

ANDREZZA PINHEIRO BEZERRA DE MENEZES KINOTE

# ATIVAÇÃO DA AMPK HIPOTALÂMICA INDUZIDA POR FRUTOSE AUMENTA A GLICONEOGÊNESE HEPÁTICA E A EXPRESSÃO DE PEPCK NO FÍGADO DE RATOS

# FRUCTOSE-INDUCED HYPOTHALAMIC AMPK ACTIVATION STIMULATES HEPATIC PEPCK AND GLUCONEOGENESIS DUE TO INCREASED CORTICOSTERONE LEVELS OF RATS

CAMPINAS

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Faculdade de Ciências Médicas

ANDREZZA PINHEIRO BEZERRA DE MENEZES KINOTE

# ATIVAÇÃO DA AMPK HIPOTALÂMICA INDUZIDA POR FRUTOSE AUMENTA A GLICONEOGÊNESE HEPÁTICA E A EXPRESSÃO DE PEPCK NO FÍGADO DE RATOS

FRUCTOSE-INDUCED HYPOTHALAMIC AMPK ACTIVATION STIMULATES HEPATIC

PEPCK AND GLUCONEOGENESIS DUE TO INCREASED CORTICOSTERONE

LEVELS OF RATS

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. Gabriel Forato Anhê

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Doutora em Farmacologia

Doctoral Thesis presented to the Pharmacology Program of the Faculty of Medical Sciences, University of Campinas - UNICAMP, for obtainment of the Ph.D. degree in Pharmacology

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR ANDREZZA PINHEIRO BEZERRA DE MENEZES KINOTE E ORIENTADA PELO PROF. DR. GABRIEL FORTAO ANHÊ.

Assinatura do Orientador

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

 Kinote, Andrezza Pinheiro Bezerra de Menezes, 1977 K624a Kivação da AMPK hipotalâmica induzida por frutose aumenta a gliconeogênese hepática e a expressão de PEPCK no fígado de ratos / Andrezza Pinheiro Bezerra de Menezes Kinote. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.
Orientador: Gabriel Forato Anhê. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.
1. Frutose. 2. Proteínas quinases ativadas por AMP. 3. Gluconeogênese. I.

1. Frutose. 2. Proteínas quinases ativadas por AMP. 3. Gluconeogênese. I. Anhê, Gabriel Forato, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Fructose-induced hypothalamic AMPK activation stimulates hepatic PEPCK and gluconeogenesis due to increased corticosterone levels Palavras-chave em inglês: Fructose AMP-Activated protein kinases Gluconeogenesis Área de concentração: Farmacologia Titulação: Doutora em Farmacologia Banca examinadora: Gabriel Forato Anhê [Orientador] Marciane Milanski Ferreira Eliana Pereira de Araújo Camila Aparecida Machado de Oliveira Luciana Chagas Caperuto Data de defesa: 22-01-2014 Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

# BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

ANDREZZA PINHEIRO BEZERRA DE MENEZES KINOTE

Orientador (a) PROF(A). DR(A). GABRIEL FORATO ANHÊ

MEMBROS:
1. PROF(A). DR(A). GABRIEL FORATO ANHÊ
2. PROF(A). DR(A). MARCIANE MILANSKI FERBEIRA
3. PROF(A). DR(A). ELIANA PEREIRA DE ARAÚJO
4. PROF(A).DR(A). CAMILA APARECIDA MACHADO DE OLIVEIRA
5. PROF(A).DR(A). LUCIANA CHAGAS CAPERUTO

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 22 de janeiro de 2014

# DEDICATÓRIA

A minha mãe Amelinha e ao meu marido Cleber.

Significado maior da palavra amor.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me concedeu a vida e o discernimento necessário pra distinguir e escolher os, nem sempre mais fáceis, mas os melhores caminhos. Agradeço pelos desafios que colocastes em minha trajetória, pois deles extraí perseverança, sabedoria e confiança. Agradeço por muitas pessoas que colocastes em minha vida, pois, certamente, todas elas contribuíram para que eu fosse uma pessoa melhor. Hoje, tenho a plena certeza que muito mais tenho a agradecer do que a pedir!

A minha amadíssima mãe Amelinha, que nunca mediu esforços para que eu alcançasse todos os meus objetivos e realizasse todos os meus sonhos. Difícil falar da minha mãe sem me emocionar. Você sempre foi e sempre será a fonte de toda a minha inspiração através da sua força, da sua determinação e, sobretudo, através da sua fé incomparável!

Ao meu marido Cleber. Amor da minha vida, sem você nada disso teria sido possível. Quem seria eu sem o seu amor, carinho, respeito e dedicação. Com você vivenciei a plenitude de uma vida a dois. Obrigada por me apoiar incondicionalmente e estar exatamente no lugar certo e na hora certa sempre que precisei. Obrigada por carregar tantas caixas de ratos, pelas incontáveis idas e vindas ao laboratório nos feriados e fins de semana. Obrigada por dar todo o suporte físico e emocional ao longo dessa grande jornada. Obrigada por permitir que eu faça parte da sua vida!

Aos meus filhos amados Felipe e Laís. Razão da minha vida. É por vocês que eu tento ser uma pessoa melhor. Vocês trouxeram cor e perfume à minha vida.

Aos meus sogros Rudinei e Nilsa. Serei sempre grata pelo amor que sempre me dispensaram. Com vocês aprendi que família a gente também pode escolher. Obrigada por terem me acolhido nessa família abençoada por Deus!

Aos meus queridíssimos padrinhos e, ao mesmo tempo, afilhados e amigos Rosendo e Karla. Obrigada por serem essas pessoas tão especiais em nossas vidas! Rosendo, na qualidade de marido suplente, obrigada pelo apoio operacional com os animais. Karla, você foi sensacional ao me ajudar a tratar camundongos.

Aos amigos Sergio e Patrícia, Eduardo e Regina, Fernando e Giseli. Obrigada por essa preciosa amizade. Impossível não ser feliz ao lado de vocês. Obrigada por tantos momentos prazerosos e longas tardes de puro divertimento. Pessoas como vocês fazem toda a diferença em minha vida!

A minha querida Elza. Obrigada por sua doçura e dedicação à minha família. Aliás, você já faz parte dela. Sem você essa jornada teria sido bem mais difícil.

Ao meu orientador Prof. Gabriel Anhê. Obrigada por me aceitar e me mostrar que uma grande caminhada inicia-se com um primeiro passo. Lembrei de você ao ler a seguinte frase de um autor desconhecido: " A ignorância é sempre atrevida, a sabedoria, em geral, é modesta ". E assim é você, um orientador com um potencial enorme e, acima de tudo, um ser humano simples e cheio de qualidades. Obrigada por tudo!

Sou extremamente grata ao Prof. Licio Velloso por permitir que eu executasse os primeiros experimentos no Laboratório de Sinalização Celular (Labsincel), não se furtando a disponibilizar toda a estrutura do laboratório, bem como, contribuindo diretamente para o meu crescimento científico.

Agradeço a todos do Labsincel e Laboratório de Fisiopatologia e Farmacologia do Diabetes Mellitus (Labffamel) e aos amigos conquistados ao longo de todos esses anos pois, todos, direta ou indiretamente, cada um à sua maneira, fizeram parte desse processo de construção do conhecimento. Obrigada...Ana Paula Barbosa, André Rennó, Andressa Coope, Bruna Bombassaro, Carina Solon, Carolina Mesquita, Daniela Razolli, Danilo Ferreira, Dennys Cintra, Gerson Ferraz, Joseane Morari, Marciane Milanski, Lívia Bitencourt e Lucas Nascimento.

À Carolina Solon. Obrigada pelo apoio e carinho. Impossível não lembrar do início meio desajeitado. Obrigada pela força com os banhos do Felipe quando ele era apenas um pequenino bebê na creche da UNICAMP.

Um agradecimento mais que especial aos meus parceiros Juliana Faria, Letícia de Souza e Thiago Araújo. Até me emociono ao falar de vocês. Vocês foram bem mais que colegas de laboratório. Estiveram presentes nos momentos onde eu mais precisei !!! A nossa amizade ultrapassou as barreiras do laboratório e, sempre os levarei comigo onde quer que eu vá! Valorizo cada momento que passamos juntos, pois, certamente, foram momentos muito especiais. Obrigada pelos almoços, pelos prazerosos lanches da tarde, pela organização dos eventos e pelas infindáveis conversas que só fazem bem a alma. Talvez um dia estaremos cada um em um ponto diferente do país mas, certamente, essa distância será diminuta frente a grandeza da nossa amizade!

Aos bioteristas Miguel e Denise pelo cuidado e dedicação com os animais e, por me atenderem prontamente sempre que necessário!

Finalmente agradeço, pelo financiamento, às agências de fomento à pesquisa: FAPESP e CNPq e também a Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) pela oportunidade concedida, a qual permitiu o desenvolvimento da minha pesquisa.

# EPÍGRAFE

"Abençoados os que possuem amigos, os que os tem sem pedir. Porque amigo não se pede, não se

compra, nem se vende. Amigo a gente sente!".

Machado de Assis



O consumo de frutose causa resistência à insulina e favorece a gliconeogênese hepática através de mecanismos ainda não completamente compreendidos. Estudos recentes demonstraram que a ativação hipotalâmica da proteína quinase ativada por 5'AMP (AMPK) controla as flutuações dinâmicas na produção hepática de glicose. Dessa forma, o presente estudo foi desenhado para investigar se a ativação da AMPK no hipotálamo pela frutose mediaria o aumento da gliconeogênese. Ambos os tratamentos intracerebroventricular (icv) e intraperitonial (ip) com frutose estimularam a fosforilação da AMPK e da acetyl-CoAcarboxilase (ACC) no hipotálamo; em paralelo ao aumento da fosfenolpiruvatocarboxicinase (PEPCK) e gliconeogênese no fígado. Um aumento na fosforilação da AMPK induzida pela frutose icv foi observada no hipotálamo lateral, assim como, nos núcleos paraventricular e arqueado. Esses efeitos foram reproduzidos pelo tratamento icv com 5-amino-imidazole-4-carboxamide-1-β-d-ribofuranoside (AICAR). A inibição da AMPK hipotalâmica através da injeção icv com Composto C ou siRNA para AMPKα2 no hipotálamo mediobasal (HMB) suprimiu os efeitos hepáticos induzidos pela frutose intraperitonial. Ainda, o tratamento com frutose aumentou os níveis de corticosterona através de um mecanismo dependente da ativação hipotalâmica da AMPK. Concomitantemente, a gliconeogênese, a expressão hepática da PEPCK e a ligação do receptor de glicocorticoide no gene da PEPCK foram suprimidos pelo bloqueio farmacológico do receptor de glicocorticoide. Em sua totalidade, os dados agui apresentados suportam a hipótese de que a ativação da AMPK no hipotálamo induzida pela frutose estimula a gliconeogênese hepática através do aumento dos níveis de corticosterona.

# ABSTRACT

Fructose consumption causes insulin resistance and favors hepatic gluconeogenesis through mechanisms that are not completely understood. Recent studies demonstrated that the activation of hypothalamic 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) controls dynamic fluctuations in hepatic glucose production. Thus, the present study was designed to investigate whether hypothalamic AMPK activation by fructose would mediate increased gluconeogenesis. Both ip and intracerebroventricular (icv) fructose treatment stimulated hypothalamic AMPK and acetyl-CoA carboxylase phosphorylation, in parallel with increased hepatic phosphoenolpyruvatecarboxy kinase (PEPCK) and gluconeogenesis. An increase in AMPK phosphorylation by icv fructose was observed in the lateral hypothalamus as well as in the paraventricular nucleus and the arcuate nucleus. These effects were mimicked by icv 5-amino-imidazole-4-carboxamide-1-β-d-ribofuranoside treatment. Hypothalamic AMPK inhibition with icv injection of compound C or with injection of a small interfering RNA targeted to AMPKa2 in the mediobasal hypothalamus (MBH) suppressed the hepatic effects of ip fructose. We also found that fructose increased corticosterone levels through a mechanism that is dependent on hypothalamic AMPK activation. Concomitantly, fructose-stimulated gluconeogenesis, hepatic PEPCK expression, and glucocorticoid receptor binding to the PEPCK gene were suppressed by pharmacological glucocorticoid receptor blockage. Altogether the data presented herein support the hypothesis that fructose-induced hypothalamic AMPK activation stimulates hepatic gluconeogenesis by increasing corticosterone levels.

ACC	Acetil-CoACarboxilase
ADP	Difosfato de Adenosina
AICAR	5-amino-imidazol-4-carboxamida-1-β-d-ribofuranosida
AMP	Monofosfato de Adenosina
AMPK	Proteína Cinase Ativada por 5'AMP
ARQ	Núcleo arqueado
ATP	Trifosfato de Adenosina
AUC	Área sob a curva
CaMKK2	Cinase da proteína dependente da calcio/calmodulina cinase 2
ChIP	Imunoprecipitação de cromatina
CNS	Sistema nervoso central
CTL	Controle
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNL	de novo lipogênese
FOXO1	Forkhead box O (FoxO) transcription factors 1
Fructose-ICV	Frutose intracerebroventricular
Fructose-IP	Frutose intraperitoneal
G6p-ase	Glicose-6-fosfatase
GLP-1	Peptídeo tipo glucagon 1

Glucose-ICV	Glicose intracerebroventricular
GLUT5	Transportador de Glicose 5
GR	Receptor de glicocorticóide
HFCS	Xarope de milho rico em frutose
HMB	Hipotálamo mediobasal
ICV	Intracerebroventricular
IP	Intraperitoneal
IRS1	Substrato do Receptor de Insulina 1
LH	Hipotálamo lateral
LPL	Lipase lipoproteica
PEPCK	Fosfenolpiruvatocarboxicinase
PGC1a	Coativador 1 $\alpha$ do Receptor $\gamma$ Ativado por Proliferador de Peroxissomo
РКС	Proteína cinase C
PPARα	Peroxisome proliferator-activated receptor-a
PTT	Teste de tolerância ao piruvato
PVN	Núcleo paraventricular
TG	Triglicerídeos
Thr	Resíduo de treonina

# SUMÁRIO

	PÁG.
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1 – INTRODUÇÃO GERAL	18
2 – OBJETIVOS	43
3 – CAPÍTULO	
ARTIGO – "Fructose-induced hypothalamic AMPK activation stimulates hepatic PEPCK	
and gluconeogenesis due to increased corticosterone levels.". Endocrinology 2012;	
153(8):3633-45	45
4 – CONCLUSÃO GERAL	59
5 – REFERÊNCIAS	61
6 – APÊNDICE	67
Artigos publicados	68
Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA/Unicamp )	69

# 1 – INTRODUÇÃO GERAL

Segundo a mitologia grega, Perséfones, filha de Zeus e de Demeter (deusa da agricultura) fora raptada por Hades e levada ao mundo subterrâneo. Lá, Hades seduziu-a com uma romã (fruta rica em frutose), desposou-a e a fez sua rainha. Sua mãe inconsolável travou uma busca incessante por sua filha amada e descuidou-se de suas tarefas enquanto deusa. Como Demeter, mãe de Perséfones, não sobreviveria sem a presença da filha, ficou decidido por Zeus que Perséfones ficaria metade do ano junto à sua mãe, caracterizando um período de grande alegria, de terras férteis e época das colheitas (primavera e o verão). Durante a outra metade do ano Perséfones estaria ao lado de Hades no mundo subterrâneo, gerando grande tristeza e frustração em sua mãe. Por causa dessa tristeza, sua mãe chorava e descuidava-se novamente de suas tarefas com a terra, gerando uma época de pouca fertilidade e de muita escuridão (tempo que miticamente representava os meses de mau tempo, o outono e o inverno). Assim como na lenda de Perséfones, segundo a história da criação do mundo, o destino de Adão e Eva e, da humanidade como um todo, foi determinado pela ingestão de uma fruta. Segundo o cristianismo, Adão e Eva comeram o fruto proibido em desobediência a Deus e foram expulsos do Jardim do Éden, dando origem ao pecado original (Figura 1).

