
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE

**EXERCÍCIO FÍSICO NA PREVENÇÃO E NO TRATAMENTO DA
SÍNDROME METABÓLICA: UM MODELO EXPERIMENTAL COM RATOS**

RODRIGO FERREIRA DE MOURA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Motricidade

Outubro - 2010



RODRIGO FERREIRA DE MOURA

EXERCÍCIO FÍSICO NA PREVENÇÃO E NO TRATAMENTO DA SÍNDROME
METABÓLICA: UM MODELO EXPERIMENTAL COM RATOS

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciências da Motricidade.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Alice Rostom de Mello

Rio Claro
2010



RODRIGO FERREIRA DE MOURA

**EXERCÍCIO FÍSICO NA PREVENÇÃO E NO TRATAMENTO DA SÍNDROME
METABÓLICA: UM MODELO EXPERIMENTAL COM RATOS**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Motricidade.

Comissão Examinadora

Dra. Maria Alice Rostom de Mello
Dra. Márcia Queiroz Latorraca
Dra. Camila Aparecida Machado de Oliveira
Dra. Eliete Luciano
Dr. Eduardo Kokubun

Rio Claro, 25 de outubro de 2010.

APOIO FINANCEIRO

FAPESP

Processo 2007/54098-0

Doutorado no País

CAPES

Processo 4660-08-0

Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior

DEDICATÓRIA

À Dra. Marcia Casela (*in memoriam*) por ensinar que para enxergar a mim mesmo e o mundo, na exata proporção de quem somos, os olhos devem estar voltados para o Alto.

Agradecimento

Aos meus pais José e Cícera, pelo incentivo e amor, por me ensinarem através do exemplo, que o trabalho é sempre uma benção.

Aos meus irmãos Dimas e Danila, aos meus sobrinhos Bruno e Vitor e à minha cunhada Adriana, pelo apoio e carinho. É muito reconfortante saber que posso contar com vocês a qualquer momento.

À Natália Oliveira, pelo amor, pela presença constante, pelo incentivo nos momentos difíceis e pela valiosa ajuda nos experimentos. Admiro muito seu esforço em tudo e tenho muito orgulho de ser seu namorado.

Ao José Alexandre C. Leme, pela amizade. Oxalá todas as pessoas pudessem ser um pouquinho iguais você, tenho certeza que o mundo seria um lugar bem melhor.

À Camila Oliveira pela ajuda nos momentos difíceis da vida pessoal e acadêmica, mas principalmente pela amizade verdadeira.

À Priscila Nakamura pela amizade e cuidado de irmã ao longo de tantos anos. À Camila Papini por, juntamente com a Priscila, me hospedarem em sua casa durante minha fase *homeless*.

Ao André Gurjão pela amizade e colaborações. Admiro muito você e torço sempre. *"Failure is not an option"*.

Ao Renê e Jean por serem o tipo de amigo que você sabe que pode contar a qualquer momento, mesmo estando há muito tempo sem ver.

Ao José Diego e Marcelo C. Jr pela inestimável ajuda no cuidado dos animais e condução de experimentos.

Ao Leandro e Michel pela amizade e colaborações acadêmicas, torço muito por vocês.

Aos colegas de laboratório, (ex) alunos das professoras Maria Alice e Eliete: Clécia, Carla, Lucieli, Carol, Fúlvia, Fabrício, Rodrigo e Luciana, pelas contribuições ao longo desse período. Aos (ex) alunos do professor Cláudio Gobatto: Gustavo, Ivan, Beck, Pedro, Alessandro e Cláudio. Aos (ex) alunos do professor Eduardo: Fábio, Gléber, Américo, Inaian, Grace e Rose.

Aos técnicos do laboratório Clarice, Beto e China, pela amizade e por possibilitarem o desenvolvimento desse trabalho.

O meu muito obrigado à professora Maria Alice por aceitar me orientar e por fazer tudo ao seu alcance para que eu pudesse crescer o máximo possível academicamente.

À professora Eliete pelas aulas na graduação e pós-graduação, por estar sempre disposta a discutir uma idéia e pelo exemplo de dignidade.

