-fosfato e diminuição da disponibilidade de fosfato inorgânico (Elliott et al., 1967; Wang e Van, 1981), inibindo a ação da enzima glicogênio fosforilase hepática (Oberhaensli et al., 1987). Tal fato daria origem aos sintomas como hipoglicemia e acidose metabólica (Mayatepek et al., 2010; Lima et al., 2015), além da inibição da atividade da enzima frutocinase pela frutose-1-fosfato, resultando na diminuição da captação de frutose pelo fígado e levando ao aumento de frutose no plasma de pacientes com IHF. Outros efeitos tóxicos da frutose incluem indução de estresse oxidativo em córtex cerebral (Lopes et al., 2014).

O aumento do consumo de frutose em pacientes está associado ao aumento de ácido úrico no plasma e a depleção intracelular de trifosfato de adenosina (ATP) (Abdelmalek et al., 2012; Vieira et al., 2014). Estudos anteriores estabeleceram que a elevação de níveis plasmáticos e urinários de ácido úrico em humanos era devido à rápida degradação do ATP hepático usada na reação da frutocinase (Perheentupa et al., 1967; Bjornstad et al., 2015). O excesso desse composto nitrogenado no organismo pode desencadear a doença conhecida por gota, além de cálculos renais, nas vesículas e vias biliares (Rho et al., 2011). Estudos recentes demonstraram que o consumo de dieta rica em frutose induz disfunção mitocondrial e desencadeia apoptose em músculo esquelético, prejudicando o metabolismo energético muscular (Jaiswal et al., 2015). Assim, sabe-se que inúmeros processos celulares necessitam de energia na forma de ATP (Nelson e Cox, 2011). Existem diferentes moléculas como glicose, ácidos graxos livres e aminoácidos que podem servir como substratos energéticos (Nelson e Cox, 2014). Havendo a disfunção mitocondrial pela administração aguda de frutose, ocorrerá o bloqueio do transporte de elétrons ou alterações do bombeamento de prótons da matriz para o espaço intermembranas na cadeia transportadora de elétrons (CTE) e, conseqüentemente, alterará a formação do potencial eletroquímico, prejudicando a fosforilação do difosfato de adenosina (ADP) a ATP no complexo V da CTE (Cushion et al., 2000).

1.3 METABOLISMO ENERGÉTICO

A frutose, à semelhança de outros monossacarídeos, pode ser um substrato energético em células animais (Nelson et al., 2011). Estudos mostram que o excesso de frutose induz disfunção mitocondrial e

desencadeia alterações em células do músculo esquelético, induzindo estresse oxidativo (Jaiswal et al., 2015). Apesar das complicações causadas pela frutose, este monossacarídeo é indispensável para a realização de várias funções, tais como transporte ativo de íons e moléculas e síntese de macromoléculas, incluindo biomoléculas envolvidas na contração muscular (Nelson e Cox, 2011).

A energia necessária para realizar essas funções é obtida a partir da degradação de glicogênio ou pela oxidação de nutrientes como glicose ou ácidos graxos livres (Voet et al., 2008). A glicose pode ser obtida a partir de precursores não glicídicos como lactato, albumina, piruvato ou glicerol (Huidekoper et al., 2010; Nielsen et al., 2015). O ATP é a principal moeda energética utilizada nos processos celulares que exigem energia. A energia química liberada pela hidrólise desse nucleotídeo serve para impulsionar uma série de reações como a catalisada pela Na^+, K^+ -ATPase, principal consumidora de ATP nas células (Lehninger et al., 2007; Voet et al., 2008). A glicose é a principal fonte de energia usada pela maioria das células e ocupa uma posição central no metabolismo energético (Benarroch, 2014). O acetil-Coenzima A (acetil-CoA) formado pela oxidação de diversos nutrientes, incluindo a glicose pela descarboxilação oxidativa do piruvato catalisada pela enzima piruvato desidrogenase (PDH; EC 1.2.4.1), será completamente oxidado a CO_2 no ciclo de Krebs.

1.3.1 Ciclo de Krebs

O ciclo de Krebs ocorre na matriz mitocondrial (Osellame et al., 2012; Lee, 2014) e consiste em uma sequência de reações em que, em cada volta do ciclo, são formadas três moléculas de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido (NADH), uma molécula de dinucleotídeo de flavina e adenina reduzido (FADH_2) e uma molécula de trifosfato de guanosina (GTP) (Nelson e Cox, 2014). O acetil-CoA dará início ao ciclo ao ser condensado com o oxalacetato pela ação da enzima citrato sintase (CS; EC 2.3.3.1), formando o primeiro intermediário do ciclo de Krebs, o citrato (Kim et al., 2012). O citrato é convertido a isocitrato pela ação da enzima aconitase (EC 4.2.1.3) (Eprintsev et al., 2015), formando um intermediário instável (cis-aconitato). Na próxima etapa, a enzima isocitrato desidrogenase (IDH; EC 1.1.1.42) catalisa a descarboxilação oxidativa do isocitrato para formar α -cetoglutarato (Leonardi et al., 2012) que, por descarboxilação oxidativa catalisada pelo complexo α -cetoglutarato desidrogenase (α -KGDH; EC 1.4.1.13), resultando na formação de succinil-CoA (Gibson

et al., 2015). A enzima succinil-CoA sintetase (EC 6.2.1.4), por sua vez, catalisa a reação reversível entre succinil-CoA e succinato (Li et al., 2013; Nolte et al., 2014), que é então oxidado pela ação da enzima succinato desidrogenase (SDH; EC 1.3.5.1), formando fumarato (Sierotzki e Scalliet, 2013). O fumarato é convertido a malato pela ação da enzima fumarase (EC 4.2.1.2) (Mescam et al., 2011). Finalmente, o malato pode ser oxidado formando oxaloacetato, através de uma reação catalisada pela enzima malato desidrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) (Taillefer et al., 2015).

A conservação de energia proveniente da oxidação do acetil-CoA se dá pela formação de equivalentes reduzidos através da transferência de elétrons para as coenzimas oxidadas dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD^+) (nas reações catalisadas pelas enzimas IDH, α -KGDH e MDH) e dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) (na reação catalisada pela enzima SDH), bem como pela formação de uma molécula de GTP na reação catalisada pela succinil-CoA sintetase (Yang et al., 2014) (Figura 4). Estas moléculas de equivalentes reduzidas formadas no ciclo de Krebs podem ser oxidadas na cadeia respiratória, sendo utilizadas para síntese de ATP em um processo conhecido como fosforilação oxidativa (Masoudi-Motlagh et al., 2015).

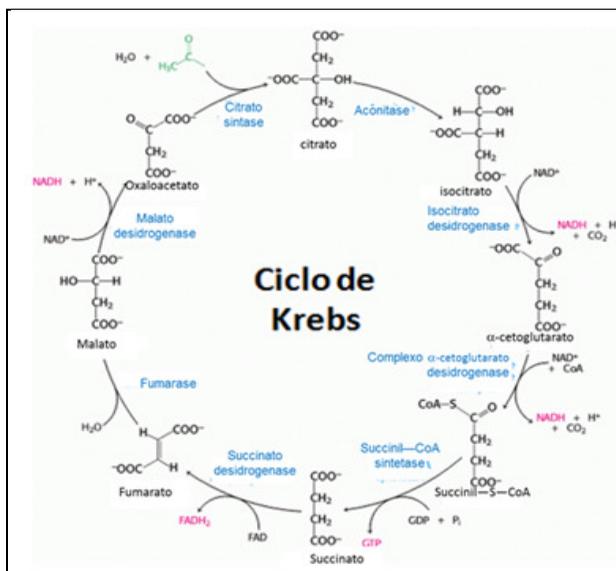


Figura 4 – Esquema de reações do ciclo de Krebs. Fonte: Adaptado de Lehninger et al. (2007).

1.3.2 Fosforilação oxidativa

A fosforilação oxidativa é o processo pelo qual a energia proveniente da oxidação dos compostos da dieta é utilizada para a formação de ATP nas mitocôndrias, através da transferência sequencial de elétrons pela CTE, tendo o oxigênio comoceptor final de elétrons (Lee e Huttemann, 2014) (Figura 5). A cadeia respiratória é composta por 5 complexos proteicos, denominados: *i*) complexo I ou NADH desidrogenase (EC1.6.5.3); *ii*) complexo II ou SDH (EC 1.3.5.4); *iii*) complexo III ou coenzima Q-citocromo *c* redutase (EC 1.10.2.2); *iv*) complexo IV ou citocromo *c* oxidase (EC 1.9.3.1); e *v*) complexo V ou ATP-sintase (EC 3.6.3.14) (Voet et al., 2008; Beutner et al., 2014). A CTE possui também elementos móveis para a transferência de elétrons entre os complexos: a coenzima Q ou ubiquinona, que transfere os elétrons dos complexos I e II para o complexo III, e o citocromo *c*, que transfere os elétrons do complexo III para o complexo IV (Voet et al., 2008; Xu et al., 2014). Quando os elétrons são transportados através dos complexos I, III e IV da CTE, ocorre o bombeamento dos prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, resultando na formação de um gradiente eletroquímico chamado de potencial de membrana mitocondrial (Voet et al., 2008; Beutner et al., 2014). A dissipação deste potencial através do complexo V fornece a força próton-motriz que impulsiona a fosforilação de ADP na fração F1 da ATP-sintase, fosforilando o ADP e, conseqüentemente, formando ATP (Juel et al., 2015).