Como relatado por Varman T. Samuel (2011), muito embora essas lendas ou histórias bíblicas não estivessem anunciando um presságio contra a frutose contida nestas frutas místicas; nos dias atuais muita atenção tem sido voltada para os perigos reais do consumo excessivo de frutose, uma vez que, alguns autores tem relatado a possibilidade de uma correlação temporal entre o aumento da incidência da obesidade no mundo e o aumento significativo da ingestão de frutose através do consumo de produtos industrializados (Page *et al.*, 2013).



Figura 1. Adão e Eva (Lucas Cranach, 1472)

### Um breve relato sobre a inserção do açúcar na alimentação

Os humanos alimentam-se sobretudo para geração de energia e manutenção das suas necessidades metabólicas. A partir da introdução de alimentos mais palatáveis, em especial, na dieta do mundo ocidental, o ato de alimentar-se passou a ser também um dispositivo de satisfação e agregação social. O sabor adocicado, preferido por muitos indivíduos, tem a capacidade de conferir uma alta palatabilidade aos alimentos, tornando-os extremamente atrativos. Essa atratividade natural pelo "doce" conservada ao longo da evolução do ser humano pode explicar, em parte, o consumo substancial de açúcar nas sociedades modernas. Embora hoje haja um grande consumo de açúcar (em especial de sacarose e frutose na sua forma livre) na dieta ocidentalizada, nem sempre fomos grandes consumidores (Tappy & Lê, 2010).

Durante o período paleolítico quase todo o alimento era proveniente da caça e da pesca, sendo as frutas a única fonte de carboidratos da dieta. Especula-se que a atratividade pelo sabor adocicado data desta época quando o açúcar era extremamente escasso (Tappy & Lê, 2010).

O mel foi utilizado como principal adoçante até as Cruzadas, período no qual os europeus tiveram acesso ao açúcar já então utilizado no Oriente Médio. O consumo de açúcar permaneceu baixo até o século XVIII e passou a ser impulsionado pelo estreitamento das relações comerciais do ocidente com países orientais onde o açúcar proveniente da cana era abundante, assim como, pela melhoria nas técnicas de extração e refinamento do açúcar. Com isso, o açúcar passou a ser mais popularizado, sendo inicialmente extraído e refinado a partir da cana e importado para a Europa e América do Norte. Inicialmente, o açúcar foi consumido como adoçante em chás e cafés, sendo rapidamente utilizado na preparação de alimentos em padarias. Durante a Revolução Industrial na Inglaterra houve um aumento de 1500% no consumo de açúcar e, por volta do século XX, o açúcar tornou-se o maior constituinte da dieta ocidental (Licht, 2005).

A sacarose era o açúcar predominantemente consumido nesta época, sendo utilizadas pequenas quantidades de glicose e frutose provenientes de frutas. A partir do desenvolvimento da indústria alimentícia e das técnicas de extração do amido de milho, tornou-se economicamente viável a sua hidrólise à glicose e posterior conversão a frutose através de isomerização enzimática (Marshall, 1957). Esse avanço tecnológico possibilitou a produção de adoçantes derivados do milho, em especial, o xarope de milho rico em frutose (HFCS) (White, 2008). A grande capacidade adoçante do HFCS, associada às suas propriedades organolépticas e ao seu baixo custo, contribuíram para o aumento do seu consumo, o que foi acompanhado por uma redução gradativa do consumo da sacarose. Enquanto praticamente ausente há alguns anos atrás, a frutose hoje assume um papel central como o açúcar mais consumido nas dietas modernas, sendo predominantemente encontrada sob a forma de sacarose (frutose ligada a glicose) ou na sua forma livre presente no HFCS, o mais popular adoçante utilizado pela população norte-americana (Tappy & Lê, 2010).

Os açúcares provenientes da dieta são representados em parte por sacarose (dissacarídeo formado por glicose e frutose em razões iguais) e pelo HFCS (45% de glicose/ 55% de frutose), um adoçante bastante utilizado também na indústria alimentícia (Ventura *et al.*, 2011). Do ponto de vista energético as moléculas de glicose e frutose têm o mesmo valor calórico, muito embora o corpo tenha uma compreensão diferenciada desses dois carboidratos; condição essa que origina discussões sobre seus papéis individuais na obesidade e na síndrome metabólica (Lustig, 2010).

Como o metabolismo da frutose não depende da ação da insulina e induz apenas um aumento pequeno na glicemia sanguínea, a frutose surgiu como uma nova alternativa de adoçantes em substituição à sacarose para uso em indivíduos diabéticos. Porém, o aumento da ingestão diária de frutose causou efeitos metabólicos adversos, sendo reconhecida a sua associação com o aumento das concentrações plasmáticas de triglicerídeos (TG), esteatose hepática e intolerância a glicose (Havel, 2005).

Com base em uma série de estudos epidemiológicos, foi publicado por Tappy & Lê que adolescentes e adultos jovens são os principais consumidores de frutose e, considerando todas as faixas etárias, o refrigerante continua sendo a principal fonte desse açúcar. Entre 1999 e 2004 nos Estados Unidos, a média de consumo per capta de frutose foi estimada em 70 g/dia e o consumo de HFCS representou 42% do consumo total de adoçantes em detrimento a 16% nos anos de 1977 e 1978. A partir desses registros, foi evidenciado um aumento substancial do consumo de frutose ao longo das últimas quatro décadas, especialmente por parte de adolescentes e adultos jovens de ambos os sexos e que os refrigerantes são a principal fonte de frutose na dieta ocidentalizada (Tappy & Lê, 2010).

O consumo de frutose livre (sob a forma de HFCS) aumentou dramaticamente entre 1970 e 2007 e muitos autores tem sugerido que o consumo excessivo de frutose possa estar relacionado ao

desenvolvimento de obesidade e síndrome metabólica (Samuel, 2011; Lyssiotis & Cantley, 2013). De fato, tanto em roedores quanto em humanos, alguns estudos mostram que as dietas ricas em frutose levam a acúmulo ectópico de lipídeos no fígado e mais tardiamente no músculo (Havel, 2005, Lê &Tappy, 2007).

Através de um estudo multicêntrico realizado no Brasil, foi evidenciado que o consumo de bebidas ricas em açúcar representou 37% e 45% do total de calorias provenientes da ingestão de líquidos para os grupos com idade compreendida entre 3-6 anos e 7-10 anos, respectivamente, o que foi acompanhado por uma diminuição da ingestão de leite. Entre adolescentes (11-17 anos) a maior parte da ingestão de frutose deu-se a partir do consumo de refrigerantes, representando 42% do total de calorias ingeridas a partir de líquidos. Frente a esta realidade muitos autores alertam para os efeitos adversos do consumo excessivo de açúcar e o risco de obesidade em crianças e adolescentes (Feferbaum *et al.*, 2012).

A frutose tem despertado interesse por parte de muitos grupos de pesquisa e muito se tem discutido sobre o papel desse nutriente no desenvolvimento de doenças metabólicas, uma vez que, nas últimas décadas, houve um aumento substancial do consumo de frutose seja através da sacarose ou HFCS (Tappy *et al.*, 2010; Samuel, 2011).

Há documentado um número substancial de estudos que demonstram que o excesso de frutose estimula a síntese de ácidos graxos e triglicerídeos, resultando em obesidade e muitas características da síndrome metabólica em modelos animais e humanos. De uma perspectiva evolucionária, a conversão facilitada de frutose à gordura talvez possa ter sido vantajosa em períodos de pouca disponibilidade de alimentos. No entanto, no mundo ocidental atual, a disponibilidade de alimentos é mantida em qualquer época do ano e sugere-se que a gordura estocada a partir da ingestão excessiva de frutose tenha passado a desempenhar um papel que

ultrapassa os limites da necessidade energética, tendo um impacto negativo sobre a saúde humana (Stanhope & Havel, 2008; Lyssiotis & Cantley, 2013).

#### Frutose, obesidade e resistência à insulina

Ao longo do último século, o aumento da prevalência de obesidade e diabetes tem sido atribuída em grande parte a um estilo de vida cada vez mais sedentário e à disseminação de uma dieta ocidentalizada excessivamente rica em gordura e açúcar (Chen *et al.*, 2011). Ainda, o aumento crescente do sobrepeso, obesidade e doença metabólica relacionada pode ser também resultante da falta de contrabalanço desta dieta nutricionalmente pobre e rica em calorias por uma atividade física adequada (Hirahatake *et al.*, 2011).

Avanços no crescimento industrial e no processamento de alimentos tem tornado disponíveis para o consumo diário uma infinidade de alimentos com alta palatabilidade, no entanto, nutricionalmente deficientes e com altos teores lipídicos e glicídicos (Stanhope & Havel, 2009; Stanhope & Havel, 2010).O consumo de refeições fora do ambiente domiciliar tem sido associado ao aumento da aquisição de energia através da ingestão excessiva de alimentos ricos em açúcar e gordura, e a associação entre este tipo de alimentação e o aumento do índice de massa corporal tem sido evidenciada por muitos grupos de pesquisa (Boutelle *et al.*, 2007).

Nos Estados Unidos o consumo de frutose aumentou mais que 25% entre 1970 e 1997 (Elliott *et al.*, 2002). Durante o mesmo período a prevalência de obesidade aumentou dramaticamente em paralelo à introdução do HFCS e ao aumento consequente do consumo de frutose. Em 1997 e 1998, o consumo total de frutose, seja adicionada ou a partir de fontes naturais,

foi estimado em 97 g/pessoa/dia nos Estados Unidos e 83 g/pessoa/dia na Suíça, respectivamente (Elliott *et al.*, 2002; Aeberli *et al.*, 2013).

De fato, parece haver uma relação temporal entre o aumento do consumo de frutose através do uso disseminado do HFCS e o aumento do número de pessoas com sobrepeso e obesidade no mundo (Figura 2). Em humanos, isolar a contribuição individual de um único componente da dieta para a obesidade é uma tarefa difícil, mas há um número significativo de evidências que apontam a frutose como um possível contribuidor para o aumento da obesidade e do risco para Diabetes Mellitus tipo II (Hirahatake *et al.*, 2011, Purnell & Fair, 2013).



Figura 2. Ingestão de HFCS versus prevalência de indivíduos obesos. (Adaptado de Bray et al, 2004).

Se comparada à glicose, a ingestão de grandes quantidades de frutose está mais associada a taxas aumentadas da *de novo* lipogênese (DNL) e aumento de lipídeos circulantes em humanos (Basciano *et al*, 2005; Collison *et al*, 2009; Stanhope *et al*, 2009).

Participantes de um estudo submetidos à dieta rica em frutose *ad libitum* exibiram um ganho de peso maior em relação ao grupo submetido à dieta controle (Sievenpiper *et al.,* 2012). De forma

consistente, pesquisas em modelos animais também mostraram que, quando comparada à glicose, a frutose inserida na dieta ou injetada diretamente nos centros reguladores do apetite no hipotálamo induziu um aumento da ingestão alimentar e do ganho de peso (Miller *et al.*, 2002; Jurgens *et al.*, 2005; Lane & Cha, 2009).

Através de estudos que quantificam as variações de fluxo sanguíneo cerebral de maneira não-invasiva como medida de atividade foi demonstrado que o sinal cerebral gerado em resposta à ingestão de frutose em indivíduos sadios foi diferente do sinal gerado nos indivíduos que ingeriram glicose, sendo concomitantemente associado a uma menor sensação de saciedade. Esses achados dão suporte ao conceito de que quando o cérebro humano é exposto à frutose, vias neurobiológicas que regulam o apetite são moduladas e resultam em aumento da sensação de fome, o que deve contribuir em parte para o aumento da ingestão alimentar (Page *et al.*, 2013).

Quando um determinado nutriente, tal como a frutose, promove alterações que resultam em aumento do ganho de peso, muita atenção se volta para a questão do aumento da ingestão de calorias. No entanto, um ponto importante a ser considerado é a diminuição da sensação de saciedade já bem demonstrada em diversos estudos com frutose, visto que, a fome e a saciedade são os maiores determinantes do quanto um indivíduo come e a falta desse equilíbrio não pode ser ignorada na gênese da obesidade (Page *et al.*, 2013).

Uma série de estudos recentes tem fornecido uma base sólida para a hipótese de que a frutose possa ter contribuído para o aumento alarmante da incidência de obesidade no mundo, em especial na população norte-americana. Muitos grupos de pesquisa sugerem que a ingestão excessiva de açúcar, em particular de frutose, pode ter uma contribuição importante não só para o aumento dos casos de obesidade, mas também para o aumento da incidência de diabetes (de Koning *et al.*, 2011).

Algumas condições experimentais sugerem que a frutose seja capaz de causar intolerância a glicose e resistência a insulina, embora através de mecanismos ainda não completamente elucidados. Tem-se proposto que esses mecanismos estejam relacionados a ação lipogênica da frutose e independam do ganho de peso ou aumento da ingestão calórica embora o entendimento desses mecanismos ainda não sejam consenso na literatura (Johnson *et al.*, 2009).

Como dito anteriormente, a frutose pode estar associada à indução de resistência a insulina, em parte através de mecanismos associados à obesidade. Uma hipótese seria de que o acúmulo de triglicerídeos no fígado induzido pelo consumo excessivo de frutose resultaria em ativação da proteína cinase C (PKC) e resistência hepática à insulina. (Stanhope & Havel, 2008). Além disso, o aumento de ácidos graxos livres circulantes poderia resultar em aumento da captação de lipídeos no músculo e em outros tecidos, o que poderia contribuir para a resistência periférica a insulina (Johnson *et al.*, 2009).

Como consequência do aumento da lipogênese no fígado, a frutose proveniente da dieta poderia promover o desenvolvimento de esteatose hepática, o que resultaria em resistência hepática a insulina, uma característica chave do Diabetes Mellitus tipo II (Samuel, 2011).

Voluntários do sexo masculino não obesos foram submetidos a protocolos experimentais de ingestão de bebidas contendo diferentes açúcares em diferentes concentrações (40 ou 80 g/dia de frutose; 80 g/dia de glicose ou 80 g/dia de sacarose). Neste estudo foi observado que, mesmo em quantidades relativamente pequenas de frutose, houve uma diminuição significante da sensibilidade hepática à insulina com supressão incompleta da produção hepática de glicose por este hormônio. Em contraste, a sensibilidade à insulina no tecido muscular não foi alterada. Adversamente a outros estudos, não foram observados aumento das concentrações circulantes de ácidos graxos ou deposição ectópica de gordura. Segundo os autores, os mecanismos que suportam esses efeitos permanecem desconhecidos mas podem envolver a estimulação da gliconeogênese hepática ou devem estar relacionados a lipotoxicidade hepática (Aeberli *et al.*, 2013). Vários outros estudos em humanos corroboram com esses resultados (Faeh *et al.*, 2005; Stanhope *et al.*, 2009).

Em humanos não-obesos, foi descrito que o consumo de frutose associa-se a diminuição da sensibilidade à insulina e aumento da produção hepática de glicose de jejum (Le *et al.*, 2009). Em roedores, também têm sido admitida uma correlação entre dietas ricas em frutose e resistência hepática à insulina (Ragheb *et al.*, 2008) ou aumento da gliconeogênese hepática (Rajasekar & Anuradha, 2007). A gliconeogênese hepática é um componente importante do aumento da taxa de produção endógena de glicose, atuando em conjunto com a resistência periférica à insulina para promover a hiperglicemia de jejum em pacientes diabéticos (Basu *et al.*, 2013).

De forma aparentemente controversa, há evidências demonstrando que a suplementação crônica com quantidades moderadas de frutose não causam deposição ectópica de lipídeos e resistência a insulina em humanos sadios, sugerindo que os efeitos da frutose possam ser decorrentes de mecanismos independentes de sua capacidade de induzir aumento de adiposidade ou resistência a insulina (Lê *et al*, 2006). Embora tenha sido sugerido que dietas contendo grandes quantidades de frutose induzam resistência hepática à insulina e aumentem os níveis de produção de glicose como conseqüência da esteatose hepática, o mecanismo exato, através do qual possa haver o aumento da gliconeogênese hepática não está ainda claramente elucidado (Nagai *et al.*, 2009, Samuel, 2011).