Ao professor Eduardo Kokubun pela orientação na iniciação e no mestrado, pela forma de ver e transmitir ciência, sempre estimulando o raciocínio crítico.

Aos meus professores da graduação e pós-graduação: Cláudio Gobatto, Sebastião e Lilian Gobbi, Angelina Zanesco e Afonso Machado pelos ensinamentos e apoio.

Ao Prof. Dr. Décio Eizirik da Universidade Livre de Bruxelas, por me aceitar para o doutorado sanduíche e possibilitar que eu aprendesse muitas técnicas, mas principalmente um crescimento como pessoa.

À Dra. Miriam Cnop pela orientação e confiança depositada durante o doutorado sanduíche, e por fazer questão que eu tivesse a oportunidade de aprender o máximo possível.

À Fernanda Ortis e Alexandre pela amizade e por todas as vezes que me ajudaram em Bruxelas, desde o primeiro até o último dia.

Ao Maikel Colli por aceitar dividir o apartamento, pela amizade e ensinamentos;

Ao Daniel Cunha pela amizade, pelas técnicas ensinadas e principalmente pela paciência;

Ao Florent "*Bon jour mon ami*" e Esteban pela amizade...(Ok, ok Esteban "I'm not your friend! Buddy...");

À Alessandra e Ziad pela amizade e acolhida, desejo tudo de bom para vocês e sua família;

Por fim, agradeço a Deus por me dar forças para buscar meus objetivos, pelo conforto nos momentos de angústia, pela força nos momentos de fraqueza e pela valiosa lição de que para todas as coisas há o tempo exato para que elas se concretizem.

Ensino

*Minha mãe achava estudo
a coisa mais fina do mundo.
Não é.
A coisa mais fina do mundo é
o sentimento.
Aquele dia de noite, o pai
fazendo serão,
ela falou comigo:
"Coitado, até essa hora no
serviço pesado".
Arrumou pão e café, deixou
tacho no fogo com água
quente.
Não me falou em amor.
Essa palavra de luxo.*

(Adélia Prado)

RESUMO

O objetivo do trabalho foi verificar a eficácia de um protocolo de indução da Síndrome Metabólica, baseado em uma dieta rica em frutose, no estudo dos efeitos do exercício físico de natação em ratos. O trabalho foi dividido em quatro estudos principais, visando verificar a) as influências da idade e da via de administração da frutose, diluída na água de beber ou através de dieta; b) os efeitos agudos de uma sessão de exercício na tolerância à glicose, no perfil lipídico e no metabolismo muscular da glicose após ingestão de dieta rica em frutose durante 8 semanas; c) os efeitos crônicos do exercício físico na resistência à insulina, no perfil lipídico sanguíneo e no metabolismo muscular da glicose após 12 semanas de treinamento e dieta; d) avaliar a resistência à insulina, perfil lipídico e expressão das proteínas Akt e AMPK envolvidas na sinalização para captação de glicose e balanço energético. No primeiro estudo observou-se que ratos Wistar adultos são mais suscetíveis a um número maior de alterações metabólicas, quando submetidos à frutose através da ração, mas não apresentam alterações através da ingestão com água. No segundo estudo observou-se nos ratos frutose, após uma sessão de exercício físico, melhora na cinética de captação da glicose durante o GTT, também aumentos na captação muscular de glicose e de síntese de glicogênio. No terceiro estudo os efeitos crônicos do exercício evidenciaram menores depósitos de gordura mesentérico e subcutâneo, independente da dieta. A taxa de produção de lactato pelo músculo sóleo foi diminuída no grupo frutose treinado, mas a captação de glicose não foi maior em comparação com seu par sedentário. No quarto estudo, observou-se melhor sensibilidade à insulina e menores concentrações séricas de ácidos graxos livres, no animais frutose treinados. Evidenciou-se maior expressão da forma ativa/fosforilada da AMPK no fígado dos animais treinados, mas não houve diferença no gastrocnêmio. Conclui-se que a frutose apresenta melhor indução de distúrbios metabólicos quando aplicada a ratos adultos e através da dieta. O exercício físico agudo promove melhoras na cinética de captação da glicose sanguínea e em músculo incubado. Os efeitos da melhora de captação de glicose no músculo não são evidentes após 12 semanas de treinamento e 60 horas de repouso. Após treinamento de quatro semanas, ratos adultos treinados apresentam maior expressão proteica da fosfo-AMPK no fígado, têm AGL sérico reduzido e melhoram a resistência à insulina.