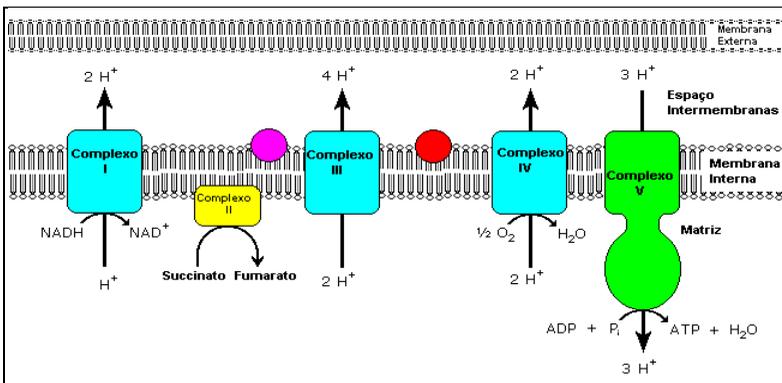


Figura 5. Esquema do fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia transportadora de elétrons. Fonte: Nelson e Cox, 2007.

1.4 JUSTIFICATIVA

Considerando que os mecanismos fisiopatológicos dos danos teciduais encontrados em pacientes acometidos por frutosemia ainda são pouco conhecidos, e que a frutose pode ser um agente tóxico, torna-se importante investigar o efeito de frutose sobre parâmetros do metabolismo energético, na tentativa de esclarecer a fisiopatologia da doença e, assim, colaborar para o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas para os pacientes.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da administração aguda de frutose sobre parâmetros bioquímicos em cérebro e tecidos periféricos de ratos jovens.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Investigar o efeito da administração aguda subcutânea de frutose sobre as atividades dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial (I-IV) em córtex cerebral, fígado, rim e músculo esquelético de ratos jovens;
- ❖ Investigar o efeito da administração aguda subcutânea de frutose sobre as atividades de enzimas do ciclo de Krebs (CS, IDH, SDH, fumarase e MDH) em córtex cerebral, fígado, rim e músculo esquelético de ratos jovens;
- ❖ Investigar o efeito da administração aguda subcutânea de frutose sobre os níveis de glicose e TAG em soro de ratos jovens;
- ❖ Investigar o efeito da administração aguda subcutânea de frutose sobre os níveis de glicose triacilgliceróis, colesterol e albumina em líquido cefalorraquidiano (LCR) de ratos jovens;
- ❖ Investigar o efeito da administração aguda subcutânea de frutose sobre os níveis de lactato desidrogenase (LDH) e de lactato em soro de ratos jovens;
- ❖ Investigar o efeito da administração aguda subcutânea de frutose sobre o conteúdo de glicogênio em músculo esquelético e fígado de ratos jovens.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Neste estudo foram usados ratos Wistar machos jovens de 30 dias de vida, obtidos do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Os ratos foram mantidos nas suas gaiolas até a data do desmame (21 dias de idade). Os animais tiveram livre acesso à água e ao alimento. Os ratos foram mantidos em ciclos de claro-escuro de ± 12 horas a uma temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$. A utilização dos animais seguiu o protocolo experimental aprovado previamente pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESC (Protocolo n° 076/2013-2) (ANEXO A). Foram feitos esforços para minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento.

3.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DE FRUTOSE

Para este estudo, a frutose foi dissolvida em veículo (0,9% de cloreto de sódio). A solução de frutose sempre foi preparada no dia dos experimentos e o seu pH foi ajustado para 7,4.

3.3 EXPERIMENTOS

3.3.1 Modelo animal de frutosemia

Este modelo animal de frutosemia baseia-se em um trabalho previamente descrito por Monteiro e colaboradores (2012). No primeiro experimento para o desenvolvimento do modelo animal de frutosemia, os ratos jovens de 30 dias de idade foram divididos em dois grupos: os animais do grupo 1 (controle) que receberam uma única injeção subcutânea (s.c) de solução salina. No grupo 2 (frutose), os animais receberam uma dose única de injeção s.c de frutose de $5 \mu\text{mol/g}$ de peso corporal (Figura 6).

Uma hora após as administrações de solução salina e de frutose, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina $6,6 \text{ mg/kg}$, e xilasina $0,3 \text{ mg/kg}$, com uma agulha fina número 23 fez-se a punção na cisterna magna para a obtenção do LCR para pesquisar o nível da glicose em córtex cerebral após uma hora da administração aguda de frutose; seguiu-se a eutanásia de ratos com guilhotina; foi colhido amostra do sangue periférico a fim de se obter o soro para pesquisa do nível de TAG sérico; o córtex cerebral, rins, fígado e músculo

esquelético foram rapidamente dissecados em placa de Petri e posteriormente foram armazenados a -70°C (Figura 6).

Doze horas ou vinte e quatro horas após as administrações de solução salina e de frutose, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina 6,6 mg/kg, e xilasina 0,3 mg/kg, com uma agulha número 23 fez-se a punção na cisterna magna para a obtenção do LCR para pesquisar o nível da glicose, colesterol total e de albumina em córtex cerebral após 12 h e 24 h da administração aguda de frutose; seguiu-se a eutanásia de ratos com guilhotina; foi colhido amostra do sangue periférico a fim de se obter o soro para pesquisa do nível de glicose, lactato e LDH sérico; o córtex cerebral, fígado e músculo esquelético foram rapidamente dissecados em placa de Petri e posteriormente foram armazenados a -70°C (Figura 6).

As estruturas foram pesadas e homogeneizadas com tampão SETH (sacarose 250 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA - 2 mM, Trizma base 10 mM e heparina 50 UI/mL, pH, 7,4) e o homogeneizado obtido foi levado à centrifugação a $800\times g$ por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante obtido foi separado e armazenado a -70°C para a dosagem das atividades das enzimas do ciclo de Krebs, os complexos da cadeia respiratória mitocondrial. O período máximo entre a preparação de homogeneizados e análises de enzimas sempre foi menor do que 5 dias.

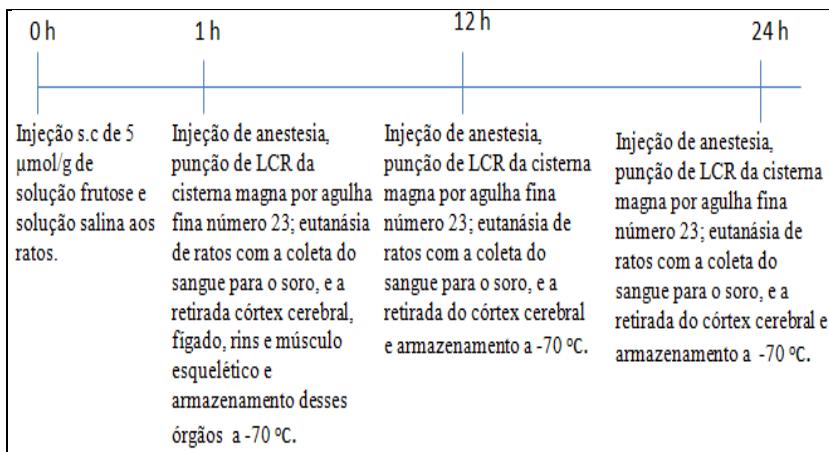


Figura 6. Delineamento experimental e linha do tempo das administrações de frutose. Elaborado pelo autor.

3.4 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS BIOENERGÉTICOS

3.4.1 Atividade da enzima CS: Foi avaliada de acordo com Srere (1969) em um meio contendo 0,1 mM 5',5''-ditiobis-(2-nitrobenzoato) (DTNB), 0,2 mM de ácido oxaloacético, 0,1 % de triton X-100, 0,1 mM de acetil-CoA e 100 mM de Tris-HCl, pH 8,0, e aproximadamente 3 µg de proteína (homogeneizado). A atividade enzimática acompanhada espectrofotometricamente pela redução de DTNB a 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) em comprimento de onda de 412 nm. Os resultados são expressos em nmol TNB. min⁻¹. mg proteína⁻¹.

3.4.2 Atividade da enzima IDH: Foi determinada em um meio contendo tampão Tris-HCl 33 mM, pH 7,4, 10 µM de rotenona, 1,2 nM de MnCl₂, 0,67 nM de ADP, 0,1 % de Triton X-100, 0,3 mM de NAD⁺, 5 mM de isocitrato e aproximadamente 75 µg proteína (homogeneizado) (Plaut, 1969). A redução do NAD⁺ a NADH foi acompanhada espectrofotometricamente em comprimento de onda de 340 nm e os resultados estão expressos em nmol NADH. min⁻¹. mg proteína⁻¹.

3.4.3 Atividade da enzima SDH: Esta atividade enzimática foi determinada de acordo com o método de Fischer e colaboradores (1985) acompanhando espectrofotometricamente a diminuição da absorvância devido à redução de 2,6-dicloroindofenol (DCIP) a 600 nm. Os resultados estão expressos em nmol. min⁻¹. mg proteína⁻¹.