#### Frutose:aspectos gerais

Ao longo das últimas quatro décadas o aumento da ingestão de frutose através de bebidas adoçadas artificialmente e alimentos processados tem sido proposto como fator contribuidor para muitas desordens metabólicas (Lyssiotis & Cantley, 2013). Essa afirmativa não é universalmente aceita, uma vez que, alguns pesquisadores sugerem que os efeitos adversos resultantes do consumo excessivo de frutose possam ser atribuídos ao excesso de calorias ingeridas, assim como seria frente a ingestão excessiva de qualquer outro carboidrato. Muito embora, a glicose e a frutose tenham o mesmo valor calórico, esses açúcares são metabolizados diferentemente. Contribuindo para um melhor entendimento dessa questão, estudos recentes investigam o papel do metabolismo da frutose na obesidade e síndrome metabólica em um modelo animal incapaz de metabolizar frutose, dando suporte à teoria de que o consumo excessivo de frutose tem efeitos tóxicos próprios (Ishimoto *et al*, 2013; Lanaspa *et al.*, 2013).

## Metabolismo da frutose

A frutose é absorvida no intestino via transportadores específicos (GLUT5), sendo grande parte captada primariamente pelo fígado. Embora seja preferencialmente metabolizada a nível celular pela frutocinase, poucas quantidades de frutose podem também ser metabolizadas pela hexocinase (Van den Berghe, 1986).

Embora a glicose e a frutose tenham a mesma fórmula química e sejam caloricamente idênticas, o metabolismo destes dois açúcares difere marcadamente em muitos pontos importantes (Dekker *et al.*, 2010).

Após absorção, a frutose presente no sistema portal é rapidamente captada pelo fígado, onde é metabolizada a frutose-1-fosfato pela ação da frutocinase e então metabolizada a triosefosfato através da enzima aldolase B. A frutocinase exibe uma grande afinidade e especificidade pela frutose, o que contribui para o seu rápido metabolismo hepático. A entrada da glicose na via glicolítica é regulada pela glicocinase ou hexocinase, enzima que apresenta uma alta afinidade pela glicose. Na célula, a glicose é então fosforilada a glicose-6-fosfato e convertida a frutose-6-fosfato, que por sua vez, é convertida a frutose-1,6-difosfato, reação catalisada pela fosfofrutocinase. A atividade da fosfofrutocinase pode ser inibida pelo trifosfato de adenosina (ATP) e citrato. Dessa maneira, a captação de glicose pelo fígado pode ser regulada e limitada pelo estado energético celular (Tornheim & Lowenstein, 1976) e isso faz com que quantidades substanciais de glicose presentes na veia porta não sejam captadas pelo fígado e alcancem a circulação sistêmica, contribuindo para o aumento da glicemia sanguínea e estimulando a secreção de insulina (Teff *et al.*, 2009).

Diferentemente da glicose, a frutose é um estímulo pobre para a secreção de insulina e o seu metabolismo é um processo rápido e não sofre modulação negativa por parte do ATP ou citrato. Em paralelo, esse processo resulta em um maior consumo de ATP e consequente diminuição da razão ATP/AMP nas células hepáticas (Tappy *et al*, 2010).

Como consequência da ausência da modulação negativa exercida pelo estado energético celular, a maior parte da frutose ingerida como parte de uma refeição é rapidamente convertida a triose fostafo. Esses substratos podem ser convertidos a glicose ou lactato e liberados na corrente sanguínea, convertidos em glicogênio hepático ou serem utilizados na *de novo lipogênese* para formação de triacilglicerol (Havel *et al.*, 2005).

Em geral, a glicose é utilizada diretamente pelo tecido muscular e cérebro como fonte energética e o excesso de glicose é estocado no músculo e fígado sob a forma de glicogênio, podendo também ser convertido a frutose através da via do poliol. Como grande parte da frutose é metabolizada pelo fígado e a sua conversão a frutose-1-fosfato não sofre ação da modulação negativa por parte do estado energético celular que previne a síntese de lipídeo e estimula a síntese de glicogênio a partir da glicose, quantidades substanciais de frutose são desviadas para a biossíntese de ácidos graxos e triglicerídeos (Lustig, 2010; Stanhope *et al.*, 2009).

## Efeitos metabólicos da frutose

Uma das características metabólicas da frutose mais evidenciadas na literatura é a sua capacidade de estimular potencialmente a lipogênese. Embora haja muitas evidências experimentais apontando o caráter lipogênico da frutose, os mecanismos moleculares através dos quais isso ocorre permanecem ainda não totalmente elucidados (Samuel, 2011).

Contribuindo para os seus efeitos lipogênicos, a frutose pode ativar fatores de transcrição que ativam genes envolvidos na *de novo lipogênese* (DNL) e inibir a oxidação de lipídeos (Faeh *et al.*, 2005).

Em modelos animais, as dietas ricas em frutose quase que invariavelmente levaram ao aumento dos níveis circulantes de triglicerídeos e deposição ectópica de gordura no fígado e, mais tardiamente, no tecido muscular (Tappy & Lê, 2010). Em roedores foi demonstrado que a frutose na água de beber (10% m/v) reduziu a atividade do PPARα, inibindo a oxidação de lipídeos e contribuindo para o aumento do conteúdo hepático de gordura. Essas alterações não foram observadas nos animais que receberam glicose nas mesmas condições, embora ambos os carboidratos tenham induzido uma resposta similar sobre a expressão de fatores de transcrição e enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos (Roglans *et al.*, 2007).

Alguns estudos sugerem que após uma refeição rica em glicose, há aumento da atividade da lipase lipoproteica (LPL) induzida pela ação da insulina e aumento da captação de triglicerídeos (TG)

pelo tecido adiposo subcutâneo. Interessantemente, após uma refeição rica em frutose, grande parte da frutose ingerida é captada pelo fígado e apenas pequenas quantidades alcançam a circulação sistêmica, resultando apenas em um pequeno aumento da glicemia e da insulinemia. Isso resultaria em menor atividade da LPL, menor captação de TG no tecido adiposo subcutâneo e maior captação de TG no tecido adiposo visceral. Ainda, o aumento da captação hepática de frutose aumentaria a produção de substratos lipogênicos que favoreceriam a *de novo lipogênese* (Stanhope & Havel, 2010).

Apesar da frutose apresentar um baixo índice glicêmico e consequentemente não contribuir eficientemente para o aumento da secreção de insulina, alguns autores associam as dietas ricas em frutose à hiperglicemia e hiperinsulinemia de jejum por mecanismos ainda não elucidados. Especulase que o aumento do conteúdo hepático de lipídeos e a formação de diacilglicerol possa ativar a proteína cinase C (PKC), resultando em fosforilação em serina do substrato do receptor de insulina 1 (IRS1) e inibição da via de sinalização da insulina no fígado (Stanhope *et al.*, 2009).

Indivíduos obesos ou com sobrepeso submetidos a dieta controlada e ingestão de solução rica em glicose ou frutose (correspondendo a 25% da necessidade energética) por 10 semanas exibiram aumento do peso corporal e da massa gorda corporal. A despeito do ganho de peso similar evidenciado entre os dois grupos, os indivíduos que consumiram frutose exibiram um aumento significante do tecido adiposo visceral e da DNL. Ainda, os níveis circulantes de glicose e de insulina de jejum apresentaram-se aumentados somente no grupo tratado com frutose. Como muitos efeitos adversos foram observados apenas no grupo tratado com frutose, acredita-se que estes efeitos não possam ser atribuídos unicamente ao ganho de peso ou ao excesso de calorias ingeridas, levando-se em consideração que essas duas condições foram igualmente observadas no grupo tratado com glicose (Stanhope *et al.*, 2009).

O tratamento com frutose na água de beber por 9 semanas induziu um aumento intracelular das concentrações de corticosterona no tecido adiposo, o que foi acompanhado por uma redução significante dos níveis proteicos do receptor de glicocorticoide (GR) no citoplasma e por um aumento paralelo do GR no núcleo. Após ligação da corticosterona e translocação do GR para o núcleo celular, o mesmo é responsável por regular a taxa transcricional de genes-alvo e reprimir a sua própria síntese de maneira hormônio dependente (Bursác *et al.*, 2013). Um gene-alvo importante do GR é a PEPCK, uma enzima primariamente implicada na gliconeogênese e também envolvida na regulação do metabolismo de lipídeos (Olswang *et al.*, 2003).

Muitas questões relevantes considerando o papel da frutose na patogênese de muitas alterações metabólicas permanecem parcialmente respondidas (Tappy *et al*, 2010), havendo ainda uma grande disparidade de resultados e a falta de consenso sobre os efeitos da frutose *per se*. Com base nessas considerações, surge a necessidade de uma investigação mais ampla sobre os efeitos da frutose e suas implicações sobre o metabolismo, em especial sobre a regulação da homeostase glicêmica, enfatizando o sistema nervoso central como um possível sítio através do qual a frutose possa promover parte dos seus efeitos adversos.

## AMPK e metabolismo energético

#### Estrutura e função da AMPK

A maioria das funções realizadas pelas células requer energia, sendo esta proveniente da hidrólise do ATP a ADP e fosfato. Com a diminuição da energia celular, o aumento relativo das concentrações é sempre muito maior para AMP do que para ADP, embora a concentração absoluta de AMP permaneça menor que de ADP. Nas células eucariontes a AMPK assume um papel

fundamental, garantindo um equilíbrio perfeito entre aquisição e gasto de energia (Hardie *et al.*, 2012).

A AMPK é uma proteína com atividade seriltreonilcinase que responde às flutuações nos níveis energéticos celulares, atuando como um verdadeiro sensor energético para a manutenção da homeostase na célula (Schimmack *et al.*, 2006).

É formada por um complexo heterotrimérico, consistindo das subunidades  $\alpha$  ( $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 2),  $\beta$  ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3) e  $\gamma$  ( $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2 e  $\gamma$ 3) ) (Figura 3). A subunidade  $\alpha$  possui o sítio catalítico da enzima, sendo a isoforma  $\alpha$ 1 encontrada primariamente no citosol e a isoforma  $\alpha$ 2 encontrada em ambos citosol e núcleo. Acredita-se que essas diferenças de localização entre essas isoformas resultem em funções celulares diferentes. As subunidades regulatórias  $\beta$  e  $\gamma$  são responsáveis pela estabilidade do complexo como um todo. Alguns estudos tem demonstrado que a subunidade  $\beta$  possui um sítio de reconhecimento e ligação a moléculas de glicogênio, podendo este último ser capaz de inibir a atividade da AMPK após a sua ligação. A subunidade  $\gamma$  possui sítios importantes para ligação da AMP, a qual regula alostericamente a atividade da AMPK (Schimmack *et al.*, 2006).



Figura 3. Estrutura heterotrimérica da AMPK composta das subunidades  $\alpha$ ,  $\beta \in \gamma$  (Adaptado de Schimmack et al., 2006)

Os genes codificadores dessas subunidades são extremamente conservados em todas as espécies eucarióticas cujas sequências do genoma foram completadas, incluindo vertebrados e invertebrados. Alguns estudos relatam que esses genes codificadores são essenciais para uma resposta metabólica em situações de pouca disponibilidade de alimento e, ainda, estão envolvidos na regulação do crescimento em períodos alternados do ciclo claro/escuro em plantas verdes primitivas. Interessantemente, como a falta de luz representa uma condição de pouca disponibilidade de nutrientes (uma vez que a planta é incapaz de produzir carboidratos pela fotossíntese) e nesta condição há o aumento da atividade da AMPK, esta proteína tem sido entendida como um complexo sistema responsável pela aquisição de energia em estados metabólicos negativos (Towler & Hardie, 2007).

#### Ativação e regulação da AMPK

Com a função de manter a homeostasia energética, a AMPK é responsável por inibir vias anabólicas consumidoras de energia e ativar vias catabólicas que possam promover a geração de ATP. Agentes promotores de stress a nível celular, tais como, exercício, isquemia e hipóxia reduzem a disponibilidade dos estoques dos fosfatos de alta energia. Assim, o aumento resultante da razão AMP/ATP ativa a AMPK através de mecanismos que envolvem a ativação alostérica de sua molécula e fosforilação da sub-unidade  $\alpha$  pelas cinases da AMPK (AMPKKs). A fosforilação da sub-unidade  $\alpha$  da AMPK em resíduos de treonina 172 (Thr172) é o principal mecanismo responsável pelo aumento da sua atividade catalítica (Schimmack *et al.*, 2006).

A atividade cinase do complexo  $\alpha\beta\gamma$  é instantaneamente aumentada pelo aumento nas concentrações celulares de AMP. A subunidade catalítica da AMPK contem um domínio kinase

Ser/Thr no terminal amino. Em todas as espécies, a atividade do complexo aumenta em mais de cem vezes quando o resíduo Thr172 é fosforilado por algumas cinases. Em mamíferos, as cinases mais importantes são o complexo LKB1-STRAD-MO25 (supressor de tumor) e a CaMKK2. O complexo LKB1-STRAD-MO25 fornece um alto nível basal de ativação que é modulado pela ligação da AMP na subunidade γ, estimulando a fosforilação e inibindo a desfosforilação. Embora a ativação alostérica seja induzida apenas por AMP, tem sido discutido que os efeitos sobre a fosforilação e desfosforilação também sejam provocados por ADP. Como ambos AMP e ADP ligam-se a subunidade γ da AMPK e ADP é usualmente presente na célula em quantidades maiores que AMP, ADP pode ser o sinal ativador chave que promove a fosforilação da AMPK (Thr172) em processos moderados de stress. No entanto, a ativação alostérica induzida por AMP seria capaz de amplificar essa ativação durante um stress mais severo. A complexidade desse mecanismo possibilita uma resposta gradativa da atividade da AMPK em resposta a uma ampla escala de níveis de stress (Hardie *et al*, 2012).

Os efeitos de AMP ou ADP sobre o estado de fosforilação no resíduo Thr172 são resultado de sua ligação e ativação alostérica da AMPK e independem de cinases ou fosfatases que fosforilem ou desfosforilem esse resíduo (Gowans *et al.*, 2013; Hardie *et al*, 2012).

#### AMPK e homeostasia glicêmica

A glicose é metabolizada por todas as células do organismo humano, especialmente por eritrócitos e neurônios do sistema nervoso central, os quais tem preferência absoluta por esse nutriente. Em virtude do seu papel central no metabolismo energético como combustível primário para aquisição de energia celular, a glicose sanguínea é entendida como um indicador importante do estado energético global. Os níveis de glicose circulantes são rigorosamente mantidos por um complexo e integrado sistema endócrino que envolve principalmente a ação da insulina e do glucagon (hormônios pancreáticos que regulam a captação, síntese e estoque de glicose (Wahren & Ekberg, 2007).

Em virtude da sofisticação dos sistemas endócrinos que controlam a homeostase glicêmica em mamíferos através do equilíbrio entre a ação da insulina, do glucagon e de outros hormônios contra-regulatórios, a privação de glicose não é considerado um evento fisiológico aceitável. Muitas evidências vem apontando que o sistema nervoso central, em particular o hipotálamo, monitora os níveis sanguíneos de glicose e modula a aquisição e o gasto de energia (Blouet *et al.*, 2010).

Nesse contexto, a AMPK, expressa ubiquamente nas células de mamíferos, assume uma grande importância fisiológica, tanto periférica quanto centralmente, uma vez que está envolvida na resposta a uma grande variedade de condições metabólicas que desequilibram a homeostase energética celular, especialmente condições associadas a um aumento da demanda de energia. Alguns estudos recentes demonstram que alguns hormônios e sinais extracelulares possuem a capacidade de modular a AMPK, tanto central quanto perifericamente, com o intuito de preservar a homeostase glicêmica (Towler & Hardie, 2007).

As concentrações circulantes de glicose refletem um equilíbrio entre a produção endógena de glicose e a captação de glicose pelo tecido muscular esquelético. Sob condições de jejum, esse equilíbrio é mantido em especial pela diminuição da captação muscular de glicose e pelo aumento da produção endógena de glicose em especial pela gliconeogênese hepática. Alguns hormônios, tais como glucagon, são capazes de iniciar a ativação de programas catabólicos no fígado que resultam em aumento da gliconeogênese hepática via ativação indireta do coativador 1α do receptor y ativado por proliferador de peroxissomo  $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ). No estado alimentado, a insulina silencia a atividade transcricional e a expressão hepática da PGC-1 $\alpha$  via fosforilação da AKT e subsequente fosforilação do FOXO1 (Herzig *et al.*, 2001, Puigserver *et al.*, 2003).