Palavras chave: Síndrome Metabólica. Resistência à Insulina. Frutose. Exercício.

ABSTRACT

The aim of the present work was to verify the efficacy of one Metabolic Syndrome-induced protocol, based on a fructose-rich diet, on the study of swimming physical exercise effects in rats. The work had been divided in four main studies aiming to verify: a) the influences of the age and the way of fructose administration, diluted in the drinking water or through the diet; b) the acute effects of one exercise session on the glucose tolerance, blood lipid profile and in the muscular glucose metabolism after fructose-rich diet ingestion during 8 weeks; c) the physical training chronic effects on insulin resistance, blood lipid profile and muscular glucose metabolism after 12 weeks of training and diet; d) to evaluate the insulin resistance, lipid profile and Akt, AMPK protein expression, involved in the signaling to glucose uptake and energy balance. In the first study it had been observed that adult Wistar rats are more susceptible to a greater metabolic alterations number, when submitted to fructose diet through the food, but do not present alterations through water dilution ingestion. In the second study, it had been observed in the fructose-fed rat, after one single session of physical exercise, improvement in the glucose uptake kinetics during the GTT, also improvement on muscular glucose uptake and glycogen synthesis. In the third study the chronic exercise effects showed smaller mesenteric and subcutaneous fat depots mass, independent of the diet. The lactate production rate by the solear muscle was diminished in the fructose-fed trained group, but the glucose uptake rate was not bigger than the sedentary pair. In the fourth study, improvement in the insulin sensitivity and smaller free fat acids serum concentrations was observed in the fructose-fed trained animal. Greater phospho/active AMPK expression in the liver, but not on gastrocnemius of fructose-fed trained rat. In conclusion, the fructose-diet presents better metabolic alterations induction when applied to adult rats through the food. The acute exercise promotes improvement in the blood glucose uptake kinetics and in the incubated muscle. The glucose uptake improvement effects in the muscle are not evident in 12 weeks trained rats, after 60 hours of rest. After four weeks training program, adult trained rats present greater phospho-AMPK protein expression in the liver, diminished free fat acids serum concentrations and improvement in the insulin sensitivity

Keywords: Metabolic Syndrome. Insulin resistance. Fructose. Exercise.

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO	11
OBJETIVOS	13
REVISÃO DE LITERATURA.....	13
Definição de Síndrome Metabólica	13
Atividade física, obesidade e resistência à insulina	16
MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
RESULTADOS.....	26
Artigo 1	28
Sinais de Síndrome Metabólica em ratos Wistar submetidos a diferentes protocolos de elevada ingestão de frutose	28
Artigo 2	43
Capacidade aeróbia de ratos alimentados com dieta rica em frutose.....	43
Artigo 3	57
Efeitos do exercício físico no metabolismo da glicose em músculo esquelético de ratos alimentados com dieta rica em frutose.....	57
Artigo 4	79
Influencia do treinamento físico na resistência à insulina de ratos alimentados com dieta rica em frutose.....	79
DISCUSSÃO GERAL.....	95
CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS	99
APÊNDICE I.....	105
APÊNDICE II.....	135
APÊNDICE III	142

INTRODUÇÃO

O aumento na ingestão de frutose a partir da década de 1970 tem sido correlacionado com a prevalência da obesidade e alterações metabólicas associadas (ELLIOT et al., 2002). Dentre as alterações correlatas um espectro de distúrbios peculiares é classificado como Síndrome Metabólica, a qual inclui resistência à insulina, intolerância à glicose, hipertrigliceridemia e baixas concentrações da fração HDL do colesterol (ALBERTI e ZIMMET, 1998; BALKAU e CHARLES, 1999). Embora exista divergência na literatura sobre a importância clínica da Síndrome Metabólica (KAHN et al., 2005), alega-se que seu diagnóstico está associado a um risco aumentado, em cerca de duas a cinco vezes, para o desenvolvimento de diabetes do tipo 2 e acidentes vasculares coronarianos (GRUNDY et al., 2005; LAKKA et al., 2002).