3.4.4 Atividade da enzima MDH: Esta atividade foi medida segundo o método descrito por Kitto (1969) em um meio contendo tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,4, contendo 10 µM de rotenona, 0,3 % de Tween 20, 0,14 mM de NADH, 0,30 mM de oxalacetato e 25 µg de proteína. A atividade da MDH foi determinada seguindo espectrofotometricamente a oxidação de NADH em comprimento de onda de 340 nm. Os resultados são expressos em nmol NADH. min⁻¹. mg proteína⁻¹.

3.4.5 Atividade de fumarase: Foi medida em 1 mL de tampão de fosfato de sódio 100 mM, pH 7,3, e 50 mM de malato. A atividade foi determinada pelo acompanhamento do aumento da absorvância em comprimento de onda de 250 nm (O'Hare e Doonan, 1985). Os resultados estão expressos em nmol de fumarato . min⁻¹. mg proteína⁻¹.

3.4.6. Atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial

3.4.6.1 Determinação da atividade do complexo I+CoQ+III: A reação foi realizada em um meio contendo tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 8,0, 2 mM de KCN, 10 μ M de EDTA, 50 μ M de citocromo *c* e alíquotas de homogeneizado contendo aproximadamente 40-80 μ g de proteínas. O meio de incubação foi mantido a 30 °C por 1 minuto. A reação se iniciou pela adição de 25 μ M de NADH. As absorvâncias foram registradas por 3 minutos, após os quais foram adicionados 10 μ M de rotenona. A atividade do complexo I+CoQ+III foi medida pelo aumento na absorvância causada pela redução do citocromo *c* a 550 nm (Schapira et al., 1990). Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

3.4.6.2 Determinação da atividade do complexo II: O meio de incubação constituiu-se de tampão fosfato de potássio 40 mM, pH 7,4, 16 mM de succinato de sódio (16 mM) e 8 μ M de DCIP. Inicialmente pré-incubou-se com 40-80 μ g de proteínas do homogeneizado a 30 °C por 20 minutos. Logo após, foram adicionados ao meio 4 mM de azida sódica e 7 μ M de rotenona e iniciou-se a reação com a adição de 40 μ M de DCIP. As absorvâncias foram registradas por 5 minutos a 600 nm. A atividade do complexo II foi determinada pela diminuição da absorvância devida à redução do DCIP (Fischer et al., 1985). Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

3.4.6.3 Determinação da atividade do complexo II+CoQ+III: O meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 40 mM, pH 7,4, contendo 16 mM de succinato de sódio, foi pré-incubado com 40-80 μ g de proteínas do homogeneizado a 30 °C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 4 mM de azida sódica e 7 μ M de rotenona e a reação se iniciou pela adição de 0,6 μ g/mL de citocromo *c*. As absorvâncias foram registradas por 5 minutos a 550 nm. A atividade do complexo II+CoQ+III foi determinada pelo aumento da absorvância causado pela redução do citocromo *c* (Fischer et al., 1985). Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

3.4.6.4 Determinação da atividade do complexo IV: O meio de incubação continha tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, N-dodecil-D-maltosídeo 0,6 mM e 10-20 μ g de proteínas (homogeneizado). A reação foi iniciada com a adição de 0,7 μ g de citocromo *c* reduzido. A atividade enzimática foi medida a 25 °C por 10

minutos e foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 550 nm devido à oxidação de citocromo *c* previamente reduzido (Rustin et al., 1994). Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

3.5 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

3.5.1 Determinação dos níveis de glicose, albumina, TAG, colesterol, LDH e lactato: os níveis destes marcadores foram avaliados em soro e LCR por kits comerciais de acordo com o fabricante (Labtest® e Analisa®).

3.5.2 Determinação do conteúdo de glicogênio: foi medido no músculo esquelético e no fígado de acordo com Krisman (1962), com algumas modificações. Os tecidos foram homogeneizados em KOH 33 % e fervidos a 100 °C durante 20 min, com agitação. Após resfriamento, às amostras foi acrescentado etanol 96% e essas foram aquecidas outra vez à ebulição e depois resfriadas em banho de gelo para precipitar o conteúdo de glicogênio. Os homogeneizados foram centrifugados a 1300 x g durante 15 min. O sobrenadante foi descartado e os sedimentos foram neutralizados com solução saturada de NH₄Cl. O sedimento foi aquecido a 100 °C durante 5 min e solubilizado em água. O conteúdo de glicogênio foi determinado por tratamento com reagente de iodo e a absorvância foi medida a 460 nm. Os resultados estão expressos em mg de glicogênio/g de tecido.

3.6 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A determinação de proteínas foi realizada através do método de Lowry e colaboradores (1951), usando-se albumina sérica bovina como padrão.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação entre duas médias, foi utilizado o teste *t* de *Student* para amostras independentes. As análises estatísticas foram feitas pelo programa Pacote Estatístico para Ciências Sociais (SPSS) versão 16.0. Foram consideradas diferenças significativas quando o valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Após uma hora da administração de frutose, avaliou-se a influência deste carboidrato sobre as atividades dos complexos da CTE, observando-se um aumento da atividade do complexo I-III no fígado ($p < 0,01$) (Figura 7A), quando comparados aos animais do grupo controle. Não foi observada nenhuma alteração na atividade do complexo I-III em córtex cerebral, rim e músculo esquelético. Observou-se também uma redução das atividades dos complexos II e II-III no músculo esquelético de animais que receberam frutose, quando comparados aos animais do grupo controle ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente) (Figuras 7B e 7C). Por outro lado, não se observaram alterações nas atividades destes complexos nos demais tecidos estudados. A administração aguda de frutose não alterou a atividade do complexo IV da CTE em nenhum dos tecidos investigados quando avaliados 1 h após as administrações (Figura 7D).

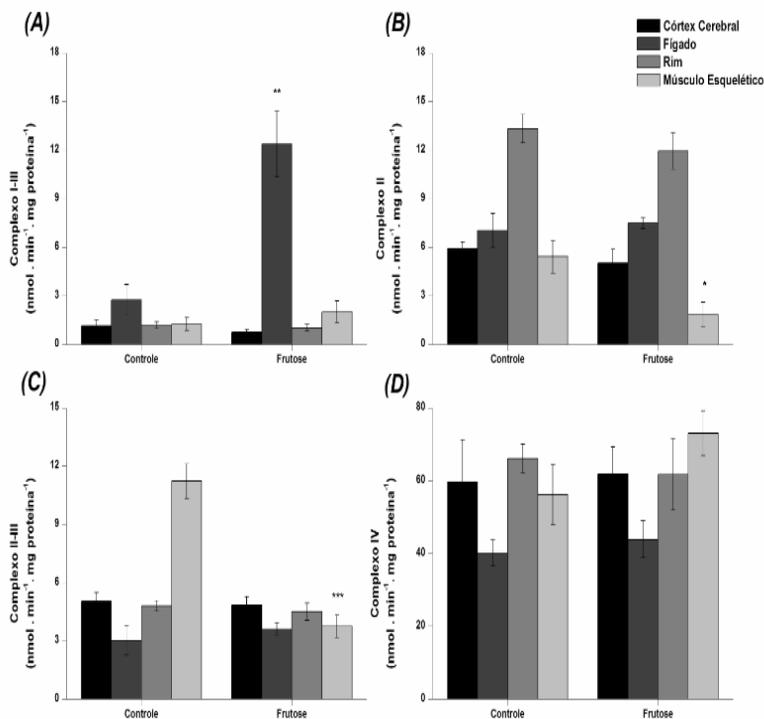


Figura 7. Efeitos da frutose 1 h ap\u00f3s a sua administra\u00e7\u00e3o aguda sobre as atividades dos complexos da cadeia respirat\u00f3ria mitocondrial em c\u00f3rtex cerebral, f\u00edgado, rins e m\u00fasculo esquel\u00e9tico de ratos jovens. (A) Atividade do complexo I-III; (B) Atividade do complexo II; (C) Atividade do complexo II-III; (D) Atividade do complexo IV. Os dados representam m\u00e9dias \pm erro padr\u00e3o para 6 animais por grupo e est\u00e3o expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ comparados ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes).

As atividades das enzimas SDH e MDH tamb\u00e9m foram analisadas em animais que receberam frutose agudamente uma hora antes da eutan\u00e1sia. Observou-se que a atividade da SDH n\u00e3o foi afetada com a administra\u00e7\u00e3o de frutose agudamente (Figura 8A). Por outro lado, a atividade de MDH aumentou no rim dos animais que receberam frutose, em compara\u00e7\u00e3o com o grupo controle ($p<0,05$) (Figura 8B).