A hiperglicemia de jejum característica do diabetes tipo II resulta do aumento da produção hepática de glicose como consequência da resistência hepática à insulina. Nesse contexto, algumas evidências indicam que a ativação periférica da AMPK pode ser um mecanismo efetivo na redução deste quadro. Alguns compostos, tais como, AICAR (Vincent *et al.*, 1991) e metformina (Zhou *et al*, 2001) são capazes de inibir a gliconeogênese em hepatócito de rato. Além disso, foi demonstrado em hepatócitos que o efeito inibitório da metformina sobre a produção de glicose foi revertido através do tratamento com Composto C (um inibidor seletivo da AMPK), indicando que a AMPK perifericamente tem um efeito supressor direto sobre a produção hepática de glicose (Zhou *et al*, 2001).

Em ratos obesos Zucker, a ativação da AMPK *in vivo* por AICAR diminui a produção hepática de glicose e aumenta a captação muscular de glicose (Bergeron *et al*, 2001) Em camundongos *ob/ob* resistentes à insulina, a ativação crônica da AMPK por AICAR reduz efetivamente a glicemia sanguínea (Song *et al*, 2002).

Foi demonstrado que a ativação periférica da AMPK induzida por AICAR foi capaz de mimetizar os efeitos da insulina sobre a expressão dos genes para PEPCK e glicose-6-fosfatase (G6P-ase) em hepatomas de ratos (Lochhead *et al.*, 2000). A ativação da AMPK no fígado resulta em diminuição da produção de glicose. Camundongos com deleção da subunidade catalítica da AMPK no fígado exibiram resistência ao efeito hipoglicemiante da ativação da AMPK induzida por AICAR (Viollet *et al.*, 2009).

Além da importância da AMPK em órgãos periféricos, foi demonstrado por Yang e colaboradores que a ativação da AMPK hipotalâmica aumenta a produção de glicose *in vivo*, colocando esta enzima no centro de um sistema de comunicação inter-órgãos que favorece a produção hepática de glicose durante os períodos de baixa disponibilidade de energia. Neste trabalho, foi evidenciado que tanto a inibição farmacológica quanto a inibição molecular da AMPK no hipotálamo resultaram em diminuição da produção de glicose (Yang *et al.*, 2010).

Em adição ao papel central da AMPK sobre a produção de glicose, foi evidenciado que a ativação da AMPK no hipotálamo modula a resposta contra-regulatória induzida por hipoglicemia através do aumento dos níveis circulantes de corticosterona (Han *et al.*, 2005). Concordantemente, foi demonstrado que o aumento do glucagon, das catecolaminas e da corticosterona na circulação como uma resposta contra-regulatória frente à hipoglicemia, foi evitada pelo tratamento icv com composto C ou pela expressão de uma forma negativa dominante da AMPK, demonstrando que a ativação de AMPK na região do hipotálamo provoca a secreção da corticosterona a partir da glândula supra-renal (Han *et al.*, 2005; McCrimmon *et al.*, 2008).

O aumento dos níveis circulantes de corticosterona podem estimular a gliconeogênese hepática através de um mecanismo que envolve a estimulação direta da expressão da fosfenolpiruvato carboxicinase (PEPCK), que é uma enzima reguladora chave na gluconeogênese e tem locais de ligação para o receptor de glucocorticóide no seu promotor (Faber *et al.*, 1993).

## Efeitos diferenciais da glicose e frutose no sistema nervoso central

O controle neural da ingestão alimentar é regulada por uma rede complexa de sinais orexigênicos e anorexigênicos que convergem para populações distintas de neurônios no hipotálamo (Dzamko & Steinberg, 2009). O hipotálamo é formado por uma grande número de núcleos, incluindo os núcleos arqueado, paraventricular, ventromedial, dorsomedial e a área hipotalâmica lateral. Muitas dessas regiões são responsáveis pela produção de neuropeptídios orexigênicos e anorexigênicos que participam da modulação da ingestão alimentar e do gasto energético (Willians *et al.*, 2000; Pimentel *et al*, 2013).

Esse sistema regulatório é modulado por uma conexão direta entre sistema nervoso central e tecidos periféricos. Nesse cenário, há evidências de que o hipotálamo monitora os níveis de glicose sanguínea, sendo capaz de interpretar sinais hormonais e nutricionais da periferia para regular a ingestão alimentar e o gasto energético (Lane & Cha, 2009).

Em adição às diferenças relacionadas ao metabolismo hepático, a glicose e a frutose metabolizadas centralmente exibem efeitos inversos sobre a via de sinalização hipotalâmica AMPK/malonil-CoA, sendo sugerido um possível mecanismo de ação através do qual a frutose, e não a glicose, possa contribuir para o aumento da ingestão alimentar. A glicose, o principal combustível utilizado pelo cérebro, é um indicador do estado energético e o seu metabolismo central induz saciedade. O mecanismo proposto para esse efeito supressor da fome baseia-se no fato de que a metabolização da glicose no sistema nervoso central promove um aumento da razão ATP/AMP, contribuindo para a desfosforilação e inativação da AMPK no hipotálamo. Como AMPK fosforila e inativa a ACC, a inativação da AMPK resultaria em aumento da ativação da ACC, e como consequência disso, haveria um aumento nas concentrações hipotalâmicas de Malonil-CoA (Cha *et al.*, 2008). O aumento das concentrações de Malonil-Co-A está associado a supressão da ingestão alimentar através da modulação da expressão de neuropeptídios orexigênicos e anorexigênicos no hipotálamo (Hu *et al.*, 2003; Wolfgang & Lane, 2011; Wolfgang & Lane, 2006).

Consistente com esse cenário foi demonstrado que a administração central de glicose aumenta os níveis hipotalâmicos de malonil-CoA, diminui a expressão de neuropeptídios orexigênicos, aumenta a expressão de neuropeptídios anorexigênicos, suprimindo a ingestão alimentar. Ao contrário dos efeitos induzidos pela glicose no sistema nervoso central, a frutose causou uma diminuição rápida nos níveis de ATP, aumento da fosforilação/ativação da AMPK e da fosforilação/inativação da ACC e diminuição dos níveis de Malonil-CoA no hipotálamo, sugerindo que a frutose inicia uma cascata de eventos que culmina com o aumento da ingestão alimentar através dessa via de sinalização (Lane & Cha, 2009).

Através da análise de neuroimagens captadas por ressonância magnética funcional, foi demonstrado recentemente em humanos sadios que a glicose e a frutose exibem efeitos diferentes sobre a circulação sanguínea de regiões cerebrais implicadas na regulação do apetite. A resposta hipotalâmica induzida pela glicose e frutose diferiram marcadamente após 15 minutos subsequentes à sua ingestão. Em relação às condições basais e comparativamente aos efeitos induzidos pela glicose, a ingestão de frutose resultou em uma menor redução do fluxo sanguíneo no hipotálamo e níveis séricos mais baixos de insulina, glicose e GLP-1. Neste trabalho também foi demonstrado em roedores que a infusão endovenosa de frutose induz aumento da sua concentração plasmática, o que foi acompanhado por uma maior concentração de frutose no hipotálamo ventromedial. Esse efeito não foi observado após infusão endovenosa de solução salina. Em corroboração com esses dados, foi identificada no hipotálamo a expressão gênica do GLUT5 e da cetohexocinase, a maquinaria necessária para o metabolismo da frutose (Page *et al.*, 2013).

Concordantemente com esses resultados, alguns trabalhos demonstram que a frutose pode ser metabolizada no hipocampo (Shu *et al.*, 2006) e em neurônios do cerebelo (Funari *et al*, 2005), assim como, mostram a habilidade da frutose em atravessar a barreira hemato-encefálica (Thurston, 1972). Esses dados corroboram com a hipótese de que, quando o cérebro humano é exposto a frutose seja proveniente da dieta ou injetada diretamente no sistema nervoso central, vias neurobiológicas envolvidas na regulação do apetite e de outras funções metabólicas possam estar moduladas.

Como as dietas ricas em frutose estão associadas a quadros de hiperglicemia de jejum sem necessariamente haver uma correlação com a existência de resistência a insulina e, ainda, como numerosas evidências experimentais dão suporte a hipótese de que a frutose possa atravessar a barreira hemato-encefálica e ativar a AMPK no hipotálamo, nosso estudo objetivou testar a hipótese de que a ativação da AMPK no hipotálamo induzida pela frutose possa sinalizar ao fígado através da modulação dos níveis de corticosterona, contribuindo para o aumento da produção hepática de glicose.



## **Objetivo Geral**

Investigar os mecanismos moleculares pelos quais a ativação hipotalâmica da AMPK induzida pela frutose estimula a expressão da PEPCK e a gliconeogênese no fígado.

# **Objetivos Específicos**

Avaliar:

- Os efeitos do tratamento intraperitonial de frutose sobre a ativação da AMPK no hipotálamo e aumento da expressão da PEPCK e G6P-ase no fígado.

 Os efeitos do tratamento intracerebroventricular de frutose sobre a ativação da AMPK no hipotálamo e aumento da expressão da PEPCK e G6P-ase no fígado.

 As repercussões da ativação da AMPK hipotalâmica induzida pela frutose sobre a gliconeogênese hepática.

 - A modulação da expressão da PEPCK e G6P-ase no fígado pela ativação e inibição farmacológica da AMPK no hipotálamo.

 A modulação da gliconeogênese hepática pela ativação e inibição farmacológica da AMPK no hipotálamo.

 Os efeitos da inibição traducional da AMPK no hipotálamo sobre a expressão da PEPCK e G6P-se, assim como, sobre a gliconeogênese hepática.

- A participação dos hormônios contra-regulatórios corticosterona, glucagon e catecolaminas sobre o aumento da gliconeogênese hepática induzidas pala ativação da AMPK hipotalâmica pela frutose.

 O efeito do bloqueio farmacológico do receptor de glicocorticoide sobre a reversão dos efeitos induzidos pela frutose.



# Fructose-Induced Hypothalamic AMPK Activation Stimulates Hepatic PEPCK and Gluconeogenesis due to Increased Corticosterone Levels

Andrezza Kinote, Juliana A. Faria, Erika A. Roman, Carina Solon, Daniela S. Razolli, Letícia M. Ignacio-Souza, Carolina S. Sollon, Lucas F. Nascimento, Thiago M. de Araújo, Ana Paula L. Barbosa, Camilo Lellis-Santos, Licio A. Velloso, Silvana Bordin, and Gabriel F. Anhê

Departments of Pharmacology (A.K., J.A.F., C.S.S., T.M.d.A., A.P.L.B., G.F.A.), and Internal Medicine (E.A.R., C.S., D.S.R., L.M.I.-S., L.F.N., L.A.V.), Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, 13084-971 Campinas, SP, Brazil; and Department of Physiology and Biophysics (C.L.-S., S.B.), Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, 05508-900 Sao Paulo SP, Brazil

Fructose consumption causes insulin resistance and favors hepatic gluconeogenesis through mech- anisms that are not completely understood. Recent studies demonstrated that the activation of hypothalamic 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) controls dynamic fluctuations in hepatic glucose production. Thus, the present study was designed to investigate whether hypothalamic AMPK activation by fructose would mediate increased gluconeogenesis. Both ip and intracere- broventricular (icv) fructose treatment stimulated hypothalamic AMPK and acetyl-CoA carboxylase phosphorylation, in parallel with increased hepatic phosphoenolpyruvate carboxy kinase (PEPCK) and gluconeogenesis. An increase in AMPK phosphorylation by icv fructose was observed in the lateral hypothalamus as well as in the paraventricular nucleus and the arcuate nucleus. These effects were mimicked by icv 5-amino-imidazole-4-carboxamide-1-[3-D-ribofuranoside treatment. Hypothalamic AMPK inhibition with icv injection of compound C or with injection of a small interfering RNA targeted to AMPKa2 in the mediobasal hypothalamus (MBH) suppressed the hepatic effects of ip fructose. We also found that fructose increased corticosterone levels through a mechanism that is dependent on hypothalamic AMPK activation. Concomitantly, fructose-stimulated gluconeogenesis, hepatic PEPCK expression, and glucocorticoid receptor binding to the PEPCK gene were suppressed by pharmacological glucocorticoid receptor blockage. Altogether the data presented herein support the hypothesis that fructose-induced hypothalamic AMPK activation stimulates hepatic gluconeogenesis by increasing corticosterone levels.

Frarely present in the human diet as a single nutrient. Human exposure to dietary fructose results mainly from the consumption of sucrose (fructose-glucose) and highfructose corn syrup. High-fructose corn syrup currently represents the most popular sweetener in the United States, and its consumption, along with the incidence of obesity and diabetes, is continuously increasing (1). In nonobese humans, fructose consumption was described as reducing insulin sensitivity and increasing fasting hepatic glucose output (2). In rodents, fructose-enriched diets have been demonstrated to cause hepatic insulin resistance (3) and to increase gluconeogenesis (4).

Gluconeogenesis is an important component of the increased rate of hepatic glucose production, acting together with peripheral insulin resistance to promote hyperglycemia in diabetic patients (5). Although it has been suggested that diets containing high amounts of fructose induce hepatic insulin resistance and increase glucose levels as a consequence of hepatic steatosis, the exact mechanism leading to increased gluconeogenesis has not been clearly described (6-8).

Among its several extrahepatic actions, fructose was recently demonstrated to stimulate food intake by increasing the activation of hypothalamic 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) (9). AMPK is a major sensor of cellular energy status and is activated by increases in the AMP to ATP ratio (10). Peripheral AMPK activation switches on metabolic processes that increase ATP levels, such as free fatty acid oxidation by adipose tissue and liver and glucose uptake by skeletal muscle (11, 12). Some of these alterations are secondary to acetyl-CoA carboxylase (ACC) phosphorylation that reduces the synthesis of malonyl-CoA (12).

In addition to the importance of AMPK in peripheral organs, Yang et *al.* (13) have recently demonstrated that the activation of hypothalamic AMPK increases hepatic gluconeogenesis, placing this enzyme at the center of an interorgan communication system that favors hepatic glucose production during periods of low fuel availability.

We presently demonstrate the importance of fructosestimulated hypothalamic AMPK activation for the up-regulation of hepatic gluconeogenesis. In addition, our study collects compelling evidence that favors the hypothesis that fructose-induced AMPK activation in the mediobasal hypothalamus (MBH) signals the liver by modulating corticosterone levels.

#### **Materials and Methods**

### Surgical procedures and treatments

Male Wistar rats weighing approximately 180 g were obtained from the Animal Breeding Center at the University of Campinas (Campinas, Brazil) and housed under a 12-h light, 12-h dark cycle (lights on at 0700 h and lights off at 1900 h) with free access to food and water. Rats were anesthetized with diazepam and ketamine (respectively, 2) mg/kg and 50 mg/kg) and stereotaxically cannulated using a stereotaxic apparatus to fix a stainless steel cannula into the lateral ventricle. Stereotaxic coordinates were 0.2 mm anteroposterior, 1.5 mm lateral, and 4.0 mm depth. The localization of the cannula was tested by evaluating the drinking response to intracerebroventricular (icv) angiotensin II injection 1 wk after surgery (14). Cannulas were also implanted in the MBH using the following the coordinates: 3.1 mm posterior of bregma, 0.4 mm lateral, and 9.6 mm depth. Localization of the cannula was confirmed

by blue staining of the hypothalamic region (bregma -3.0) after an injection with Bromophenol Blue (Supplemental Fig. 1, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at http://endo.endojournals.org).

Intracerebroventricular glucose or fructose injections and ip fructose injections were performed for 5 d, three times a day (at 0700, 1200, and 1700 h). Fructose and glucose were diluted to a final concentration of 200 mg/ml and injected (2 mg/kg of body weight) in a final volume of 2 fLl (daily dosage of 6 mg/kg). The control (CTL) animals received an equal volume of 0.9% NaCl. For ip injections, fructose was diluted to a final concentration of 4 mg/ml and injected (2 mg/kg of body weight) in a final volume of 100 fLl (daily dosage of 6 mg/kg). The CTL animals received an equal volume of a solution containing 0.9% NaCl.