Em estudo do final da década de 90, composto de 8814 indivíduos de diferentes etnias, a prevalência da síndrome nos Estados Unidos era de 23.7%. A estratificação por idade demonstrou que a prevalência era de 6.7% em indivíduos com idade entre 20 e 29 anos até 43,5% em pessoas com idade acima de 60 anos. A partir de tais dados estimou-se que mais de 47 milhões de pessoas já eram portadoras dessa doença (FORD et al., 2002).

Inicialmente sugerida como uma alternativa saudável à glicose ingerida por pacientes diabéticos, a frutose revelou-se mais tarde uma opção que poderia trazer distúrbios metabólicos importantes. Sua baixa capacidade em estimular a liberação de insulina, a independência desse hormônio para sua absorção, e sua alta palatabilidade são ótimos argumentos para sua introdução na dieta desses pacientes. Entretanto, um efeito adverso que acompanha a ingestão de quantidades elevadas de frutose é o aumento nos triglicerídeos hepáticos, séricos e intramuscular, no colesterol total e em sua fração LDL. Esse quadro de dislipidemia é altamente correlacionado à resistência periférica à insulina (HALLFRISCH et al., 1990).

Apenas recentemente, o mecanismo molecular associado à resistência à insulina promovido por dieta rica em frutose foi demonstrado. O gene PGC-1 β (Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 β) foi descrito como o principal responsável na patogênese da resistência à insulina induzida pela frutose. PGC-1 β promove aumento na expressão do gene SREBP (*Sterol regulatory element-binding proteins*) e outros genes envolvidos na via lipogênica. Ratos submetidos a procedimentos de interferência de RNA (RNAi), através da administração de PGC-1 β antissense, não apresentaram resistência à

insulina quando expostos a dietas ricas em frutose (NAGAI et al., 2009). Os autores também demonstraram que o mecanismo é diferente pelo qual dietas ricas em gorduras saturadas promovem a resistência à insulina.

Até o momento não existe uma droga única capaz de atacar todos os distúrbios da Síndrome Metabólica. Normalmente o tratamento envolve várias drogas, o que pode aumentar também a incidência de efeitos colaterais, além dos gastos de saúde pública. Porém, a literatura é densa em demonstrar efeitos benéficos da atividade física na prevenção e no tratamento de cada um dos componentes isolados da síndrome (HOLLOSZY, 1986; THOMPSON et al., 2001), bem como na redução do risco de seus produtos finais, o diabetes tipo 2 (CARRIER, 2009) e acidentes cardiovasculares (AIJAZ et al., 2010).

Uma única sessão de atividade física é capaz de promover aumento na sensibilidade à insulina. A contração muscular provoca aumento na translocação do transportador de glicose GLUT4 para a membrana celular, aumentando a captação de glicose (HOLLOSZY, 2005). Efeitos crônicos do exercício físico na sensibilidade à insulina são mais fortemente pronunciados com a diminuição, concomitante, do tecido adiposo (THOMPSON et al., 2003).

Lee et al. (2005), reportaram que indivíduos com capacidade aeróbia mais alta apresentavam menor risco de desenvolver a Síndrome Metabólica. De fato, foi demonstrado que valores de VO_{2max} acima de $35 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ estavam associados a um risco 75% menor em comparação com valores abaixo de $29 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e que indivíduos fisicamente ativos no tempo de lazer reduziam pela metade o risco em comparação com sedentários (LAAKSONEN et al., 2002). Entretanto, estudos controlados e com aleatoriedade de amostra, sobre o efeitos dos exercícios sobre a Síndrome Metabólica são escassos (CAMHI et al., 2010).

Nesse sentido, modelos animais capazes de mimetizar as respostas fisiológicas humanas podem auxiliar na investigação dos efeitos do exercício físico sobre a doença. Roedores submetidos a dieta rica em frutose desenvolvem os sinais clássicos da síndrome (SHARABI et al., 2007; HWANG et al., 1987; LEE et al., 2006). Essa característica permite que essa dieta seja empregada como modelo experimental da síndrome metabólica e o uso de animais permite um desenho experimental com maior rigor no controle das variáveis e pressupostos, bem como a possibilidade de análises mais invasivas.