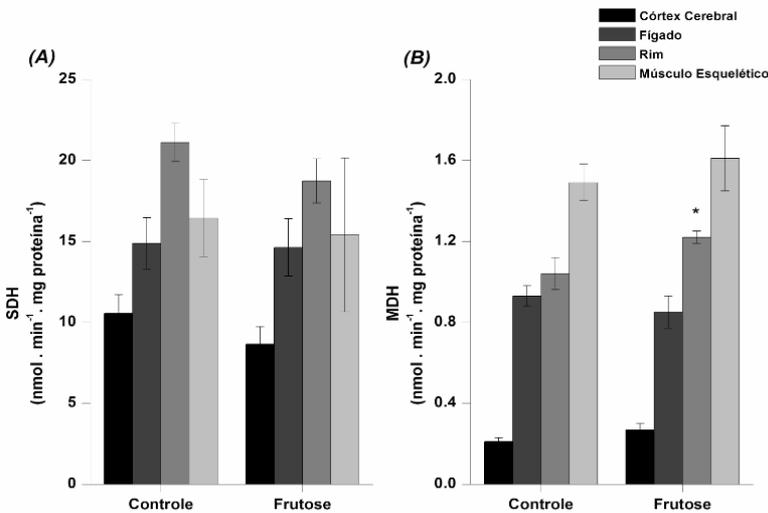


Figura 8. Efeitos da frutose 1 h após a sua administração aguda sobre as atividades dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial em córtex cerebral, fígado, rins e músculo esquelético de ratos jovens. (A) Atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH); (B) Atividade da enzima malato desidrogenase (MDH). Os dados representam médias \pm erro padrão para 6 animais por grupo e estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \cdot \text{proteína}^{-1}$. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes).

A seguir, avaliou-se o efeito da administração aguda de frutose 1 h antes da eutanásia sobre os níveis de glicose e TAG em líquidos biológicos de ratos; observou-se que os níveis de glicose foram semelhantes entre os grupos estudados. Por outro lado, os níveis de TAG sérico foram aumentados nos animais que receberam administração de frutose agudamente, em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$) (Tabela 1). Avaliou-se também a influência da administração aguda de frutose sobre parâmetros bioquímicos em LCR de ratos 12 h e 24 h após a administração do carboidrato. Observou-se que os níveis de colesterol total aumentaram 12 h após a administração aguda de frutose. Em contraste, os níveis de albumina diminuíram 12 h após a administração deste carboidrato (Tabela 1). Observou-se também que, 24 h após a administração de frutose, os níveis de colesterol total e de albumina no LCR não foram diferentes em comparação ao grupo controle. Os níveis de glicose no LCR não foram alterados em nenhum dos tempos avaliados no presente estudo (Tabela 1).

Tabela 1. Níveis glicose, triacilgliceróis (TAG), colesterol total e albumina em líquidos biológicos 1, 12 e 24 h após a administração aguda de frutose em animais submetidos a um modelo experimental de frutosemia.

	Controle	Frutose
	1 h	
Glicose (LCR)	70,6 ± 9,1	75,4 ± 8,7
TAG (sérico)	125,8 ± 16,9	252,6 ± 15,4*
	12 h	
Glicose	69,5 ± 4,96	59,42 ± 6,84
Colesterol total	6,88 ± 0,98	13,5 ± 1,00***
Albumina	0,31 ± 0,06	0,18 ± 0,01*
	24 h	
Glicose	34,9 ± 7,05	36,3 ± 4,32
Colesterol total	26,4 ± 0,92	26,88 ± 1,09
Albumina	0,07 ± 0,006	0,09 ± 0,03
Os dados representam médias ± erro padrão para 6 animais por grupo e estão expressos em mg/dL. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ comparados ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes).		

Também foi avaliado o efeito da administração aguda de frutose sobre os níveis séricos de LDH e de lactato em ratos 12 h após a administração deste monossacarídeo. Observou-se que os níveis de lactato sérico aumentaram 12 h após a administração de frutose em comparação ao grupo controle, e tais níveis retornaram aos valores normais 24 h após a administração. Por outro lado, a atividade da LDH não foi alterada 12 h e 24 h após a administração de frutose (Tabela 2).

Tabela 2. Níveis séricos de lactato desidrogenase (LDH) e de lactato em animais submetidos a um modelo experimental de frutosemia 12 h e 24 h após a administração de frutose.

	Controle	Frutose
	12 h	
LDH	494 ± 40,1	448 ± 73,2
Lactato	12,1 ± 0,97	21,7 ± 4,00*
	24 h	
LDH	113 ± 2,86	119 ± 2,94
Lactato	18,8 ± 2,78	12,3 ± 0,44
Os dados representam médias ± erro padrão da média para 6 animais por grupo e estão expressos em UI/dL para os níveis de LDH e mg/dL para os níveis de lactato. * $p < 0,05$ em comparação com grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes).		

Adicionalmente, determinou-se o conteúdo de glicogênio em músculo esquelético e fígado de ratos que sofreram eutanásia 24 h após a administração de frutose. Não foi observada diferença significativa entre os grupos em nenhum dos tecidos (Tabela 3).

Tabela 3. Conteúdo de glicogênio em músculo esquelético e fígado de ratos 24 h após a administração de frutose.

	Controle	Frutose
Músculo esquelético	0,39 ± 0,05	0,41 ± 0,6
Fígado	0,35 ± 0,04	0,33 ± 0,06
Os dados representam médias ± erro padrão da média para 6 animais por grupo e estão expressos em mg de glicogênio/g de tecido. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Teste t de Student para amostras independentes).		

Por fim, investigou-se o efeito da administração aguda de frutose sobre as atividades das enzimas do ciclo de Krebs 24 h após a administração desse carboidrato em córtex cerebral de ratos. Os resultados demonstram um aumento da atividade da MDH em córtex cerebral dos animais submetidos ao modelo de frutosemia em comparação com grupo controle. Por outro lado, as atividades das enzimas CS, IDH, SDH e fumarase não foram alteradas pela administração de frutose (Figura 8).

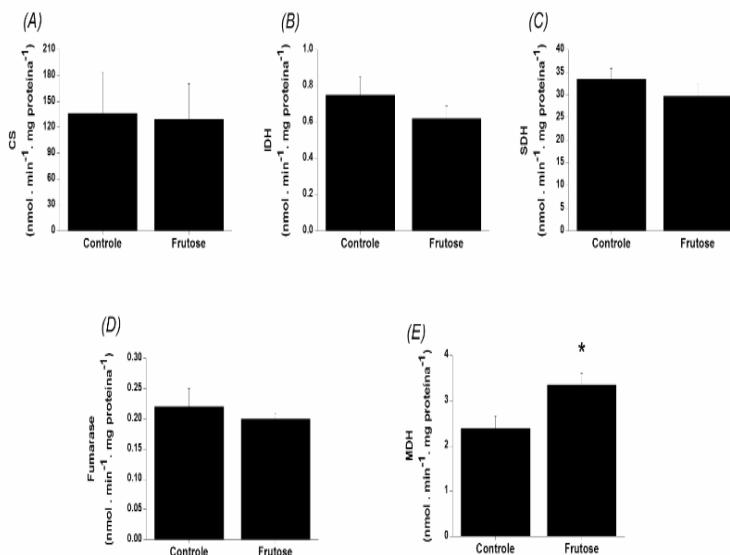


Figura 9. Efeitos da administra\u00e7\u00e3o aguda de frutose sobre as atividades das enzimas (A) citrato sintase (CS), (B) isocitrato desidrogenase (IDH), (C) succinato desidrogenase (SDH), (D) fumarase e (E) malato desidrogenase em c\u00f3rtex cerebral de ratos ap\u00f3s 24 h ap\u00f3s a administra\u00e7\u00e3o de frutose. Os dados representam m\u00e9dias \pm erro padr\u00e3o para n igual 6 animais por grupo e est\u00e3o expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$. * $p < 0,05$ comparados ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes).

5 DISCUSSÃO

A IHF é caracterizada por um aumento importante das concentrações de frutose em tecidos e fluidos biológicos de pacientes (Steinmann et al., 2001). No presente estudo, demonstrou-se um aumento da atividade do complexo I-III da CTE em fígado e uma inibição das atividades dos complexos II e II-III em músculo esquelético de ratos 1 h após a administração de frutose agudamente. Sabe-se que os complexos I e III da cadeia respiratória são os principais geradores de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Dröse e Brandt, 2012). Previamente, foi descrito que a administração aguda de frutose provoca estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens, aumentando os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e o conteúdo de grupos carbonila, ambos marcadores de dano oxidativo, aliados à diminuição da atividade da enzima antioxidante catalase (Lopes et al., 2014). Outros estudos indicaram que a administração aguda de frutose induziu estresse oxidativo em coração e fígado de ratos (Busserolles et al., 2002; Mellor et al., 2010) e que a dieta rica em frutose induz disfunção mitocondrial e apoptose em músculo esquelético (Jaiswal et al., 2015). Neste contexto, ERO geradas em excesso podem causar danos a componentes mitocondriais (Schapira, 1998), inclusive em nível do complexo II (Myers et al., 2010; de Oliveira et al., 2013; Garnol et al., 2014). Assim, não se pode excluir que o estresse oxidativo possa ser um fator que contribua para a inibição relativa dos complexos mitocondriais II e II-III em músculo esquelético de ratos que receberam a frutose agudamente. A administração de frutose também aumentou a atividade de MDH em rim, uma enzima mitocondrial importante envolvida na bioenergética celular. As alterações do metabolismo mitocondrial têm efeitos deletérios sobre a função da célula e sua sobrevivência, especialmente em tecidos altamente dependentes do consumo energético, tais como tecido cerebral e muscular (Cadenas e Davies, 2000). No presente estudo, o músculo esquelético mostrou maior vulnerabilidade durante a administração de frutose em relação a parâmetros bioenergéticos, em comparação com os outros tecidos.