Treatment with 5-amino-1-[3-D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide (AICAR) (catalog no. 2840; Tocris, Bristol, UK) occurred for 5 d (2 fLl/d of a 16 mM solution). CTL animals received an equal volume of a solution containing 0.9% NaCl. The AMPK activator A769662 (catalog no. 3336; Tocris) was diluted to a final concentration of 0.2 mm using 2% ethanol as the vehicle; 2 fLl of this solution was injected daily for 5 d. Compound C (catalog no. 171260; EMD4 Biosciences, Gibbstown, NJ) was diluted in 5% dimethylsulfoxide (DMSO) to a final concentration of 200 fLm. An equal volume (2 fLl) of either compound C or its vehicle was injected daily for 5 d. RU486 was diluted in ethanol 99% to a concentration of 62.5 mg/ml. This solution was diluted 1:5 in 0.9% NaCl and injected at a final dose of 20 mg/kg daily for 5 d. Twenty percent ethanol was used as vehicle.

AICAR, compound C, A769662, or their vehicles were injected at 0800 h through the icv cannula. RU486 or its vehicle was injected at 0800 h sc. In all protocols, food was removed after the last injection (fifth day) to allow a 13-h fast before euthanasia.

The small interfering RNA (siRNA) targeted to AMPKa2 (catalog no. 155985) and scrambled siRNA (catalog no. 37007) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) were complexed with jetSI/DOPE (catalog no. 403-05; Polyplus Transfection SA, Ilkrich, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 200 pmol of the siRNA was diluted in 50 fLl of a solution containing 5% glucose, 0.2 mM jetSI, and 0.4 mM L-alpha-Phosphatidylethanolamine, Dioleoyl. Two microliters of the mixtures containing either the siRNA to AMPKa2 (siRNA-AMPKa2) or the scrambled siRNA (scrambled siRNA) were injected through the cannula positioned in the MBH at the first, third, and fifth day of the ip fructose treatment. Western blot analysis of hypothalamic extracts

revealed the ability of the siRNA to knock down AMPKa2 with no compensatory increase of AMPKa1.

All experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation and were approved by the State University of Campinas Committee for Ethics in Animal Experimentation.

#### Intraperitoneal pyruvate tolerance test (PTT)

Rats were fasted for 13 h, and a sodium pyruvate solution (250 mg/ml) was injected ip at a dosage of 2 g/kg. Glucose was determined in blood extracted from the tail before (0 min) and 15, 30, 90, and 120 min after pyruvate injection. The area under the curve (AUC) of glycemia *vs.* time was calculated using each individual baseline (basal glycemia) to estimate the total glucose synthesized from pyruvate. We have previously demonstrated that gluconeogenesis accounts for the increase in glucose levels using 3-mercaptopicolinic acid, an inhibitor of gluconeogenesis, 30 min before pyruvate injection (15).

#### Protein extraction and immunoblotting

Anesthetized rats were decapitated, and the hypothalamus and a fragment of the liver (approximately 100 mg) were removed and processed for Western blotting as previously described (15). The primary antibodies used were as follows: anti-pAMPKa1/2 (Thr 172) and anti-phosphorylated (p) ACC (Ser 79) from Cell Signaling Technology (Danvers, MA), anti-[3-actin from Abcam (Cambridge, UK), anti-AMPKa1, anti-AMPKa2, and anti-ACC from Millipore (Billerica, MA), and anti-glucose-6phosphatase (G6Pase) and anti-phosphoenolpyruvate carboxy kinase (PEPCK) from Santa Cruz Biotechnologies. Secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) were used, followed by chemiluminescent detection of the bands on x-ray-sensitive films. Optical densitometry of the films was performed using the Scion Image analysis software (Scion Corp., Frederick, MD).

#### Immunofluorescent staining

The central nervous system (CNS) from rats treated with icv fructose and their CTL were removed and processed for immunofluorescent staining as previously described (16). Antibodies used were anti-pAMPKa1/2 (Thr 172) (catalog no. 2535) or anti-pACC (Ser 79) (catalog no. 3661) from Cell Signaling Technology. Secondary fluorescein isothiocyanate-conjugated antibody was used to visualize pAMPKa and pACC staining. A separate set of sections from were stained only with the secondary antibody (omission of the primary antibody) to assure specificity of the fluorescent signals (Supplemental Fig. 2). Images were acquired in high (X400) and low (X200) magnification.

#### Hormone measurements

Trunk blood was collected, and the plasma was stored with heparin for glucagon and corticosterone determination and with EDTA for epinephrine and norepinephrine determination. Glucagon (catalog no. 297-57101; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), corticosterone (catalog no. 402810; Neogen, Lexington, KY), and catecholamines (catalog no. E-6500; Rocky Mountains, Colorado Springs, CO) were quantified by ELISA according to the manufacturer's instructions.

#### Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

Liver fragments for the ChIP assay were processed as previously described (17). After DNA shearing, samples were precleared for 1 h at 4 C with protein A-Sepharose saturated with salmon sperm DNA. An aliquot of 10 fLl was collected as input. The remaining supernatants were immunoprecipitated with protein A-Sepharose and 2 fLg of anti-glucocorticoid receptor (GR) antibody (Santa Cruz Biotechnologies). In parallel, one sample was incubated only with protein A-Sepharose to generate the negative control. DNA extracted from the Sepharose pellets was subjected to cross-linking reversal and purification using phenol-chloroform. DNA samples were amplified for detection of the PEPCK gene. A 179-bp fragment flanking bases 164 – 342 of the rat *PEPCK* gene was amplified by real-time PCR. The sequences of the primers were sense 5'-TGGTCTGGACTTCTCTGCCAAG-3' and antisense 5'-GGATGACACCCTCCTCCTGC-3' (annealing at 62 C). To check the primer specificity (by estimated product length), reaction products were resolved in an ethidium bromide-agarose gel. The GR binding was calculated after normalization to the input of each sample.

#### Statistical analysis

The results are presented as the means  $\pm$  se. Comparisons were performed using an unpaired Student's *t* test or one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer *post hoc* testing when appropriate (INStat; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Values of *P* < 0.05 indicate a significant difference.

#### **Results**

# Intraperitoneal fructose treatment activates AMPK in the hypothalamus and increases hepatic PEPCK expression and gluconeogenesis

Intraperitoneal pyruvate load induced a higher increase in blood glucose in rats treated with ip fructose (FructoseIP) when compared with CTL. This effect was best observed 90 min after pyruvate injection (1.23-fold higher than CTL; P < 0.05) (Fig. 1A). The AUC for Fructose-IP was 1.82-fold higher than CTL animals (P < 0.05) (Fig. 1B). The increase in glucose production induced by fructose was not paralleled by changes in body weight gain or food intake (Supplemental Fig. 3, A and B, respectively).

Figure 1C shows that levels of AMPKa1, AMPKa2, and ACC proteins were unchanged by fructose treatment. Figure 1, D and E, shows that Fructose-IP treatment increased levels of both hypothalamic AMPKa and ACC phosphorylation, respectively (2.05- and 1.59-fold higher than CTL, respectively; P < 0.05). We also found increased PEPCK levels in liver of Fructose-IP-treated ani-

A 140-В 130 5000 Glucose (mg/dL) AUC (mg.dL<sup>-1</sup>.min) 120 4000 110 3000 100 2000 90 1000 80 0 CTL Fructose 15 30 90 120 min Ó IP С D Е 1.5 1.5 pAMPKc/B-actin ρΑΜΡΚα pACC/B-actin 1.0 1.0 AMPKa1 AMPKa2 pACC 0. 0.5 ACC β-actin 0.0 0.0 **CTL** Fructose **CTL** Fructose IP IP F G 1.0 PEPCK/B-actin PEPCK β-actin 0.0 CTL Fructose

**FIG. 1.** Intraperitoneal fructose treatment increases gluconeogenesis, hepatic PEPCK, and activates hypothalamic AMPK. Wistar rats were treated with ip fructose (Fructose-IP) or 0.9% NaCl (CTL). Treated rats were fasted for 13 h and subjected to an ip pyruvate tolerance test. Glycemia was measured before and 15, 30, 90, and 120 min after pyruvate injection. The *full line with open squares* represents the CTL group, and the *full line with closed triangles* represents the Fructose-IP group (A). The AUC was calculated for each individual animal within the CTL and Fructose-IP groups (B). CTL and Fructose-IP rats were anesthetized, and the hypothalamus and a fragment of the liver were removed and processed for Western blotting. Membranes containing hypothalamic protein samples were probed with antibodies against AMPKa1, AMPKa2, ACC, pAMPKa, pACC, and [3-actin (C). The data for pAMPKa (D) and pACC (E) were normalized to [3-actin. Membranes containing liver protein extracts were probed with antibodies against PEPCK and [3-actin (F). The data for PEPCK (G) were normalized to [3-actin. The results are shown as the mean  $\pm$ s. \*, *P* < 0.05 vs. CTL (n **§** 5).

IP

mals (1.54-fold higher than CTL; P < 0.05) (Fig. 1G). G6Pase expression was not altered by ip fructose treatment (data not shown). Hepatic ACC phosphorylation was also unchanged in Fructose-IP animals (Supplemental Fig. 4).

# Chronic icv treatment with fructose, but not glucose, activates AMPK in the hypothalamus and increases hepatic PEPCK expression and gluconeogenesis

To test whether the effects of ip fructose resulted from its direct action in the hypothalamus, we next performed icv fructose injections (Fructose-ICV). An additional group received equimolar amounts of glucose to exclude the hyperosmolarity effects (Glucose-ICV). Fructose-ICV but not Glucose-ICV displayed increased mean glucose levels 60 min after pyruvate injection (1.37-fold higher than CTL, P < 0.05; Fig. 2A) and significantly increased AUC (1.90fold higher than CTL; P < 0.05) (Fig. 2B). In addition, Fructose-ICV rats, but not Glucose-ICV, displayed increased levels of fasting glycemia (Supplemental Fig. 5A). Fructose-ICV rats showed no changes in body weight gain but increased values for food intake (Supplemental Fig. 5, B and C, respectively). Fructose-ICV rats did not show a decrease in whole-body insulin sensitivity. Glucose-ICV rats, instead, became insulin resistant, as revealed by the insulin tolerance test (Supplemental Fig. 5D).

Fructose-ICV and Glucose-ICV rats exhibited no changes in their hypothalamic AMPKa1, AMPKa2, and ACC levels (Fig. 2C). Fructose-ICV rats, but not Glucose-ICV, presented higher levels of both AMPKa and ACC phosphorylation (2.08- and 1.87-fold



FIG. 2. Intracerebroventricular fructose but not glucose treatment increases gluconeogenesis and hepatic PEPCK and activates hypothalamic AMPK. Wistar rats were subjected to lateral ventricle cannulation. One week after surgery, rats received icv injections with fructose, glucose, or CTL (0.9% NaCl as vehicle). Treated rats were fasted for 13 h and subjected to an ip pyruvate tolerance test. Glycemia was measured before and 15, 30, 60, 90, and 120 min after pyruvate injection. The dashed line with open squares represents the CTL rats, the full line with open circles represents the glucose-treated rats, and the full line with closed triangles represents the fructose-treated rats (A). The AUC was calculated for each individual animal within the CTL, glucose, and fructose groups (B). the CTL, glucose, and fructose rats were anesthetized, and the hypothalamus and a fragment of the liver were removed and processed for Western blotting. Membranes containing the hypothalamus samples were probed with antibodies against AMPKa1, AMPKa2, ACC, pAMPKa, pACC, and [3-actin (C). The data for pAMPKa (D) and pACC (E) were normalized to [3-actin. Membranes containing liver samples were probed with antibodies against PEPCK and [3-actin (F). The data for PEPCK (G) were normalized to [3-actin. The results are shown as the mean  $\pm$  sE. \*, P < 0.05 vs. CTL (n 🏟 6).

higher than CTL, respectively; P < 0.05) (Fig. 2, D and E, respectively). We also found that hepatic PEPCK expression was up-regulated exclusively in Fructose-ICV rats (1.33-fold higher than CTL; P < 0.05) (Fig. 2G), whereas G6Pase levels were unchanged (data not shown). ACC phosphorylation was not altered in the liver of Fructose-ICV rats (Supplemental Fig. 6).

# Pharmacological hypothalamic AMPK activation increases hepatic PEPCK expression and gluconeogenesis

Intracerebroventricular treatment with the AMPK activator A769662 increased glucose synthesis from pyruvate, as evidenced by increased mean glycemic levels 30 min after pyruvate load (1.48-fold higher than ethanol 2%, P < 0.05; Fig. 3A) and increased AUC (1.57-fold higher than ethanol 2%, P < 0.05; Fig. 3B). Similarly, AMPK activation with icv AICAR resulted in higher mean glycemic values 90 min after the pyruvate load (1.38fold higher than CTL, P < 0.05; Fig. 3C) and an increased AUC (3.67-fold higher than CTL, P < 0.05; Fig. 3D).

AICAR administered through icv injection did not change AMPKa1, AMPKa2, or ACC levels (Fig. 3E) but increased hypothalamic AMPKa and ACC phosphorylation to 1.66- and 2.82-fold the values of the CTL (P <0.05) (Fig. 3, F and G, respectively). Moreover, icv AICAR increased levels of hepatic PEPCK (3.23-fold higher than CTL, P < 0.05; Fig. 3I). Importantly, AMPK activation was not ubiquitous because icv AICAR had no effect on hepatic ACC phosphorylation (Supplemental Fig. 7).

# AMPK activation in the MBH is essential for fructose-induced upregulation of gluconeogenesis

In an attempt to better discern the regions of the CNS targeted by fructose, we next localized AMPKa phosphorylation within the hypothalamus of



**FIG. 3.** Intracerebroventricular A769662 and AICAR treatments increase gluconeogenesis and hepatic PEPCK and activate hypothalamic AMPK. Wistar rats were subjected to lateral ventricle cannulation. One week after surgery, the rats received icv injections containing either A769662 or 2% ethanol as vehicle (CTL). Rats were also treated with icv AICAR and 0.9% NaCl as vehicle. Treated rats were fasted for 12 h and subjected to an ip pyruvate tolerance test. Glycemia was measured before and 15, 30, 60, 90, and 120 min after pyruvate injection. The *full line with closed circles* represents A769662-treated rats, and the *full line with open circles* represents their CTL (A). The *full line with closed triangles* represents AICAR-treated rats, and the *full line with open circles* represents their CTL (A). The *full line with closed triangles* represents AICAR-treated rats, and the *full line with open squares* represents their CTL (C). The AUC was calculated for each individual animal within the group treated with A769662 and AICAR and their respective CTL (respectively, B and D). CTL and AICAR rats were anesthetized, and the hypothalamus and a fragment of the liver were removed and processed for Western blotting. Membranes containing the hypothalamus samples were probed with antibodies against AMPKa1, AMPKa2, ACC, pAMPKa, pACC, and [3-actin (E). The data for pAMPKa (F) and pACC (G) were normalized to [3-actin. Membranes containing the liver samples were probed with antibodies against PEPCK and [3-actin (H). The data for PEPCK (I) were normalized to [3-actin. The results are shown as the mean  $\pm$ s. \*, *P* < 0.05 vs. CTL (n **§** 4 for AICAR and n **§** 5 for A769662).