OBJETIVOS

Geral

Na busca de um modelo experimental adequado à investigação do papel do exercício na prevenção e no tratamento da síndrome metabólica, o presente estudo visa analisar características metabólicas de ratos alimentados com dieta rica em frutose, submetidos ou não ao treinamento físico de caráter aeróbio, em diferentes épocas da vida.

Específicos

1. Analisar aspectos metabólicos de ratos Wistar alimentados com dieta rica em frutose do desmame (28 dias) à idade adulta (120 dias): tolerância à glicose e sensibilidade periférica à insulina; peso do tecido adiposo de diferentes regiões; concentrações séricas de glicose, insulina, triglicerídeos, colesterol total, colesterol HDL e colesterol LDL, assim como captação e oxidação de glicose, síntese de glicogênio e produção de lactato pelo músculo sóleo isolado;
2. Determinar a transição metabólica aeróbia/anaeróbia individual desses animais durante exercício de natação pelo protocolo da Máxima Fase Estável de Lactato;
3. Verificar os efeitos de uma sessão única de exercício (exercício agudo) realizada na intensidade da transição metabólica sobre os aspectos metabólicos acima relacionados;
4. Avaliar os efeitos do treinamento físico na intensidade da transição metabólica aeróbia/anaeróbia, iniciado precocemente (28 dias de idade), sobre o condicionamento aeróbio dos animais e na prevenção da instalação de possíveis alterações metabólicas induzidas pela dieta.
5. Avaliar os efeitos terapêuticos do treinamento físico, iniciado tardiamente (130 dias), em intensidade equivalente a 80% da transição metabólica aeróbia/anaeróbia, no tratamento das alterações metabólicas instaladas em decorrência da dieta.

REVISÃO DE LITERATURA

Definição de Síndrome Metabólica

A definição de síndrome metabólica, atualmente em vigor, foi proposta pela Federação Internacional de Diabetes (IDF) (2005) e estabelece os seguintes critérios para diagnóstico: Obesidade central (inferida pela circunferência da cintura) e mais duas alterações dentre hipertrigliceridemia (>150 mg/dL), baixo HDL-colesterol (≤ 40 mg/dL para homens e ≤ 50 mg/dL para mulheres), hipertensão sistólica (≥ 135 mmHg) ou diastólica (≥ 85 mmHg) e hiperglicemia em jejum (≥ 100 mg/dL). A circunferência da cintura deve ser avaliada de acordo com a etnia (Quadro 1).

Quadro 1. Especificidade da circunferência da cintura de acordo com a etnia.

Etnia	Homens	Mulheres
Europeus	94 cm	80 cm
Sul-asiáticos/Chineses	90 cm	80 cm
Sul-americanos/Africanos	90 cm	80 cm
Japoneses	85 cm	80 cm

O delineamento da definição atual pode ser considerado um esforço para aprimorar propostas anteriores de diferentes grupos. Inicialmente, as alterações metabólicas na glicemia, lipemia e hipertensão arterial foram associadas à resistência a insulina e correlacionadas com o risco de doenças ateroscleróticas (REAVEN, 1988). Deve-se ressaltar que a resistência à insulina e não a obesidade central, como constata-se atualmente, havia sido estabelecida como o fator principal. De fato a obesidade não foi sequer mencionada na descrição da então denominada Síndrome X. Mais tarde, porém, o autor expandiu a definição da síndrome e acrescentou a obesidade como um dos fatores (REAVEN, 1993).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) (ALBERTI e ZIMMET, 1998) também utilizou a resistência à insulina como fator principal associado a pelo menos duas outras alterações, dentre índice de massa corporal (IMC; > 30 kg/m²), relação cintura-quadril (RCQ; $> 0,90$ para homens e $> 0,85$ para mulheres), hipertrigliceridemia (≥ 150 mg/dL), baixo HDL-colesterol (< 35 mg/dL para homens e < 39 mg/dL para mulheres), hipertensão arterial (> 160 para sistólica e > 90 para diastólica), taxa de excreção urinária de albumina (≥ 20 mg/min ou alb/cr ≥ 30 mg/g).