O GLUT5 é expresso principalmente no fígado (Douard e Ferraris, 2008), que possui uma taxa elevada de extração de frutose (Kim et al., 1988), rendendo a acessibilidade de grande parte de frutose ingerida na dieta. Tal fato pode induzir o acúmulo de diacilgliceróis e proteína cinase ativada por mitógeno 8 (MAPK8), o que favorece a inflamação no fígado através da ativação da lipogênese, diminuindo a transdução do sinal da insulina, o que resulta na diminuição da

tolerância à glicose (Chan et al., 2013). Por outro lado, favorece a dislipidemia e a esteatose hepática (Johnson et al., 2007; Yokozawa et al., 2008).

Adicionalmente, avaliou-se o perfil bioquímico do LCR de animais submetidos a um modelo experimental de frutosemia 12 h e 24 h após a administração aguda de frutose. Observou-se que o nível de glicose no LCR não alterou em animais do grupo frutose 12 h e 24 h após a administração de frutose em comparação com o grupo controle. Por outro lado, os níveis de albumina no LCR diminuíram 12 h após a administração de frutose em comparação com o grupo controle. Além disso, 24 h após a administração de frutose, os níveis de albumina, e glicose do grupo frutose em LCR se restabeleceram aos do grupo controle. A diminuição dos níveis dessa proteína observadas em 12 h após a administração de frutose não se pode atribuir à má nutrição já que os níveis de albumina no LCR, diferente de albumina no soro, não estão relacionadas com o estado nutricional do organismo (Wade et al., 1988). Ainda segundo Wade e colaboradores (1988) observaram que ratos em jejum possuíam os níveis de albumina inalterados no LCR, enquanto no soro, os níveis de albumina diminuíram. Monteiro e colaboradores (2012) mostraram que os níveis de albumina no soro não alteraram em 12 h e 24 h após a administração de frutose agudamente.

Outros estudos mostraram que houve a diminuição de albumina no LCR em pacientes afetados por esclerose múltipla e doença de Alzheimer (Hybelova et al., 2009; Ribeiro et al., 2012). Neste estudo os níveis de albumina também diminuíram em córtex cerebral após 12 h após a administração de frutose sendo que essa diminuição poderia ser atribuída à proteólise, o que implicaria na falta de substrato glicose obtido a partir da gliconeogênese. No entanto, esse aspecto pode ser eliminado já que os níveis de glicose no LCR não alteraram neste modelo animal em estudo. Em paciente com frutosemia sempre se observa a hipoglicemia após o consumo de frutose por causa de inibição de enzimas da gliconeogênese, glicolítica e glicogênio fosforilase, mas no modelo animal a glicose no LCR e no soro não alterou por isso sugere-se mais estudos para melhor entender a discrepância da frutosemia em pacientes e em modelo animal.

O colesterol total em LCR é de cerca de 6-7 mg/dL. Tem sido amplamente relatado que a frutose estimula a síntese de lipídios incluindo o colesterol no fígado (Hwang et al., 1987; Hulman e Falkner, 1994; Laville e Nazare, 2009; Tran et al., 2009; Chou et al., 2011), mas ainda existem poucos estudos avaliando esses parâmetros no cérebro. Sugeriu-se que os níveis elevados de colesterol no LCR servem como

marcador de disfunção cognitiva (Leoni et al., 2013; Trushina et al., 2013). Embora pouco conhecido os efeitos de frutose no sistema nervoso central, alguns estudos demonstraram a associação entre o consumo elevado de frutose e um fator de risco significativo para o desenvolvimento de demência (Johnson et al., 2007; Marriott et al., 2009; Stephan et al., 2010). Ainda, estudos pré-clínicos mostraram que uma dieta rica em frutose (60 % de frutose na dieta durante 6 semanas) produziu os efeitos prejudiciais no cérebro de hamsters (Mielke et al., 2005) e prejudicou a memória espacial em ratos (Ross et al., 2009). O aumento dos níveis de colesterol no LCR foi observado também em pacientes afetados por xantomatose cerebrotendínea (Salen et al., 1987; Torres et al., 2010) e em esclerose múltipla (van de Kraats et al., 2014). Os níveis de colesterol no LCR aumentaram em ratos que receberam frutose 12 h após a sua administração em ratos. É possível que o aumento dos níveis do colesterol provocado pela administração de frutose esteja relacionado com a função cognitiva prejudicada que foi encontrada em ratos que se alimentaram com alto teor de frutose (Cao et al., 2007; Stranahan et al., 2008; Ross et al., 2009; Hsu et al., 2014).

Avaliou-se também o efeito da administração aguda de frutose sobre o estado energético no soro de animais e foi observado que a atividade de LDH em soro de animais que receberam frutose não teve diferença significativa quando comparada ao grupo controle. Por outro lado, a administração aguda de frutose aumentou os níveis de lactato em soro de ratos do grupo frutose 12 h após a sua injeção em comparação com o grupo controle. O estudo feito por Monteiro e colaboradores (2012), mostrou que o nível de glicose sérico não alterou em ratos do grupo de frutose. O aumento dos níveis de lactato no soro sem afetar a glicólise sugere a possível disfunção mitocondrial. Tendo em vista que a disfunção mitocondrial aponta o aumento dos níveis de lactato no soro, neste estudo avaliou o efeito da administração aguda de frutose nas atividades de enzimas do ciclo de Krebs em homogeneizados de córtex cerebral, em 24 h após administração de frutose. Observou-se que a atividade de MDH aumentou em córtex cerebral enquanto as atividades de CS, IDH, SDH e fumarase não foram alteradas em animais que receberam frutose em comparação com o grupo controle. O aumento da atividade de MDH mostrou-se também aumentada em cérebro de pacientes afetados pela esquizofrenia e pela doença de Alzheimer, avaliação realizada *post mortem* em regiões afetadas pelo estresse oxidativo (Op den Velde e Stam, 1976; Bubber et al., 2005). Shi e Gibson (2011) demonstram que H_2O_2 aumentou a atividade de MDH nas células hipocámpais pelo aumento do nível de mRNA do gene que

expressa a enzima. Neste contexto, Lopes e colaboradores (2014) demonstraram que a administração aguda de frutose induziu danos oxidativos a lipídeos e a proteínas e alterou as enzimas de defesa antioxidante em córtex cerebral. O aumento de atividade da MDH ainda não é bem conhecido no cérebro. Contudo, especula-se que o aumento dos níveis das atividades da MDH causado pela administração aguda de frutose em córtex cerebral seja induzido pelo estresse oxidativo.

Sabe-se que a MDH é a última enzima do ciclo de Krebs que restaura os níveis de oxaloacetato para permitir a oxidação contínua de acetil-CoA na mitocôndria. Durante esta reação, os equivalentes reduzidos de NADH produzidos no ciclo de Krebs são oxidados no complexo I da cadeia respiratória (Dupourque e Kun, 1969). O MDH participa também na lançadeira de malato-aspartato, no transporte de elétrons de NADH citosólico para matriz mitocondrial para ser oxidado na cadeia respiratória, já que as membranas mitocondriais são impermeáveis a esta coenzima. O aumento da atividade da enzima MDH sem aumento paralelo de outras atividades enzimáticas do ciclo de Krebs pode conduzir ao aumento da relação NADH/NAD⁺, o que poderá levar finalmente ao bloqueio do ciclo de Krebs, já que NAD⁺ também é necessário nas atividades das enzimas IDH e α -KGDH. Esse efeito bioenergético pode influenciar no dano da função cognitiva, na plasticidade sináptica e na neurogênese hipocampal, bem como na perda neuronal causada pela frutose (Cao et al., 2007; Stranahan et al., 2008; Ross et al., 2009; Stephan et al., 2010; Van der Borgh et al., 2011; Rafati et al., 2013). Neste estudo, os níveis de lactato encontraram-se aumentados em soro de animais 12 h após a administração de frutose. Por outro lado, os níveis de glicose em soro não foram alterados 12 h e 24 h após a administração de frutose (Monteiro et al., 2012). Tal resultado é contraditório em relação à hipoglicemia encontrada em pacientes acometidos por IHF. Portanto, são necessários mais estudos para elucidar este efeito.

No presente trabalho, observou-se que a frutose administrada agudamente ocasiona alterações bioenergéticas e bioquímicas em córtex cerebral e tecidos periféricos de animais e que tais efeitos podem ocorrer até 24 h após essa administração. Caso tais achados possam ser extrapolados para a condição humana, poderiam colaborar para o melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos dos danos teciduais apresentados por pacientes afetados pela IHF.

6 CONCLUSÃO

Esse estudo demonstrou que a frutose exerce efeitos neurotóxicos em córtex cerebral de ratos submetidos a um modelo animal de frutosemia. Dados deste estudo indicam que a administração aguda de frutose induz disfunção do metabolismo energético mitocondrial, o que pode contribuir para a patogênese de pacientes com frutosemia. Os dados também sugerem que a toxicidade de frutose pode desempenhar um papel relevante nos sintomas neurológicos observados em pacientes afetados por frutosemia.