FIG. 4. Fructose-induced AMPK activation in the MBH mediates the up-regulation of gluconeogenesis. Wistar rats were subjected to lateral ventricle cannulation. One week after surgery, the rats were treated with icv fructose. Treated rats were fasted for 13 h, and the hypothalamic tissue samples were removed and processed for immunofluorescence staining. Five-micrometer sections were stained using an anti-pAMPKa antibody followed by incubation with a fluorescein isothiocyanate-conjugated secondary antibody (green). Nuclear structures were visualized by 4',6'-diamino-2-phenylindole probing (blue). Large magnification (X400) images are shown from the ARC (A), LH (B) and PVN (C). An independent set of animals were subjected to cannula implantation in the MBH. After surgery, the rats were divided into two groups receiving either scrambled siRNA or siRNA- AMPKa2 through a cannula. Simultaneous ip treatment with saline or fructose was performed in half of the animals from both groups. After treatments, rats were anesthetized, and the hypothalamus was removed and processed for Western blotting. Membranes containing the hypothalamus samples were probed with antibodies against AMPKa1, AMPKa2, and [3-actin. The data for pAMPKa were normalized to [3-actin (D). Treated rats were fasted for 12 h and subjected to an ip pyruvate tolerance test. Glycemia was measured before and 15, 30, 60, 90, and 120 min after pyruvate injection. The dashed line with open circles represents the scrambled siRNA treated with ip saline, the full line with closed circles represents the scrambled siRNA treated with ip fructose, the full line with closed squares represents the siRNA-AMPKa2 treated with ip saline, and the dashed line with open squares represents the siRNA-AMPKa2 treated with ip fructose (E). The AUC was calculated for each individual animal within the four groups (F). The results are shown as the mean  $\pm$ se. \*, P < 0.05 vs. rats receiving scrambled siRNA in the MBH and ip saline; #, P < 0.05 vs. rats receiving scrambled siRNA in the MBH and ip fructose; &, P < 0.05 vs. rats receiving scrambled siRNA in the MBH and ip saline 60 min after pyruvate load (n 🚯 3 for immunofluorescence and n 🏟 5 for PTT and Western blot).

Fructose-ICV rats. High-magnification images showed that fructose-ICV rats displayed increased levels of AMPKa phosphorylation in three regions of the MBH: the arcuate nucleus (ARC), the lateral hypothalamus (LH), and the paraventricular nucleus (PVN) (Fig. 4, A-C, respectively). The low-magnification images are shown in Supplemental Fig. 8. Sections posterior and anterior to the hypothalamus revealed no changes in pAMPKa induced by the fructose (Supplemental Fig. 9). Similar results were found in immunofluorescent staining for pACC (Supplemental Fig. 10). Next, we performed AMPKa2 knockdown in the MBH in rats that simultaneously received either ip saline or ip fructose. Our siRNA protocol was able to reduce hypothalamic AMPKa2 levels to 56 and 39% in saline- and Fructose-IP rats, respectively, compared with their counterparts treated with scrambled siRNA (P < 0.05). No changes were found in hypothalamic AMPKa1 (Fig. 4D). In rats receiving scrambled siRNA but not AMPKa2siRNA, ip fructose was associated with an up-regulation of glucose levels 60 min after pyruvate load and AUC (respectively, 1.66- and 1.70-fold higher than rats receiving scrambled siRNA and ip saline, P < 0.05) (Fig. 4, E and F, respectively).

We also performed an experimental protocol in which rats received simultaneous ip fructose and icv compound C. The ip fructose-induced increase in gluconeogenesis, as evidenced bv higher blood glucose levels at 90 and 120 min after pyruvate load (1.17- and 1.27-fold higher than CTL, respectively; P < 0.05) was suppressed by concomitant icv compound C treatment (Fig. 5A). Accordingly, the increase in AUC of rats treated with ip fructose (2.31-fold higher than CTL, P < 0.05) was suppressed by icv compound C (Fig. 5B).

The rats that received ip fructose with or without icv compound C showed no differences in AMPKa1, AMPKa2, and ACC



FIG. 5. Intracerebroventricular compound C treatment suppresses fructose-induced increase of gluconeogenesis and hepatic PEPCK. Wistar rats were subjected to lateral ventricle cannulation. One week after surgery, the rats were divided into two groups that were treated with ip fructose or 0.9% NaCl as vehicle. In addition, the rats were further divided into two additional groups that received either icv compound C or 5% DMSO as vehicle. After treatment, the rats were fasted for 13 h and subjected to an ip PTT. Glycemia was measured before and 15, 30, 90, and 120 min after pyruvate injection. The full line with open squares represents data from the ip saline and icv vehicle, the full line with closed triangles represents data from the ip fructose and icv vehicle, the dashed line with closed circles represents data from the ip saline and icv compound C, and the dashed line with open circles represents data from the ip fructose and icv compound C (A). The AUC was calculated for each individual animal within the four groups (B). A different set of rats arranged in these four experimental groups were anesthetized, and the hypothalamus and a fragment of the liver were removed and processed for Western blotting. Membranes containing hypothalamus samples were probed with antibodies against AMPKa1, AMPKa2, ACC, pAMPKa, pACC, and [3-actin (C). The data for pAMPKa (D) and pACC (E) were normalized to [3-actin. Membranes containing liver samples were probed with antibodies against PEPCK and [3-actin (F). The data for PEPCK (G) were normalized using [3-actin. The results are shown as the mean  $\pm$  se. \*, P < 0.05 vs. rats receiving vehicle ip and icv (n 0 5).

content (Fig. 5C). The ip fructose-induced increases in both AMPKa and ACC phosphorylation (2.53- and 4.21fold higher than CTL, respectively; P <0.05) were suppressed by icv compound C treatment (Fig. 5, D and E, respectively). The increase in hepatic PEPCK induced by ip fructose (2.04fold higher than CTL; P < 0.05) was also suppressed by icv compound C treatment (Fig. 5G). As evidence that our experimental protocol did not cause a systemic inhibition of AMPK, ACC phosphorylation was not altered in rats that received icv compound C (Supplemental Fig. 11).

# Fructose increases corticosterone levels through a mechanism that is dependent on hypothalamic AMPK activation

We next assessed whether hypothalamic AMPK activation by AICAR or fructose would modulate circulating levels of glucagon, catecholamines and corticosterone. Chronic AICAR administration through icv injection increased corticosterone (2.46-fold), epinephrine (1.28-fold), and norepinephrine (1.27-fold) compared with rats that received icv saline (P <0.05). No changes in glucagon levels were induced by icv AICAR. Rats receiving ip fructose injections exhibited an increase in corticosterone (2.48-fold higher than rats that received ip saline and icv DMSO 5%; P < 0.05) that was suppressed by concomitant icv treatment with compound C. Epinephrine, norepinephrine, and glucagon were not modulated by ip fructose treatment (Table 1).

# Fructose-induced increase in hepatic PEPCK and gluconeogenesis depends on GR activation in the liver

Pharmacological blockage of the GR receptor with sc injection of RU486 suppressed the icv AICAR-induced increase in gluconeogenesis. This effect

was observed 90 and 120 min after pyruvate injection (Fig. 6A) and in the AUC values (Fig. 6B). Similarly, treatment

**TABLE 1.** Modulation of counter-regulatory hormonal response by hypothalamic AMPK activation after AICAR or fructose injection

	Corticosterone (ng/ml)	Glucagon (pg/ml)	Epinephrine (nм)	Norepinephrine (nм)
Saline, icv	76.59±18.20	315.0±13.64	11.35±0.38	4.97±0.17
AICAR, icv	187.5 ±17.48 <sup>a</sup>	254.4±33.98	14.64±0.21 <sup>a</sup>	$6.33 \pm 0.23^{a}$
Vehicle/ip saline, icv	99.61±13.92	$152.8 \pm 3.80$	$8.63 \pm 1.69$	3.66±0.29
Vehicle/ip fructose, icv	190.20±31.48 <sup>b</sup>	150.8±10.88	10.27±0.81	$3.55 \pm 0.23$
Comp. C/ip saline, icv	89.26±39.36	134.8±10.65	11.31±0.82	4.26±0.06
Comp. C/ip, fructose icv	$108.60 \pm 35.35$	136.4±8.26	9.83±1.14	4.31±0.18

Comp. C, compound C.

<sup>a</sup> P < 0.05 vs. icv saline.

<sup>b</sup> P < 0.05 vs. icv vehicle/ip saline.

with RU486 abolished the effect of the ip fructose over gluconeogenesis (Fig. 6, C and D).

Subcutaneous RU486 treatment had no effect on ip fructose-induced AMPKa and ACC phosphorylation (Fig. 6, F and G). However, the combination of the GR antagonist with fructose reduced the levels of hepatic *PEPCK* to 0.65-fold the values of the animals receiving fructose only (Fig. 6I).

We next measured the binding of GR to the *PEPCK* gene. Fructose-IP efficiently stimulated GR binding to the *PEPCK* gene in liver (2.42-fold higher than CTL; P < 0.05). Cotreatment with fructose and RU486, in turn, reduced GR binding activity to 0.67-fold the values of the animals receiving only fructose (Fig. 6J).

## Discussion

In the past few years, great attention has been paid to the increase in fructose consumption due to its correlation with an abrupt surge in the incidence of the metabolic syndrome (8). Fructose is classically known as a gluconeogenic precursor because of its hepatic conversion into pyruvate (18, 19). The data presented here show that a 5-d fructose treatment increases the hepatic PEPCK expression and the synthesis of glucose after a pyruvate load. This finding suggests that a mechanism other than the metabolism of fructose by itself might contribute to increased gluconeogenesis after fructose treatment. Our findings also show that fructose, administered through an icv or ip injections, induces an up-regulation of gluconeogenesis. Thus, we hypothesize that fructose is able to trigger an interorgan communication between the CNS and the liver to increase gluconeogenesis.

In opposition to our hypothesis, several studies support the view that fructose increases gluconeogenesis due to its lipogenic action in the liver (8). Fructose-enriched diets increase circulating triglycerides and *de novo* lipogenesis in obese patients (20) and stimulate intrahepatic lipid accumulation in healthy humans (2). Hepatic steatosis was also reported in rats receiving fructose-enriched diets (6, 7). Fat accumulation in the liver is therefore believed to generate hepatic insulin resistance, thus inhibiting the suppressive action of insulin over hepatic glucose production (8). As we understand it, the limits for this interpretation depend on the amount of fructose administered. For instance, Lê et al. (2)used 3.5 g of fructose per kilogram of body weight daily in human patients, which results in a daily intake of fructose that is far beyond that of the normal human diet (-700 mg/kg of body weight) (1). Rodents usually receive diets that are enriched with fructose at concentration ranges of 20-63% (wt/wt) (21, 22). It is noteworthy that the lower dose of fructose used in our expermg/kg daily) efficiently up-regulated iments (6 gluconeogenesis and hepatic PEPCK, whether icv or ip, suggesting that this metabolic alteration induced by fructose possibly precedes hepatic steatosis.

Direct action of ingested fructose in the CNS is far from being a consensus opinion, but many experimental findings favor this hypothesis. Fructose-metabolizing enzymes and the fructose transporter glucose transporter-5 have been described in distinct regions of the CNS (23–26) and in cells of the blood-brain barrier (27). Fructose is also transported by glucose transporter-2, a glucose transporter expressed in several hypothalamic areas (28). In addition, unmetabolized fructose is found in the urine after ingestion of a high-fructose meal, evidence that some fructose bypasses liver metabolism (29) and possibly could reach the CNS. Functionally, ip fructose was suggested to cross the blood-brain barrier and to be rapidly metabolized to lactate in the hypothalamus (30).

Fructose-induced decrease in hypothalamic ATP levels and subsequent activation of AMPK has been reported to stimulate food intake (9). Our data, showing that icv injections with AICAR or A769662 mimicked the effects of fructose ip or icv on gluconeogenesis and hepatic PEPCK expression, support the proposition that fructose-induced



FIG. 6. AICAR- and fructose-induced increase of gluconeogenesis depends on hepatic GR activation. Wistar rats were subjected to lateral ventricle cannulation. One week after surgery, the rats were treated with icv AICAR and simultaneous sc injections containing RU486 or vehicle (20% ethanol). Treated rats were fasted for 13 h and subjected to an ip pyruvate tolerance test. Glycemia was measured before and 15, 30, 90, and 120 min after pyruvate injection. The full line with open circles represents data from the icv saline and sc vehicle, the full line with closed squares represents data from the icv AICAR and sc vehicle, the full line with closed circles represents data from the icv saline and sc RU486, and the dashed line represents data from the icv AICAR and sc RU486 (A). The AUC was calculated for each individual animal within the four groups (B). Wistar rats were treated with ip fructose during 5 d with one daily simultaneous sc injection containing RU486 or vehicle. After treatment, the rats were fasted for 13 h and subjected to an ip PTT. Glycemia was measured before and 15, 30, 90, and 120 min after pyruvate injection. The full line with open triangles represents data from the ip saline and sc vehicle, the full line with closed triangles represents data from the ip fructose and sc vehicle, the full line with open circles represents data from the ip saline sc RU486, and the dashed line with open squares represents data from the ip fructose and sc RU486 (C). The AUC was calculated for each individual animal within the four groups (D). A different set of rats was anesthetized, and the hypothalamus and a fragment of the liver were removed and processed for Western blotting. Membranes containing the hypothalamus samples were probed with antibodies against AMPKa1, AMPKa2, ACC, pAMPKa, pACC, and [3-actin (E). The data for pAMPKa (F) and pACC (G) were normalized to [3-actin. Membranes containing liver samples were probed with antibodies against PEPCK and [3-actin (H). The data for PEPCK (I) were normalized to [3-actin. Fragments of liver were also used for ChIP using an anti-GR antibody. The PEPCK gene was amplified from the ChIP samples and normalized to the respective input (J). The results are shown as the mean ±st. \*, P < 0.05 vs. CTL; #, P < 0.05 vs. Fructose-IP (n 🏈 6).

AMPK activation in the CNS might also regulates of gluconeogenesis. In addition, our data demonstrating that pharmacological AMPK inhibition in the CNS suppresses the stimulation of gluconeogenesis induced by ip fructose further support this hypothesis.

To investigate the participation of hypothalamus in the fructose-mediated CNS-liver communication, we localized AMPKa phosphorylation using immunofluorescent staining. Fructose given through icv injection increased phosphorylated AMPKa in the ARC, PVN, and LH. The functional relevance for fructose-induced hypothalamic AMPKa phosphorylation was further demonstrated by the inability of ip fructose to increase gluconeogenesis in rats exposed to AMPKa2 knockdown in the MBH.

The present data are in accordance with a recent investigation demonstrating that the expression of a dominantnegative form of AMPKa2 in the MBH decreases glucose production (13). Neuronal pathways downstream to AMPK that may result in increased hepatic glucose output are not yet identified, but the stimulation of carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT1) is likely to be involved. AMPK activation is classically known to target the phosphorylation and inhibition of ACC, resulting in the reduced conversion of acetyl-CoA to malonyl-CoA (12). Malonyl-CoA functions as an endogenous inhibitor of CPT1. Reducing malonyl-CoA levels allows CPT1 to shunt long-chain acyl-CoA to the [3-oxidation cycle in mitochondria. Pharmacological inhibition and genetic knockdown of hypothalamic CPT1 have been described to reduce hepatic gluconeogenesis (31). Of note, our data demonstrate that both ip and icv fructose stimulate hypothalamic ACC phosphorylation.

Although the description of the precise mechanism by which fructose activates hypothalamic AMPK is not the main focus of the present investigation, some hypotheses can be taken into account. First, direct icv injections of fructose can stimulate AMPK activation through mechanisms other than the simple increase in AMP to ATP ratio. Phosphofructose, a metabolite of fructose, was already described to inhibit protein phosphatase 2A activity, a phosphatase known to dephosphorylate AMPK (32). Importantly, although not precisely localized in the hypothalamus, the CNS is a territory that contains high amounts of ketohexokinase, the enzyme responsible for converting fructose into phospho-fructose (33).

Regarding our present experiments using ip fructose, some peripheral signal generated by fructose might also contribute to AMPK activation in the CNS in addition to its direct metabolism in the hypothalamus. TNF**a** produced by the liver due to direct action of fructose can activate AMPK in the hypothalamus through a mechanism dependent on TGF[3-activated kinase activation (34–37). Alternatively, fructose has been described to abrogate postprandial drop in ghrelin levels (38). Ghrelin is known to elicit an orexigenic response that is dependent on hypothalamic AMPK activation (39). These putative additional mechanisms might also explain the similar intensity of AMPK activation when fructose was given either through ip or through icv injections.