No ano seguinte o Grupo Europeu para Estudo da Resistência à Insulina (EGIR) (BALKAU e CHARLES, 1999) propôs alterações na definição divulgada pela OMS. A resistência à insulina continuou sendo o fator impreterível para o diagnóstico, caracterizada por elevado valor na insulinemia em jejum (acima do 75º. percentil da população) associada a duas outras alterações dentre obesidade abdominal (94 cm para homens e 80 cm para mulheres), elevada concentração sérica de triglicerídeos (≥ 150 mg/dL), baixos valores de HDL-colesterol (< 39 mg/dL para homens e mulheres), hipertensão ($\geq 140/90$ mmHg) e hiperglicemia sem a ocorrência de diabetes. Essa definição realça a importância da obesidade abdominal, mas não caracteriza o diabetes como critério para diagnóstico. Essa exclusão deve-se ao fato de a síndrome ser primeiramente entendida como fator de risco para o desenvolvimento do diabetes. Adicionalmente, o EGIR preferiu o termo síndrome da resistência à insulina em detrimento de síndrome metabólica.

O Programa Nacional para Tratamento e Educação de Adultos sobre o Colesterol - Painel III (ATP III), também divulgou uma definição no início deste século (2001). Ao contrário das outras definições não há um parâmetro principal em destaque, bastando somente a identificação de três fatores dentre os cinco a seguir: elevada circunferência de cintura (≥ 102 cm para homens e ≥ 88 cm para mulheres), hipertrigliceridemia (≥ 150 mg/dL), baixo HDL colesterol (< 40 mg/dL em homens e < 50 mg/dL em mulheres), hipertensão arterial ($\geq 130/85$ mmHg) e hiperglicemia (≥ 110 mg/dL). Pode-se observar um ponto de corte mais alto para a medida de circunferência de cintura em relação a definição da IDF a despeito da etnia.

A Associação Americana do Coração conjuntamente ao Instituto Nacional do Coração, Pulmão e Sangue (AHA-NHLBI) manifestou-se a favor do critério proposto pelo ATP III devido à maior facilidade de identificação dos critérios na prática clínica (GRUNDY *et al.*, 2005). Porém sugeriu a mudança no limite superior da glicemia em jejum de 110 para 100 mg/dL. O grupo defende que a manutenção do diagnóstico de quaisquer três, dentre os cinco fatores de risco propostos seria melhor do que destacar um deles em específico.

Na verdade essa síndrome já recebeu outros nomes além dos já citados, como quarteto mortal (KAPLAN, 1989) e cintura hipertrigliceridêmica (LEMIEUX *et al.*, 2000). A dificuldade em consolidar a definição da síndrome provoca discrepâncias e incertezas a respeito do real impacto desse distúrbio nas diferentes populações, de maneira que as políticas públicas de saúde podem ficar comprometidas.

Alguns autores defendem que os componentes da Síndrome metabólica deveriam ser tratados separadamente (KAHN *et al.*, 2005; GALE, 2005), pois não haveria comprovação de que o fator de risco da Síndrome para doenças cardiovasculares fosse maior do que o somatório das alterações encontradas. Entretanto, Grundy (2006) defende que a importância do diagnóstico da Síndrome metabólica reside na escolha do tratamento a ser implantado. Segundo o autor, a melhor maneira de tratar o problema é promover alterações no estilo de vida pertinente à alimentação e sedentarismo e apenas em quadros mais graves adicionar o tratamento medicamentoso. A intervenção com medicamentos para os distúrbios de forma isolada pode não contribuir para a melhora do quadro geral e diminuição do risco de desenvolver Diabetes ou doenças cardiovasculares. Ainda, o efeito somatório dos distúrbios não poderia ser computado de forma linear, de modo que, os componentes da Síndrome somam-se de forma geométrica e apresentam um fator de risco final muito maior (GRUNDY, 2006).

Existem evidências suficientes para afirmar que a atividade física promove alterações benéficas na saúde dos indivíduos. Contrariamente ao tratamento farmacológico a atividade física pode ser capaz de atuar, simultaneamente, em todos os componentes da Síndrome Metabólica.