REFERÊNCIAS

- Abdelmalek MF, Lazo M, Horska A, Bonekamp S, Lipkin EW, Balasubramanyam A, Bantle JP, Johnson RJ, Diehl AM, Clark JM: Fatty Liver Subgroup of Look AHEAD Research Group. Higher dietary fructose is associated with impaired hepatic adenosine triphosphate homeostasis in obese individuals with type 2 diabetes. *Hepatology*. 2012; 56:952-960.
- Ali M, Rellos P, Cox TMC. Hereditary fructose intolerance. *J Med Genet*. 1998; 35:353-365.
- Ananth N, Pravlenkumar G, Rao KA, Vasantih, Kakkilaya S. Two cases of hereditary fructose intolerance. *Indian J Clin Biochem*. 2003; 18:87-92.
- Asberg C, Hjalmarson O, Alm J, Martinsson T, Waldenström J, Hellerud C. Fructose 1,6-bisphosphatase deficiency: enzyme and mutation analysis performed on calcitriol-stimulated monocytes with a note on long-term prognosis. *J Inherit Metab Dis*. 2010; 33 Suppl 3:S113-121.
- Barreiros RC, Bossolan G, Trindade CEP. Fructose in humans: effects, clinical utilization, and associated inherent errors. *Rev Nutr Campinas*. 2005; 18:377-389.
- Basaranoglu M, Basaranoglu G, Bugianesi E. Carbohydrate intake and nonalcoholic fatty liver disease: fructose as weapon of mass destruction. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2015; 4:109-116.
- Benarroch EE. Brain glucose transporters: implications for neurologic disease. *Neurology*. 2014; 82:1374-1379.
- Berg LK, Fagerli E, Myhre AO, Florholmen J, Goll R. Self-reported dietary fructose intolerance in irritable bowel syndrome: Proposed diagnostic criteria. *World J Gastroenterol*. 2015; 21:5677-5684.
- Beutner G, Eliseev RA, Porter GA Jr. Initiation of electron transport chain activity in the embryonic heart coincides with the activation of mitochondrial complex 1 and the formation of supercomplexes. *PLoS One*. 2014; 9:e113330.

Bjornstad P, Lanaspá MA, Ishimoto T, Kosugi T, Kume S, Jalal D, Maahs DM, Snell-Bergeon JK, Johnson RJ, Nakagawa T. Fructose and uric acid in diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 2015; 58:1993-2002.

Bouteldja N, Timson DJ. The biochemical basis of hereditary fructose intolerance. *J Inher Metab Dis*. 2010; 33:105-112.

Bubber P, Hartounian V, Gibson GE, Blass JP. Abnormalities in the tricarboxylic acid (TCA) cycle in the brains of schizophrenia patients. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2011; 21:254-260.

Busserolles J, Rock E, Gueux E, Mazur A, Grolier P, Rayssiguier Y. Short-term consumption of a high-sucrose diet has a pro-oxidant effect in rats. *Br J Nutr*. 2002; 87:337-342.

Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 2000; 29:222-230.

Cao D, Lu H, Lewis TL, Li L. Intake of sucrose-sweetened water induces insulin resistance and exacerbates memory deficits and amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2007; 282:36275-36282.

Chambers RA, Pratt RT. Idiosyncrasy to fructose. *Lancet*. 1956; 271:340.

Chan SM, Sun RQ, Zeng XY, Choong ZH, Wang H, Watt MJ, Ye JM. Activation of PPAR α ameliorates hepatic insulin resistance and steatosis in high fructose-fed mice despite increased endoplasmic reticulum stress. *Diabetes*. 2013; 62:2095-2105.

Chiaratti de Oliveira A, dos Santos AM, Martins AM, D'Almeida V. Screening for inborn errors of metabolism among newborns with metabolic disturbance and/or neurological manifestations without determined cause. *Sao Paulo Med J*. 2001; 119:160-164.

Choi HW, Lee YJ, Oh SH, Kim KM, Ryu JM, Lee BH, Kim GH, Yoo HW. A novel frameshift mutation of the ALDOB gene in a Korean girl presenting with recurrent hepatitis diagnosed as hereditary fructose intolerance. *Gut Liver*. 2012; 6:126-128.

Chou CL, Lai YH, Lin TY, Lee TJ, Fang TC. Aliskiren prevents and ameliorates metabolic syndrome in fructose-fed rats. *Arch Med Sci.* 2011; 7:882-888.

Coffee EM, Yerkes L, Ewen EP, Tiffany Zee T, Tolan DR. Increased prevalence of mutant null alleles that cause hereditary fructose intolerance in the American population. *J Inherit Metab Dis.* 2010; 33:33-42.

Coffee EM, Tolan DR. Mutations in the promoter region of the Aldolase B gene that cause hereditary fructose intolerance. *J Inherit Metab Dis.* 2010; 33:715-725.

Cox TM. Aldolase B and fructose intolerance. *FASEB J.* 1994; 8:62-71.

Crescenzo R, Bianco F, Coppola P, Mazzoli A, Cigliano L, Liverini G, Iossa S. The effect of high-fat-high-fructose diet on skeletal muscle mitochondrial energetics in adult rats. *Eur J Nutr.* 2015; 54:183-192.

Cui XL, Ananian C, Perez E, Strenger A, Beuve AV, Ferraris RP. Cyclic AMP stimulates fructose transport in neonatal rat small intestine. *J Nutr* 2004; 134:1697-1703.

Cushion MT, Collins M, Hazra B, Kaneshiro ES. Effects of atovaquone and diospyrin-based drugs on the cellular ATP of *Pneumocystis carinii* f. sp. *Carinii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:713-719.

de Oliveira J, Moreira EL, Mancini G, Hort MA, Latini A, Ribeiro-do-Valle RM, Farina M, da Rocha JB, de Bem AF. Diphenyl diselenide prevents cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by hypercholesterolemia in LDL receptor knockout mice. *Neurochem Res.* 2013; 38:2028-2036.

Douard V, Ferraris RP. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 295:E227-237.

Dröse S, Brandt U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 748:145-169.

Dupourque D, Kun E. Malate dehydrogenases of ox kidney. 2. Two substrate kinetic and inhibition analyses. *Eur J Biochem.* 1969; 7:247-252.

Dutra-de-Oliveira JE, Marchini JS. *Ciências Nutricionais.* São Paulo: Sarvier; c2008.

Elliott WC, Cohen LS, Klein MD, Lane FJ, Gorlin R. Effects of rapid fructose infusion in man. *J Appl Physiol.* 1967; 23:865-869.

El Husny AC, Fernandes-Caldato MC. Erros inatos do metabolismo: revisão de literatura. *Rev Para Med.* 2006; 20:41-45.

Eprintsev AT, Fedorin DN, Nikitina MV, Igamberdiev AU. Expression and properties of the mitochondrial and cytosolic forms of aconitase in maize scutellum. *J Plant Physiol.* 2015; 181:14-19.

Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta.* 1985; 153:23-26.

Foster-Powell K, Holt SH, Brand-Miller JC. International table of glycemic index and glycemic load values: 2002. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76:5-56.

Froesch ER. Disorders of fructose metabolism. *Clin Endocrinol Metab.* 1976; 5:599-611.

García-Cazorla A, Wolf NI, Serrano M, Moog U, Pérez-Dueñas B, Póo P, Pineda M, Campistol J, Hoffmann GF. Mental retardation and inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 2009; 32:597-608.

Garnol T, Endlicher R, Kučera O, Drahotka Z, Cervinková Z. Impairment of mitochondrial function of rat hepatocytes by high fat diet and oxidative stress. *Physiol Res.* 2014; 63:271-274.

Gibson GE, Xu H, Chen HL, Chen W, Denton TT, Zhang S. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex-dependent succinylation of proteins in neurons and neuronal cell lines. *J Neurochem.* 2015; 134:86-96.

Hallfrisch J. Metabolic effects of dietary fructose. *FASEB J.* 1990; 4:2652-2660.

Hommes FA. Inborn errors of fructose metabolism. *Am J Clin Nutr.* 1993; 58:788S-795S.

Hoekstra JH, van den Aker JH. Facilitating effect of amino acids on fructose and sorbitol absorption in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1996; 23:118-124.

Hsu TM, Konanur VR, Taing L, Usui R, Kayser BD, Goran MI, Kanoski SE. Effect of sucrose and high fructose corn syrup consumption on spatial memory function and hippocampal neuroinflammation in adolescent rats. *Hippocampus.* 2015; 25:227-239.

Huidekoper HH, Visser G, Ackermans MT, Sauerwein HP, Wijburg FA. A potential role for muscle in glucose homeostasis: in vivo kinetic studies in glycogen storage disease type 1a and fructose-1,6-bisphosphatase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 2010; 33:25-31.

Hulman S, Falkner B. The effect of excess dietary sucrose on growth blood pressure and metabolism in developing Sprague-Dawley rats. *Pediatr Res.* 1994; 36:95-101.

Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, Reaven GM. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension.* 1987; 10:512-516.

Hybelová M, Svatonová J, Sobek O, Adam P, Dolezil D, Adam D. Cerebrospinal fluid and serum prealbumin (transthyretin) in patients with multiple sclerosis (MS): comparison of particular subgroups of MS patients. *Folia Microbiol (Praha).* 2009; 54:173-176.