Having established the importance of hypothalamic AMPK for fructose-induced gluconeogenesis, we next explored how this information was transmitted from the MBH to the liver. Several studies reported that hypoglycemia-induced AMPK activation in the ventromedial hypothalamus, ARC, and PVN mediates a hormonal counterregulatory response, which is characterized by increased circulating levels of corticosterone, glucagon, epinephrine, and norepinephrine (40-42). These counterregulatory hormones are classically recognized as potent stimulators of hepatic gluconeogenesis. AMPKa2 phosphorylation in the PVN seems to be particularly important for the stimulation of corticosterone secretion (41), whereas AMPKa2 phosphorylation in the ventromedial hypothalamus mediates an increase in glucagon and catecholamines (40, 41). In accordance with these studies, we have found that fructose treatment efficiently increased AMPKa phosphorylation in the PVN and the circulating levels of corticosterone.

The ability of fructose to increase glucocorticoid levels is connected to hypothalamic AMPK activation because icv compound C abrogated the surge in corticosterone induced by ip fructose. Singularly, we found that chronic activation of hypothalamic AMPK by AICAR resulted in a specific increase in corticosterone and catecholamines but not in circulating glucagon. This finding is in contrast with previous reports showing that acute AMPK activation by AICAR was able to increase glucagon levels (41, 43). It is possible that the glucagon response is not as sustained as that of corticosterone because no increase in the levels of that hormone are detected after repeated activation of hypothalamic AMPK, as occurred in our experimental protocols.

Corticosterone-mediated up-regulation of hepatic gluconeogenesis involves a direct stimulation of hepatic PEPCK expression, which is caused by the binding of GR to the regulatory regions within the *PEPCK* promoter (44). GR antagonism by RU486 was described to inhibit gluconeogenesis and PEPCK expression in obese but not in nonobese mice (45). We found that fructose is unable to increase gluconeogenesis and hepatic PEPCK levels when combined with RU486. In addition, fructose-induced GR binding to the *PEPCK* gene demonstrates the interdependence between the fructose-mediated increase in gluconeogenesis and the hepatic action of corticosterone.



**FIG. 7.** Proposed interorgan mechanism for fructose-induced increase of gluconeogenesis. Fructose activates AMPK in the hypothalamus, resulting in corticosterone (GC) secretion. Corticosterone acts in the liver to increase PEPCK expression and gluconeogenesis.

In summary, the present study reveals a new mechanism by which fructose up-regulates gluconeogenesis (illustrated in Fig. 7). This mechanism is triggered by the activation of the fuel sensor AMPK within the hypothalamus. Hypothalamic AMPK activation leads to increased corticosterone levels that ultimately activate GR in the liver. Finally, increased GR binding activity to the PEPCK gene favors PEPCK expression and thus fructose-induced gluconeogenesis.

#### Acknowledgments

We thank Cleber Kinote (Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil) for technical assistance with animal care and André Rennó (Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, Brazil) for assistance with immunofluorescent images analysis.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Gabriel Forato Anhê, Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Alexander Fleming Street, #101, 13084-971Campinas SP, Brazil. E-mail: anhegf@fcm.unicamp.br.

This work was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

#### References

 Tappy L, Lê KA 2010 Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. Physiol Rev 90:23–46 2. Lê KA, Ith M, Kreis R, Faeh D, Bortolotti M, Tran C, Boesch C, Tappy L 2009 Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. Am J Clin Nutr 89:1760–1765

- Ragheb R, Medhat AM, Shanab GM, Seoudi DM, Fantus IG 2008 Links between enhanced fatty acid flux, protein kinase C and NFKB activation, and apoB-lipoprotein production in the fructose-fed hamster model of insulin resistance. Biochem Biophys Res Commun 370:134–139
- 4. Rajasekar P, Anuradha CV 2007 Fructose-induced hepatic gluconeogenesis: effect of L-carnitine. Life Sci 80:1176–1183
- DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E 1992 Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. Diabetes Care 15:318 –368
- 6. Wada T, Kenmochi H, Miyashita Y, Sasaki M, Ojima M, Sasahara M, Koya D, Tsuneki H, Sasaoka T 2010 Spironolactone improves glucose and lipid metabolism by ameliorating hepatic steatosis and inflammation and suppressing enhanced gluconeogenesis induced by a high-fat and high-fructose diet. Endocrinology 151:2040–2049
- Nagai Y, Yonemitsu S, Erion DM, Iwasaki T, Stark R, Weismann D, Dong J, Zhang D, Jurczak MJ, Löffler MG, Cresswell J, Yu XX, Murray SF, Bhanot S, Monia BP, Bogan JS, Samuel V, Shulman GI 2009 The role of peroxisome proliferator-activated receptor "{ coactivator-1 beta in the pathogenesis of fructose-induced insulin resistance. Cell Metab 9:252–264
- Samuel VT 2011 Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance. Trends Endocrinol Metab 22:60 –65
- Cha SH, Wolfgang M, Tokutake Y, Chohnan S, Lane MD 2008 Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl-CoA and food intake. Proc Natl Acad Sci USA 105:16871– 16875
- Alexander A, Walker CL 2011 The role of LKB1 and AMPK in cellular responses to stress and damage. FEBS Lett 585:952–957
- Zhang BB, Zhou G, Li C 2009 AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. Cell Metab 9:407–416
- Ruderman NB, Saha AK, Kraegen EW 2003 Minireview: malonyl CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity. Endocrinology 144:5166–5171
- Yang CS, Lam CK, Chari M, Cheung GW, Kokorovic A, Gao S, Leclerc I, Rutter GA, Lam TK 2010 Hypothalamic AMP-activated protein kinase regulates glucose production. Diabetes 59:2435– 2443
- Johnson AK, Epstein AN 1975 The cerebral ventricles as the avenue for the dipsogenic action of intracranial angiotensin. Brain Res 86: 399-418
- 15. Nogueira TC, Lellis-Santos C, Jesus DS, Taneda M, Rodrigues SC, Amaral FG, Lopes AM, Cipolla-Neto J, Bordin S, Anhê GF 2011 Absence of melatonin induces night-time hepatic insulin resistance and increased gluconeogenesis due to stimulation of nocturnal unfolded protein response. Endocrinology 152:1253–1263
- Razolli DS, Solon C, Roman ER, Ignacio-Souza LM, Velloso LA 11 November 2011 Hypothalamic action of glutamate leads to body mass reduction through a mechanism partially dependent on JAK2. J Cell Biochem 10.1002/jcb.23445
- Bromati CR, Lellis-Santos C, Yamanaka TS, Nogueira TC, Leonelli M, Caperuto LC, Gorjão R, Leite AR, Anhê GF, Bordin S 2011 UPR induces transient burst of apoptosis in islets of early lactating rats through reduced AKT phosphorylation via ATF4/CHOP stimulation of TRB3 expression. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 300:R92–R100
- Mayes PA 1993 Intermediary metabolism of fructose. Am J Clin Nutr 58:754S–765S
- Bode C, Dürr HK, Bode JC 1981 Effect of fructose feeding on the activity of enzymes of glycolysis, gluconeogenesis, and the pentose phosphate shunt in the liver and jejunal mucosa of rats. Horm Metab Res 13:379 –383
- 20. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, Hatcher B, Cox CL, Dyachenko A, Zhang W, McGahan JP,

Seibert A, Krauss RM, Chiu S, Schaefer EJ, Ai M, Otokozawa S, Nakajima K, Nakano T, Beysen C, Hellerstein MK, Berglund L, Havel PJ 2009 Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. J Clin Invest 119: 1322–1334

- Roncal-Jimenez CA, Lanaspa MA, Rivard CJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Jalal D, Andres-Hernando A, Tanabe K, Madero M, Li N, Cicerchi C, McFann K, Sautin YY, Johnson RJ 2011 Sucrose induces fatty liver and pancreatic inflammation in male breeder rats independent of excess energy intake. Metabolism 60: 1259 –1270
- 22. Koo HY, Wallig MA, Chung BH, Nara TY, Cho BH, Nakamura MT 2008 Dietary fructose induces a wide range of genes with distinct shift in carbohydrate and lipid metabolism in fed and fasted rat liver. Biochim Biophys Acta 1782:341–348
- 23. Funari VA, Crandall JE, Tolan DR 2007 Fructose metabolism in the cerebellum. Cerebellum 6:130 –140
- Shu HJ, Isenberg K, Cormier RJ, Benz A, Zorumski CF 2006 Expression of fructose sensitive glucose transporter in the brains of fructose-fed rats. Neuroscience 140:889–895
- Meakin PJ, Fowler MJ, Rathbone AJ, Allen LM, Ransom BR, Ray DE, Brown AM 2007 Fructose metabolism in the adult mouse optic nerve, a central white matter tract. J Cereb Blood Flow Metab 27: 86–99
- Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA 1994 Glucose transporter proteins in brain. FASEB J 8:1003–1011
- 27. Mantych GJ, James DE, Devaskar SU 1993 Jejunal/kidney glucose transporter isoform (Glut-5) is expressed in the human blood-brain barrier. Endocrinology 132:35–40
- Li B, Xi X, Roane DS, Ryan DH, Martin RJ 2003 Distribution of glucokinase, glucose transporter GLUT2, sulfonylurea receptor-1, glucagon-like peptide-1 receptor and neuropeptide Y messenger RNAs in rat brain by quantitative real time RT-PCR. Brain Res Mol Brain Res 113:139–142
- Johner SA, Libuda L, Shi L, Retzlaff A, Joslowski G, Remer T 2010 Urinary fructose: a potential biomarker for dietary fructose intake in children. Eur J Clin Nutr 64:1365–1370
- Cha SH, Lane MD 2009 Central lactate metabolism suppresses food intake via the hypothalamic AMP kinase/malonyl-CoA signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun 386:212–216
- Obici S, Feng Z, Arduini A, Conti R, Rossetti L 2003 Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. Nat Med 9:756 –761
- 32. **Kowluru A, Metz SA** 1998 Purine nucleotide- and sugar phosphateinduced inhibition of the carboxyl methylation and catalysis of protein phosphatase-2A in insulin-secreting cells: protection by divalent cations. Biosci Rep 18:171–186
- Funari VA, Herrera VL, Freeman D, Tolan DR 2005 Genes required for fructose metabolism are expressed in Purkinje cells in the cerebellum. Brain Res Mol Brain Res 142:115–122
- 34. Kanuri G, Spruss A, Wagnerberger S, Bischoff SC, Bergheim I 2011 Role of tumor necrosis factor a (TNFa) in the onset of fructose-

induced nonalcoholic fatty liver disease in mice. J Nutr Biochem 22:527–534

- 35. Collino M, Aragno M, Castiglia S, Miglio G, Tomasinelli C, Boccuzzi G, Thiemermann C, Fantozzi R 2010 Pioglitazone improves lipid and insulin levels in overweight rats on a high cholesterol and fructose diet by decreasing hepatic inflammation. Br J Pharmacol 160:1892–1902
- 36. Sung B, Pandey MK, Aggarwal BB 2007 Fisetin, an inhibitor of cyclin-dependent kinase 6, down-regulates nuclear factor-KB-regulated cell proliferation, antiapoptotic and metastatic gene products through the suppression of TAK-1 and receptor-interacting proteinregulated IKBa kinase activation. Mol Pharmacol 71:1703–1714
- Herrero-Martín G, Høyer-Hansen M, García-García C, Fumarola C, Farkas T, López-Rivas A, Jäättelä M 2009 TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells. EMBO J 28:677–685
- Teff KL, Elliott SS, Tschöp M, Kieffer TJ, Rader D, Heiman M, Townsend RR, Keim NL, D'Alessio D, Havel PJ 2004 Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. J Clin Endocrinol Metab 89:2963–2972
- 39. López M, Lage R, Saha AK, Pérez-Tilve D, Vázquez MJ, Varela L, Sangiao-Alvarellos S, Tovar S, Raghay K, Rodríguez-Cuenca S, Deoliveira RM, Castañeda T, Datta R, Dong JZ, Culler M, Sleeman MW, Alvarez CV, Gallego R, Lelliott CJ, Carling D, Tschöp MH, Diéguez C, Vidal-Puig A 2008 Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. Cell Metab 7:389 –399
- McCrimmon RJ, Shaw M, Fan X, Cheng H, Ding Y, Vella MC, Zhou L, McNay EC, Sherwin RS 2008 Key role for AMP-activated protein kinase in the ventromedial hypothalamus in regulating counterregulatory hormone responses to acute hypoglycemia. Diabetes 57:444 –450
- 41. Han SM, Namkoong C, Jang PG, Park IS, Hong SW, Katakami H, Chun S, Kim SW, Park JY, Lee KU, Kim MS 2005 Hypothalamic AMP-activated protein kinase mediates counter-regulatory responses to hypoglycaemia in rats. Diabetologia 48:2170–2178
- 42. Alquier T, Kawashima J, Tsuji Y, Kahn BB 2007 Role of hypothalamic adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase in the impaired counterregulatory response induced by repetitive neuroglucopenia. Endocrinology 148:1367–1375
- 43. Fan X, Ding Y, Brown S, Zhou L, Shaw M, Vella MC, Cheng H, McNay EC, Sherwin RS, McCrimmon RJ 2009 Hypothalamic AMP-activated protein kinase activation with AICAR amplifies counterregulatory responses to hypoglycemia in a rodent model of type 1 diabetes. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 296: R1702–R1708
- 44. **Imai E, Miner JN, Mitchell JA, Yamamoto KR, Granner DK** 1993 Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids. J Biol Chem 268:5353–5356
- 45. Friedman JE, Sun Y, Ishizuka T, Farrell CJ, McCormack SE, Herron LM, Hakimi P, Lechner P, Yun JS 1997 Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription and hyperglycemia are regulated by glucocorticoids in genetically obese db/db transgenic mice. J Biol Chem 272:31475–31481



Os resultados obtidos através deste estudo nos remetem às seguintes conclusões:

- i) O tratamento intraperitoneal e intracerebroventricular com frutose é capaz de ativar AMPK no hipotálamo, aumentar a expressão da PEPCKno fígado e diminuir o clearance de glicose após desafio com piruvato, provavelmente em decorrência da gliconeogênese aumentada.
- ii) A ativação farmacológica da AMPK hipotalâmica induzida por AICAR e A769662 aumenta a expressão da PEPCKe dimiuui o clearance de glicose após desafio com piruvato, provavelmente em decorrência da gliconeogênese aumentada.agliconeogênese.
- iii) A frutose induz o aumento da atividade da AMPK nos núcleos hipotalâmicos arqueado, paraventricular e hipotálamo lateral.
- iv) A inibição farmacológica e traducional da AMPK hipotalâmica suprime o aumento da PEPCK e a gliconeogênese hepáticas induzido pela frutose.
- A frutose induz o aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona de maneira dependente da ativação hipotalâmica de AMPK.
- vi) A frutose estimula a ligação do GR ao gene da PEPCK, aumentando sua transcrição e estimulando o aumento da gliconeogênese.
- vii) Os efeitos da frutose sobre o aumento da expressão de PEPCK no fígado e a inibição do clearance de glicose após desafio com piruvato são dependentes da ativação do receptor de glicocorticóide no fígado.