Atividade física, obesidade e resistência à insulina

A obesidade é um importante problema de saúde caracterizada pelo excesso de gordura corporal. Essa doença aumenta os fatores de risco para doenças cardiovasculares, diabetes tipo II, alguns tipos de câncer e morte (HASLAM e JAMES, 2005). Mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo são obesas e projeções para o ano 2030 estimam o dobro, ou ainda, o quádruplo desse número, caso a tendência secular continue inalterada (KELLY *et al.*, 2008). Na obesidade, o balanço energético entre a ingestão e o gasto calórico é alterado, de modo a favorecer o armazenamento de energia como tecido gorduroso (FLIER, 2004). Com exceção de alguns casos raros exclusivamente genéticos, sabe-se que há forte influência do ambiente combinada a fatores genéticos que predis põem à doença.

Vários estudos têm demonstrado a diminuição da massa e gordura corporal através da atividade física (ANDERSEN *et al.* 1999; SARIS *et al.* 2003) e alguns demonstraram que o volume de energia dispendida apresenta uma maior associação com a perda de gordura, do que a intensidade do exercício (IRWIN *et al.* 2003; SLENTZ *et al.* 2004).

Ericksson et al. (1997) relataram que, no tratamento da obesidade, a restrição calórica isoladamente, promove uma redução da taxa metabólica de repouso. A longo prazo o processo de perda de peso se torna ineficiente. Em contrapartida, o exercício físico promove aumento na taxa metabólica de repouso (TREMBLAY *et al.*, 1988; HUNTER *et al.*, 1998), através de elevação na síntese proteica, oxidação de substratos e atividade das catecolaminas (HORTON, 1985; HUNTER *et al.*, 1998). Assim, a combinação da atividade física com programas adequados de restrição calórica podem promover melhores resultados a longo prazo.

Ratos recém nascidos foram induzidos a ganho de peso, através de redução no número de filhotes por mãe, durante o período de amamentação. Após sete semanas do nascimento os animais iniciaram um programa de exercício leve em esteira com duração de 1 hora/dia, 5 dias/semana, durante 9 semanas. O exercício promoveu diminuição da massa corporal e menor deposição de gordura visceral em comparação com seus pares sedentários (DANTAS et al., 2010).

Estudos epidemiológicos reforçam os benefícios da pratica regular de atividade física para a prevenção da obesidade, em contraposição a atividades sedentárias como trabalhar no computador (COAKLEY et al., 1998). Também relatou-se associação direta entre inatividade física e obesidade, relação inversa entre atividade física, razão cintura-quadril e circunferência da cintura e índice de massa corpórea (LAKKA *et al.*, 2003).

Segundo recomendações do Colégio Americano de Medicina do Esporte, um mínimo de 30 minutos de atividade física moderada por dia devem ser praticadas para prevenir a obesidade e doenças associadas (AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2001)

Em condições normais, a capacidade do organismo em manter concentrações plasmáticas de glicose variando de 70mg/dL a aproximadamente 120 mg/dL, deve-se à ação da insulina. Esse hormônio regula a captação de glicose nos tecidos muscular e adiposo e impede a glicogenólise no fígado. Há mais de duas décadas a resistência à insulina, caracterizada pela captação diminuída de glicose nos tecidos adiposo e muscular, tem sido associada à obesidade, hipertensão e doenças cardiovasculares (REAVEN, 1988). Esse distúrbio normalmente é detectado antes de se evidenciar um quadro de hiperglicemia e seu diagnóstico pode ajudar a prevenir a instalação do diabetes tipo 2.

Uma sessão aguda de atividade física pode promover aumento na sensibilidade à insulina em indivíduos saudáveis, mas também em pessoas resistentes à insulina e portadores de diabetes tipo 1 e 2 (MILLER *et al.*, 1994).

Os efeitos de uma sessão de atividade física na sensibilidade à insulina se estendem por um período de até 48 a 72 horas (HOLLOSZY *et al.*, 1986). Assim, a atividade física necessita uma prática regular para a manutenção desse efeito. Porém, seus efeitos não são apenas agudos. Foi demonstrado que após seis semanas de treinamento o aumento na sensibilidade à insulina era aproximadamente o dobro em comparação com uma sessão aguda anterior ao treinamento (PERSGHINET *et al.*, 1996).