Jaiswal N, Maurya CK, Arha D, Avisetti DR, Prathapan A, Raj PS, Raghu KG, Kalivendi SV, Tamrakar AK. Fructose induces mitochondrial dysfunction and trigger apoptosis in skeletal muscle cells by provoking oxidative stress. *Apoptosis.* 2015; 20:930-947.

Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang DH, Gersch MS, Benner S, Sánchez-Lozada LG. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the

metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86:899-906.

Jones HF, Burt E, Dowling K, Davidson G, Brooks DA, Butler RN. Effect of age on fructose malabsorption in children presenting with gastrointestinal symptoms. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011; 52:581-584.

Juel C, Hostrup M, Bangsbo J. The effect of exercise and beta-2-adrenergic stimulation on glutathionylation and function of the Na,K-ATPase in human skeletal muscle. *Physiol Rep.* 2015; 3:p11: e12515.

Kim HS, Paik HY, Lee KU, Lee HK, Min HK. Effects of several simple sugars on serum glucose and serum fructose levels in normal and diabetic subjects. *Diabetes Res Clin Pract.* 1988; 4:281-287.

Kim M, Le H, McInerney MJ, Buckel W. Identification and characterization of re-citrate synthase in *Syntrophus aciditrophicus*. *J Bacteriol.* 2013; 195:1689-1696.

Kitto GB. Intra- and extra mitochondrial malate dehydrogenases from chicken and tuna heart. *Meth Enzymol.* 1969; 13:106-116.

Krisman CR. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Anal Biochem.* 1962; 4:17-23.

Labruno P, Chatelon S, Huguet P, Odievre M. Unusual cerebral manifestations in hereditary fructose intolerance. *Arch Neurol.* 1990; 47:1243-1244.

Laville M, Nazare JA. Diabetes, insulin resistance and sugars. *Obes Rev.* 2009; 10:24-33.

Lee I, Huttemann M. Energy crisis: The role of oxidative phosphorylation in acute inflammation and sepsis. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1842:1579-1586.

Lee IK. The role of pyruvate dehydrogenase kinase in diabetes and obesity. *Diabetes Metab J.* 2014; 38:181-186.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5^a ed. São Paulo: Sarvier, c2007.

Leonardi R, Subramanian C, Jackowski S, Rock CO. Cancer-associated isocitrate dehydrogenase mutations inactivate NADPH-dependent reductive carboxylation. *J Biol Chem*. 2012; 287:14615-14620.

Leoni V, Solomon A, Lövgren-Sandblom A, Minthon L, Blennow K, Hansson O, Wahlund LO, Kivipelto M, Björkhem I. Diagnostic power of 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid: candidate marker of brain health. *J Alzheimers Dis*. 2013; 36:739-747.

Li X, Wu F, Beard DA. Identification of the kinetic mechanism of succinyl-CoA synthetase. *Biosci Rep*. 2013; 33:145-163.

Lima WG, Martins-Santos ME, Chaves VE. Uric acid as a modulator of glucose and lipid metabolism. *Biochimie*. 2015; 116:17-23.

Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010; 7:251-264.

Lopes A, Vilela TC, Taschetto L, Vuolo F, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Streck EL, Ferreira GC, Schuck PF. Evaluation of the effects of fructose on oxidative stress and inflammatory parameters in rat brain. *Mol Neurobiol*. 2014; 50:1124-1130.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193:265-275.

Lozinsky AC, Boé C, Palmero R, Fagundes-Neto U. Fructose malabsorption in children with functional digestive disorders. *Arq Gastroenterol*. 2013; 50:226-230.

Lustig RH. Fructose: metabolic, hedonic, and societal parallels with ethanol. *J Am Diet Assoc*. 2010; 110:1307-1321.

Marriott BP, Cole N, Lee E. National estimates of dietary fructose intake increased from 1977 to 2004 in the United States. *J Nutr*. 2009; 139:1228-1235.

MasoudiMotlagh M, Sepehr R, Sheibani N, Sorenson CM, Ranji M. Optical cryoimaging of mitochondrial redox state in bronchopulmonary-dysplasia injury models in mice lungs. *Quant Imaging Med Surg.* 2015; 5:159-162.

Mayatepek E, Hoffmann B, Meissner T. Inborn errors of carbohydrate metabolism. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010; 24:607-618.

Melchior C, Gourcerol G, Déchelotte P, Leroi AM, Ducrotté P. Symptomatic fructose malabsorption in irritable bowel syndrome: A prospective study. *United European Gastroenterol J.* 2014; 2:131-137.

Mellor K, Ritchie RH, Meredith G, Woodman OL, Morris MJ, Delbridge LM. High-fructose diet elevates myocardial superoxide generation in mice in the absence of cardiac hypertrophy. *Nutrition.* 2010; 26:842-848.

Mescam M, Vinnakota KC, Beard DA. Identification of the catalytic mechanism and estimation of kinetic parameters for fumarase. *J Biol Chem.* 2011; 286:21100-21109.

Mielke JG, Taghibiglou C, Liu L, Zhang Y, Jia Z, Adeli K, Wang YT. A biochemical and functional characterization of diet-induced brain insulin resistance. *J Neurochem.* 2005; 93:1568-1578.

Monteiro AA, Biella MS, Bristot SF, Streck EL, Schuck PF, Ferreira GC. Characterization of the biochemical profile in serum of young rats submitted to high concentrations of fructose. *Revista Inova Saúde.* 2012; 1:116-129.

Mortensen OH, Larsen LH, Ørstrup LK, Hansen LH, Grunnet N, Quistorff B. Developmental programming by high fructose decreases phosphorylation efficiency in aging offspring brain mitochondria, correlating with enhanced UCP5 expression. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014; 34:1205-1211.

Myers CR, Antholine WE, Myers JM. The pro-oxidant chromium (VI) inhibits mitochondrial complex I, complex II, and aconitase in the bronchialepithelium: EPR markers for Fe-S proteins. *Free Radic Biol Med.* 2010; 49:1903-1915.

Nelson DL, Cox MM. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 5^aed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 528-538 p.

Nelson DL, Cox MM. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.545-550 p.

Nielsen SM, Hasholt L, Nørremølle A, Josefsen K. Progressive impairment of lactate-based gluconeogenesis in the Huntington's disease mouse model R6/2. *PLoS Curr*. 2015; 7:pii: ecurrents.hd.019b33aae1c519e6e8b68e7cf3e7818e.

Nomura K, Yamanouchi T. The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem*. 2012; 23:203-208.

Nolte JC, Schürmann M, Schepers CL, Vogel E, Wübbeler JH, Steinbüchel A. Novel characteristics of succinate coenzyme A (Succinate-CoA) ligases: conversion of malate to malyl-CoA and CoA-thioester formation of succinate analogues in vitro. *Appl Environ Microbiol*. 2014; 80:166-176.

Nobigrot T, Chasalow FI, Lifshitz F. Carbohydrate absorption from one serving of fruit juice in young children: age and carbohydrate composition effects. *J Am Coll Nutr*. 1997; 16:152-158.

Oberhaensli RD, Rajagopalan B, Taylor DJ, Radda GK, Collins JE, Leonard JV, Schwarz H, Herschkowitz N. Study of hereditary fructose intolerance by use of ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Lancet*. 1987; 2:931-934.

O'Hare MC, Doonan S. Purification and structural comparisons of the cytosolic and mitochondrial isoenzymes of fumarase from pig liver. *Biochim Biophys Acta*. 1985; 827:127-134.

Op den Velde W, Stam FC. Some cerebral proteins and enzyme systems in Alzheimer's presenile and senile dementia. *J Am Geriatr Soc*. 1976; 24:12-16.

Osellame LD, Blacker TS, Duchon MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2012; 26:711-723.

Patel C, Douard V, Yu S, Tharabenjasin P, Gao N, Ferraris RP. Fructose-induced increases in expression of intestinal fructolytic and gluconeogenic genes are regulated by GLUT5 and KHK. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015; 309:R499-R509.

Perheentupa J, Raivio K. Fructose-induced hyperuricaemia. *Lancet*. 1967; 2:528-531.

Plaut GWE. Isocitrate dehydrogenase from bovine heart. In: Lowenstein JM, editor. *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press, 1969. 13 vol. 34-42 p.

Quintana E, Sturiale LR, Monteiro F, Andrade CF, Couce ML, Barone R. Secondary disorders of glycosylation in inborn errors of fructose metabolism. *J Inherit Metab Dis*. 2009; 32:273-278.

Rafati A, Anvari E, Noorafshan A. High fructose solution induces neuronal loss in the nucleus of the solitary tract of rats. *Folia Neuropathol*. 2013; 51:214-221.

Raithel M, Weidenhiller M, Hagel AFK, Hetterich U, Neurath MF, Konturek PC. The Malabsorption of commonly occurring mono and disaccharides. Levels of investigation and differential diagnoses. *Dtsch Arztebl Int*. 2013; 110:775-782.

Rana SV, Malik A. Breath tests and irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol*. 2014; 20:7587-7601.

Rho YH, Zhu Y, Choi HK. The epidemiology of uric acid and fructose. *Semin Nephrol*. 2011; 31:410-419.