- Aeberli I, Hochuli M, Berneis K. Moderate amounts of fructose consumption impair insulin sensitivity in healthy young men: a randomized controlled trial. Diabetes Care 2013;36:150-156.
- Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. Nutr Metab. 2005;2(1):5
- Basu R, Barosa C, Jones J, Dube S, Carter R, Basu A, Rizza RA. Pathogenesis of prediabetes: role of the liver in isolated fasting hyperglycemia and combined fasting and postprandial hyperglycemia. J Clin Endocrinol Metab. 2013;98(3):E409-17.
- Bergeron R, Previs SF, Cline GW, Perret P, Russell RR 3rd, Young LH, Shulman GI. Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside infusion on in vivo glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats. Diabetes. 2001;50(5):1076-82.
- 5. Blouet C, Schwartz GJ. Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. Behav Brain Res. 2010 May 1;209(1):1-12.
- Boutelle KN, Fulkerson JA, Neumark-Sztainer D, Story M, French SA. Fast food for family meals: relationships with parent and adolescent food intake, home food availability and weight status. Public Health Nutr. 2007; 10(1):16-23
- 7. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructosecornsyrup in beveragesmay play a role in theepidemicofobesity. Am J Clin Nutr 2004; 79: 537–543.
- Bursać BN, Djordjevic AD, Vasiljević AD, Milutinović DD, Veličković NA, Nestorović NM, Matić GM. Fructose consumption enhances glucocorticoid action in rat visceral adipose tissue. J Nutr Biochem. 2013;24(6):1166-72.
- Cha SH, Wolfgang M, Tokutake Y, Chohnan, S, Lane DM. Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl–CoA and food intake. PNAS 2008; 105(44): 16871–75.
- 10. Chen L, Maglian DJ, Zimmet PZ.The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus-present and future perspectives. Nat Rev Endocrinol. 2011; 8(4):228-36.
- Collison KS, Saleh SM, Bakheet RH, Al-Rabiah RK, Inglis AL, Makhoul NJ, Maqbool ZM, Zaidi MZ, Al-Johi MA, Al-Mohanna FA. Diabetes of the liver: the link between nonalcoholic fatty liver disease and HFCS-55. Obesity (Silver Spring). 2009;17(11):2003-13
- Dekker MJ, Su Q, Baker C, Rutledge AC, Adeli K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. Am J PhysiolEndocrinolMetab. 2010; 299(5):E685-94.
- deKoning L, Malik VS, Rimm EB, Willett WC, Hu FB. Sugar-sweetened and artificially sweetened beverage consumption and risk of type 2 diabetes in men. Am J Clin Nutr 2011; 93:1321–1327
- 14. Dzamko NL, Steinberg GR. AMPK-dependent hormonal regulation of whole-body energy metabolism. Acta Physiol (Oxf). 2009;196(1):115-27
- 15. Elliott S, Keim N, Stern J, Teff K, and Havel P. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. Am J ClinNutr.2002;76:911–22.
- Faber S, O'Brien RM, Imai E, Granner DK, Chalkley R. Dynamic aspects of DNA/protein interactions in the transcriptional initiation complex and the hormone-responsive domains of the phosphoenolpyruvate carboxykinase promoter in vivo. J Biol Chem. 1993; 268(33):24976-85.
- Faeh D, Minehira K, Schwarz JM, Periasamy R, Park S, Tappy L. Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. Diabetes 2005;54:1907–1913

- Feferbaum R, de Abreu LC, Leone C. Fluid intake patterns: an epidemiological study among children and adolescents in Brazil. BMC Public Health. 2012; 20;12:1005
- 19. Funari VA, Herrera VL, Freeman D, Tolan DR. Genes required for fructose metabolism are expressed in Purkinje cells in the cerebellum. Brain Res Mol Brain Res. 2005;142(2):115-22.
- Gowans GJ, Hawley SA, Ross FA, Hardie DG. AMP is a true physiological regulator of AMPactivated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. Cell Metab. 2013 Oct 1;18(4):556-66
- Han SM, Namkoong C, Jang PG, Park IS, Hong SW, Katakami H, Chun S, Kim SW, Park JY, Lee KU, Kim MS. Hypothalamic AMP-activated protein kinase mediates counter-regulatory responses to hypoglycaemia in rats. Diabetologia. 2005;48(10):2170-8.
- 22. Hardie DG, Ross F and Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2012; 13(4):251-62.
- Havel PJ. Dietary fructose: implications for dysregulation os energy homeosthasis and lipid/carbohydrate metabolism. Nutr Rev 2005; 63:133-57.
- Herzig, S et al. CREB regulates hepatic gluconeogenesis via the co-activator PGC-1. Nature 2001; 413, 179–183).
- Hirahatake KM, Meissen JK, Fiehn O, Adams SH. Comparative effects of fructose and glucose on lipogenic gene expression and intermediary metabolism in HepG2 liver cells. Plos One 2011; 6(11): 1-9.
- 26. Hu Z, Cha SH, Chohnan S, Lane MD. Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(22):12624-9.
- 27. Ishimoto T, Lanaspa MA, Rivard CJ, Roncal-Jimenez CA, Orlicky DJ, Cicerchi C, McMahan RH, Abdelmalek MF, Rosen HR, Jackman MR, Maclean PS, Diggle CP, Asipu A, Inaba S, Kosugi T, Sato W, Maruyama S, Sánchez-Lozada LG, Sautin YY, Hill JO, Bonthron DT, Johnson RJ. High fatand high sucrose (western) diet induce steatohepatitis that is dependent on fructokinase. Hepatology 2013 (in press).
- Johnson RJ, Perez-Pozo SE, Sautin YY, Manitius J, Sanchez-Lozada LG, Feig DI, Shafiu M, Segal M, Glassock RJ, Shimada M, Roncal C, Nakagawa T. Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? Endocr Rev. 2009;30(1):96-116
- 29. Ju<sup>°</sup>rgens H, Haass W, Castan<sup>°</sup>eda TR, et al. Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. Obes Res. 2005;13(7):1146-1156.
- Lanaspa MA, Ishimoto T, Li N, Cicerchi C, Orlicky DJ, Ruzicky P, Rivard C, Inaba S, Roncal-Jimenez CA, Bales ES, Diggle CP, Asipu A, Petrash JM, Kosugi T, Maruyama S, Sanchez-Lozada LG, McManaman JL, Bonthron DT, Sautin YY, Johnson RJ. Endogenous fructose production and metabolism in the liver contributes to the development of metabolic syndrome Nat Commun. 2013; 11(4):2434.
- 31. Lane DM, Cha SH. Effect of glucose and fructose on food intake via malonyl-CoA signaling in the brain. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2009; 382:1–5.
- Lê KA, Faeh D, Stettler R, Ith M, Kreis R, Vermathen P, Boesch C, Ravussin E, Tappy L. A 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. Am J Clin Nutr. 2006 Dec;84(6):1374-9.
- Le KA, Ith M, Kreis R, Faeh D, Bortolotti M, Tran C,Boesch C, Tappy L. Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. Am J Clin Nutr 2009; 89: 1760–1765.
- Lê KA, Tappy L. Metabolic effects of fructose. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2007; 10:210-14.

- Licht FO (Editor). International Sugar Economic Yearbook and Directory. Turnbridge Wells, UK: Agnalnforma, 2005.
- Lochhead PA, Salt IP, Walker KS, Hardie DG, Sutherland C. 5-aminoimidazole-4carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. Diabetes. 2000;49(6):896-903.
- 37. Lustig RH. Fructose: metabolic, hedonic, and societal parallels with ethanol. J Am Diet Assoc. 2010; 110(9): 1307-21.
- Lyssiotis CA, Cantley LC. Metabolic symdrome: F stands for fructose and fat. Nature 2013; 502:181-2.
- Marshall RO, Kooi ER. Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. Science 125: 648– 649, 1957.
- McCrimmon RJ, Shaw M, Fan X, Cheng H, Ding Y, Vella MC, Zhou L, McNay EC, Sherwin RS. Key role for AMP-activated protein kinase in the ventromedial hypothalamus in regulating counterregulatory hormone responses to acute hypoglycemia. Diabetes. 2008;57(2):444-50.
- Miller CC, Martin RJ, Whitney ML, Edwards GL. Intracerebroventricular injection of fructose stimulates feeding in rats. NutrNeurosci. 2002;5(5):359-362.
- 42. Nagai Y, Yonemitsu S, Erion DM, Iwasaki T, Stark R, Weismann D, Dong J, Zhang D, Jurczak MJ, Löffler MG, Cresswell J, Yu XX, Murray SF, Bhanot S, Monia BP, Bogan JS, Samuel V, Shulman GI. The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 beta in the pathogenesis of fructose-induced insulin resistance.Cell Metab. 2009;9(3):252-64
- Olswang Y, Blum B, Cassuto H, Cohen H, Biberman Y, Hanson RW, Reshef L. J Biol Chem. 2003;278(15):12929-36 Glucocorticoids repress transcription of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene in adipocytes by inhibiting its C/EBP-mediated activation.
- 44. Page KA, Chan O, Arora J et al. Effects of fructose vs. glucose on regional cerebral blood flow in brain regions involved with appetite and reward pathways. JAMA 2013;309(1): 63-70.
- Pimentel GD, Ropelle ER, Rocha GZ, Carvalheira JB. The role of neuronal AMPK as a mediator of nutritional regulation of food intake and energy homeostasis. Metabolism. 2013;62(2):171-8.
- 46. Puigserver, P et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1--PGC-1a interaction. Nature 2003; 423, 550--555.
- 47. Purnell JQ, Fair DA. Fructose ingestion and cerebral, metabolic and saciety responses. JAMA 2013, 309(1): 85-6.
- Ragheb R, Medhat AM, Shanab GM, Seoudi DM, Fantus IG. Links between enhanced fatty acid flux, protein kinase C and NFkappaB activation, and apoB-lipoprotein production in the fructose-fed hamster model of insulin resistance. Biochem Biophys Res Commun. 2008;370(1):134-9
- 49. Rajasekar P, Anuradha C. Fructose-induced hepatic gluconeogenesis: Effect of L-carnitine. Life Sciences 2007; 80: 1176–1183
- Roglans N, Vilà L, Farré M, Alegret M, Sánchez RM, Vázquez-Carrera M, Laguna JC.Impairment of hepaticStat-3 activation and reduction of PPAR alpha activity in fructosefed rats. Hepatology 2007;45(3):778-88.
- 51. Samuel VT. Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance. Trends EndocrinolMetab. 2011; 22(2):60-5

- Schimmack G, DeFronzo RA, Musi N. AMP-activated protein kinase: role in metabolism and therapeutic implications. Diabetes, Obesity and Metabolism 2006; 8: 591–602
- 53. Shu HJ, Isemberg K, Cormier RJ, Benz A, Zorumski CF. Expression of fructose sensitive glucose transporter in the brains of fructose rat-feds. Neuroscience. 2006;140: 889:895.
- Sievenpiper JL, de Souza RJ, Mirrahimi A, et al. Effect of fructose on body weight in controlled feeding trials: a systematic review and meta-analysis. Ann Intern Med.2012;156(4):291-304.
- Song XM, Fiedler M, Galuska D, Ryder JW, Fernström M, Chibalin AV, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside treatment improves glucose homeostasis in insulin-resistant diabetic (ob/ob) mice. Diabetologia. 2002;45(1):56-65.
- Stanhope K and Havel P. Fructose Consumption: Considerations for Future Research on Its Effects on Adipose Distribution, Lipid Metabolism, and Insulin Sensitivity in Humans.J. Nutr. 2009; 139: 1236S–1241S.
- Stanhope K and Havel P. Fructose consumption: potencial mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance. Curr Opin Lipidol. 2008; 19:16-24.
- 58. Stanhope K and Havel P. Fructose consumption: recent results and their potential implications. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2010; 1190: 15–24.
- Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, et al. Consuming fructose-sweetened, not glucosesweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. J Clin Invest 2009;119:1322–1334.
- 60. Tappy L, Lê KA, Tran C, Paquot N. Fructose and metabolic diseases: New findings, new questions. Nutrition. 2010; 26(11-12):1044-9.
- Tappy L, Lê KA. Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity. PhysiolVer 2010; 90: 23–46.
- 62. Teff KL, Grudziak J, Townsend RR, Dunn TN, Grant RW, Adams SH, Keim NL, Cummings BP, Stanhope KL, Havel PJ. Endocrine and metabolic effects of consuming fructose- and glucose-sweetened beverages with meals in obese men and women: influence of insulin resistance on plasma triglyceride responses. J Clin Endocrinol Metab. 2009;94(5):1562-9.
- Thurston JH, Levy CA, Warren SK, Jones EM. Permeability of the blood-brain barrier to fructose and the anaerobic use of fructose in the brains of young mice. J Neurochem. 1972;19(7):1685-96.
- 64. Tornheim K, Lowenstein JM. Control of phosphofructokinase from ratskeletal muscle. Effects of fructose diphosphate, AMP, ATP, and citrate. J BiolChem 1976; 251: 7322–7328.
- 65. Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling.Circ Res. 2007; 100(3):328-41.
- 66. Van den Berghe G. Fructose: metabolism and short-term effects on carbohydrate and purine metabolic pathways. Prog Biochem Pharmacol. 1986;21:1-32.
- 67. Ventura EE, Davis JN, Goran MI. Sugar contentof popular sweetened beverages based on objective laboratory analysis: focus on fructosecontent.Obesity 2011;19(4):868-74.
- Vincent O, Townley R, Kuchin S, Carlson M. Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. Genes Dev. 2001;15(9):1104-14.
- Viollet B, Athea Y, Mounier R, Guigas B, Zarrinpashneh E, Horman S, Lantier L, Hebrard S, Devin-Leclerc J, Beauloye C, Foretz M, Andreelli F, Ventura-Clapier R, Bertrand L. AMPK:

Lessons from transgenic and knockout animals. Front Biosci (Landmark Ed). 2009 Jan 1;14:19-44.

- 70. Wahren J, Ekberg K. Splanchnic regulation of glucose production. Annu Rev Nutr. 2007;27:329-45.
- 71. White JS. Straight talk about high-fructose corn syrup: what it is and what it ain't. Am J Clin Nutr.2008; 88: 1716S–1721S.
- 72. Willians G, Harrold JA, Cutler, DJ. The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. Proc Nut Soc 2000; 59:385-96.
- 73. Wolfgang MJ, Lane MD. Hypothalamic malonyl-CoA and CPT1c in the treatment of obesity. FEBS J. 2011;278(4):552-8.
- 74. Wolfgang MJ, Lane MD. The role of hypothalamic malonyl-CoA in energy homeostasis. J Biol Chem. 2006;281(49):37265-9.
- Yang CS, Lam CK, Chari M, Cheung GW, Kokorovic A, Gao S, Leclerc I, Rutter GA, Lam TK. Hypothalamic AMP-activated protein kinase regulates glucose production. Diabetes. 2010; 59(10):2435-43.
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. J Clin Invest. 2001;108(8):1167-74.



## Artigos Publicados

- Melatonin acts through MT1/MT2 receptors to activate hypothalamic AKT and suppress hepatic gluconeogenesis in rats. Faria JA, Kinote A, Ignacio-Souza LM, de Araújo TM, Razolli DS, Doneda DL, Paschoal LB, Lellis-Santos C, Bertolini GL, Velloso LA, Bordin S, Anhe GF. Am J PhysiolEndocrinolMetab. 2013 May 21
- Infliximab prevents increased systolic blood pressure and upregulates the AKT/eNOS pathway in the aorta of spontaneously hypertensive rats .Filho AG, Kinote A, Pereira DJ, Rennó A, dos Santos RC, Ferreira-Melo SE, Velloso LA, Bordin S, Anhê GF, Junior HM. Eur J Pharmacol. 2013 Jan 30;700(1-3):201-9
- Quercetin decreases inflammatory response and increases insulin action in skeletal muscle of ob/ob mice and in L6 myotubes. Anhê GF, Okamoto MM, Kinote A, Sollon C, Lellis-Santos C, Anhê FF, Lima GA, Hirabara SM, Velloso LA, Bordin S, Machado UF. Eur J Pharmacol. 2012 Aug 15;689(1-3):285-93.
- The regulation of Rasd1 expression by glucocorticoids and prolactin controls peripartum maternal insulin secretion. Lellis-Santos C, Sakamoto LH, Bromati CR, Nogueira TC, Leite AR, Yamanaka TS, Kinote A, Anhê GF, Bordin S. Endocrinology. 2012 Aug;153(8):3668-78
- Fructose-inducedhypothalamic AMPK activationstimulateshepatic PEPCK andgluconeogenesisduetoincreasedcorticosteronelevels.Kinote A, Faria JA, Roman EA, Solon C, Razolli DS, Ignacio-Souza LM, Sollon CS, Nascimento LF, de Araújo TM, Barbosa AP, Lellis-Santos C, Velloso LA, Bordin S, Anhê GF. Endocrinology. 2012 Aug;153(8):3633-45.



Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

# CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "<u>Estudo do efeito da ativação da AMPK</u> <u>hipotalâmica induzida por frutose sobre a modulação da gliconeogênese e</u> <u>expressão da PEPCK no figado em ratos wistar</u>" (protocolo nº <u>3117-1</u>), sob a responsabilidade de <u>Prof. Dr. Gabriel Forato Anhê / Andrezza Pinheiro Bezerra</u> <u>De M. Kinote</u>, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em <u>12 de agosto de</u> <u>2013</u>.

Campinas, 12 de agosto de 2013.

gwp

CEUA/Unicamp

and quardel

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo Presidente

Fátima Alonso Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/ceea/