Ribeiro CA, Santana I, Oliveira C, Baldeiras I, Moreira J, Saraiva MJ, Cardoso I. Transthyretin decrease in plasma of MCI and AD patients: investigation of mechanism for disease modulation. *Curr Alzheimer Res*. 2012; 9:881-889.

Ross AP, Bartness TJ, Mielke JG, Parent MB. A high fructose diet impairs spatial memory in male rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2009; 92:41041-41046.

Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta*. 1994; 228:35-51.

Salen G, Berginer V, Shore V, Horak I, Horak E, Tint GS, Shefer S. Increased concentrations of cholestanol and apolipoprotein B in the cerebrospinal fluid of patients with cerebrotendinous xanthomatosis. Effect of chenodeoxycholic acid. *N Engl J Med*. 1987; 316:1233-1238.

Sánchez-Gutiérrez JC, Benlloch T, Leal MA, Samper B, Garcia-Ripoli I, Felú JE. Molecular analysis of the aldolase B gene in patients with hereditary fructose intolerance. *J Med Genet*. 2002; 39:56.

Santamaria R, Esposito G, Vitagliano L, Race V, Paglionico I, Zancan L, Zagari A, Salvatore F. Functional and molecular modelling studies of two hereditary fructose intolerance-causing mutations at arginine 303 in human liver aldolase. *Biochem J*. 2000; 350:823-828.

Schapira AH, Mann VM, Cooper JM, Dexter D, Daniel SE, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 1990; 55:2142-2145.

Schapira AH. Inborn and induced defects of mitochondria. *Arch Neurol*. 1998; 55:1293-1296.

Schein V, Kucharski LC, Guerreiro PM, Martins TL, Morgado I, Power DM, Canario AV, da Silva RS. Stanniocalcin 1 effects on the renal gluconeogenesis pathway in rat and fish. *Mol Cell Endocrinol*. 2015; 414:1-8.

Sierotzki H, Scalliet G. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology*. 2013; 103:880-887.

Shi Q, Gibson GE. Up-regulation of the mitochondrial malate dehydrogenase by oxidative stress is mediated by miR-743a. *J Neurochem*. 2011; 118:440-448.

Smith CM, Marks AD, Lieberman M. *Bioquímica Médica Básica de Marks*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007; 238 p.

Song GY, Ren LP, Chen SC, Wang C, Liu N, Wei LM, Li F, Sun W, Peng LB, Tang Y. The effect of high-fat-high-fructose diet on skeletal muscle mitochondrial energetics in adult rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012; 39:1011-1018.

Srere PA. Citrate synthase. *Methods Enzymol.* 1969; 13:3-11.

Steinmann B, Gitzelmann R, Berghe G van den. Disorders of fructose metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 8a ed. New York: McGraw-Hill, c2001. 1489-1520 p.

Steinmann B, Santer R, Berghe G van den. Disorders of fructose metabolism. In: Fernandes J, Saudubray JM, Berghe G van den, Walter JH, editors. *Inborn metabolic diseases.* 4^a ed. Heidelberg: Springer, c2006. 135-142 p.

Stephan BC, Wells JC, Brayne C, Albanese E, Siervo M. Increased fructose intake as a risk factor for dementia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2010; 65:809-814.

Stranahan AM, Norman ED, Lee K, Cutler RG, Telljohann RS, Egan JM, Mattson MP. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus.* 2008; 18:1085-1088.

Taillefer M, Rydzak T, Levin DB, Oresnik IJ, Sparling R. Reassessment of the transhydrogenase/malate shunt pathway in *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 through kinetic characterization of malic enzyme and malate dehydrogenase. *Appl Environ Microbiol.* 2015; 81:2423-2432.

Tappy L, Lê KA. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev.* 2010; 90:23-46.

Tappy L, Mittendorfer B. Fructose toxicity: is the science ready for public health actions? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2012; 15:357-361.

Tappy L, Egli L, Lecoultre V, Schneider P. Effects of fructose-containing caloric sweeteners on resting energy expenditure and energy efficiency: a review of human trials. *Nutr Metab.* 2013; 10:54.

Tommaso AMA. Hepatologia médica - Ciência e ética. Disponível em: www.hepcentro.com.br/fructosemia.html.

Torres PPTS, Vilela TT, Costa FHAA, Carneiro RD, Rocha LG, Teixeira KISS. Cerebrotendinous xanthomatosis: a two-case report. *Radiol Bras.* 2010; 43:133-135.

Tran LT, Yuen VG, McNeill JH. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem.* 2009; 332:145-159.

Trushina E, Persson XM, Mielke MM, Petersen RC. Identification of altered metabolic pathways in plasma and CSF in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease using metabolomics. *PLoS One.* 2013; 8:e63644.

Van de Kraats C, Killestein J, Popescu V, Rijkers E, Vrenken H, Lütjohann D, Barkhof F, Polman CH, Teunissen CE. Oxysterols and cholesterol precursors correlate to magnetic imaging measures of neurodegeneration in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2014; 20:412-417.

Van der Borght K, Köhnke R, Göransson N, Deierborg T, Brundin P, Erlanson-Albertsson C, Lindqvist A. Reduced neurogenesis in the rat hippocampus following high fructose consumption. *Regul Pept.* 2011; 167:26-30.

Vieira FO, Leal Vde O, Stockler-Pinto MB, Barros Ade F, Borges NA, Lobo JC, Mafra D. Fructose intake: is there an association with uric acid levels in nondialysis-dependent chronic kidney disease patients? *Nutr Hosp.* 2014; 31:772-777.

Voet D, Voet JG, Pratt CW. Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular. 2ªed. Porto Alegre: Artmed, c2008. 430-450 p.

Wade S, Bleiberg-Daniel F, Le Moullac B. Rat transthyretin: effects of acute short-term food deprivation and refeeding on serum and cerebrospinal fluid concentration and on hepatic mRNA level. *J Nutr.* 1988; 118:199-205.

Wang YM, Van Eys J. Nutritional significance of fructose and sugar alcohols. *Ann Rev Nutr.* 1981; 1:437-475.

Wilder-Smith CH, Li X, Ho SS, Leong SM, Wong RK, Koay, Ferraris RP. Fructose transporters GLUT5 and GLUT2 expression in adult patients with fructose intolerance. *United European Gastroenterol J.* 2014; 2:14-21.

Wirth S, Klodt C, Wintermeyer P, Berrang J, Hensel K, Langer T, Heusch A. Positive or negative fructose breath test results do not predict response to fructose restricted diet in children with recurrent abdominal pain: results from a prospective randomized trial. *Klin Padiatr.* 2014; 226:268-273.

Xu HN, Zhou R, Moon L, Feng M, Li LZ. 3D Imaging of the mitochondrial redox state of rat hearts under normal and fasting conditions. *Innov Opt Health Sci.* 2014; 7:1350045.

Yang Y, Xiang Y, Xia C, Wu WM, Sun G, Xu M. Physiological and electrochemical effects of different electron acceptors on bacterial anode respiration in bioelectrochemical systems. *Bioresour Technol.* 2014; 164:270-275.

Yokozawa T, Kim HJ, Cho EJ. Gravinol ameliorates high-fructose-induced metabolic syndrome through regulation of lipid metabolism and proinflammatory state in rats. *J Agric Food Chem.* 2008; 56:5026-5032.

ANEXO

ANEXO A- CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 076/2013-2

Professor Responsável: Patrícia Fernanda Schuck.

Equipe: Emílio Luiz Streck, Gustavo da Costa Ferreira, Naithan Ludian Fernandes Costa, Cíntara Ludvig Gonçalves, Tamires Pavei Macan, Abigail Lopes, Mairis Scarabelot Biella, Luciana Rosa, Alexandra Ioppi Zugno, Bruna Klippel Ferreira, Carine Amábilie Guimarães, Felipe Dal Pizzol, Fabricia Cardoso Petronilho, Débora Dall'Igna, Francieli Vuolo, Soliany Grassi Maravai e Thais Ceresér Vilela.

Título: "Investigação de parâmetros bioquímicos em tecidos cerebrais e periféricos de ratos submetidos a altas concentrações de frutose."

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização de 1.140 Ratos heterogênicos Wistar:

5 dias	5g	108
15 dias	30g	258
30 dias	100g	258
60 dias	220g	258
90 dias	350g	258

Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesb.net

The animal research Ethics Committee, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 076/2013-2

Principal Investigator: Patrícia Fernanda Schuck.

Researchers: Emílio Luiz Streck, Gustavo da Costa Ferreira, Naithan Ludian Fernandes Costa, Cíntara Ludvig Gonçalves, Tamires Pavei Macan, Abigail Lopes, Mairis Scarabelot Biella, Luciana Rosa, Alexandra Ioppi Zugno, Bruna Klippel Ferreira, Carine Amábilie Guimarães, Felipe Dal Pizzol, Fabricia Cardoso Petronilho, Débora Dall'Igna, Francieli Vuolo, Soliany Grassi Maravai e Thais Ceresér Vilela.

Project title: "Evaluation of the effects of high concentrations of fructose on biochemical parameters in brain and peripheral tissues of rats."

The project was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/Dropbox/CEUA or by e-mail: ceua@unesb.net.

Criciúma, 16 de outubro de 2013.



*Wilson Heinzen Cardoso
Coordenador Adjunto da CEUA*