Em estudo com pacientes diabéticos tipo 2 demonstrou-se que o percentual de translocação do transportador de glicose GLUT4 para a membrana plásmatica foi similar ao observado em indivíduos saudáveis (KENNEDY, 1999).

Nos últimos anos os complexos mecanismos moleculares da captação de glicose em condição saudável ou patológica têm sido elucidados. De modo simplificado, sabe-se que a translocação do GLUT4 para membrana plasmática é iniciada em uma cascata de reações iniciada com a ligação da insulina ao seu receptor de membrana. A seguir a fosforilação em tirosina dos substratos do receptor de insulina (IRS) dá seguimento à sinalização com a ativação do eixo PI-3 kinase/Akt com subsequente aumento na translocação de GLUT4 (SALTIEL e KAHN, 2001). Em estudo com ratos, tratados com dieta rica em ácidos graxos, foi demonstrado resistência à insulina associada com a fosforilação em serina dos IRS. Porém, após uma sessão de atividade física observou-se o reestabelecimento do padrão normal de ativação dos IRS juntamente com melhora na sensibilidade à insulina (ROPELLE *et al.* 2006).

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e seu tratamento

O estudo foi realizado com ratos da linhagem Wistar, recém desmamados, e mantidos em gaiolas coletivas, a temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$ e em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com livre acesso a água e ao alimento. O peso corporal e as ingestões alimentar e hídrica foram registrados, uma vez por semana, ao longo do experimento. Todos os

experimentos realizados foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Fundação Hermínio Ometto (processo número: 068/2008)

Tratamento dietético

Durante o experimento, o alimento consistiu de dietas semipurificadas balanceada ou rica em frutose, conforme composição descrita no quadro 1.

Quadro 2. Composição das dietas.

Componentes (g/kg)	Balanceada ¹	Rica em frutose (60%)
Caseína ²	202	202
Amido	397	-
Dextrina	130,5	-
Sacarose	100	27,5
Frutose	-	600
L-cistina	3	3
Óleo de soja	70	70
Mistura de sais (AIN-93GMX) ¹	35	35
Mistura de vitaminas (AIN-93GVX) ¹	10	10
Fibra	50	50
Cloridrato de colina	2,5	2,5

1. De acordo com American Institute of Nutrition (REEVES et al., 1993).

2. Valores corrigidos em função do conteúdo de proteína na caseína.

Delineamento e grupos experimentais

Para investigar os objetivos propostos, foram realizadas quatro séries de experimentos: o primeiro buscou comparar diferentes protocolos de administração da frutose, em ratos jovens e adultos, para a indução da síndrome metabólica; o segundo visou avaliar os efeitos da ingestão de dieta rica em frutose na capacidade aeróbia de ratos jovens; no terceiro experimento, avaliou-se os efeitos agudos e preventivos do exercício físico crônico sobre os aspectos metabólicos de animais jovens submetidos à dieta de frutose; no quarto experimento, investigou-se os efeitos terapêuticos do exercício crônico aplicado após algumas semanas de exposição à dieta.

Avaliação do protocolo dietético

Para avaliação do protocolo dietético a ser adotado três séries separadas de experimento foram conduzidas. Na primeira delas, ratos Wistar adultos (90 dias de idade), alimentados com ração regular para roedores, foram submetidos à ingestão de frutose, durante 8 semanas, através de sua diluição na água de beber, numa concentração igual a 10%; No segundo protocolo ratos Wistar adultos foram submetidos à dieta de frutose, durante 4 semanas, através de ração semipurificada constituída de 60% de frutose, o grupo controle recebeu dieta balanceada AIN-93G (REEVES *et al.*, 1993); No terceiro protocolo ratos jovens (28 dias) foram analisados com ingestão de frutose constituindo 60% da ração, durante oito semanas, o grupo controle também recebeu dieta balanceada AING-93G. Após o período experimental os animais foram submetidos a testes de tolerância à glicose e insulina. Os animais foram mortos por decaptação e os parâmetros bioquímicos do sangue, depósitos de gordura e os lipídeos totais do fígado foram analisados.

Avaliação da capacidade aeróbia

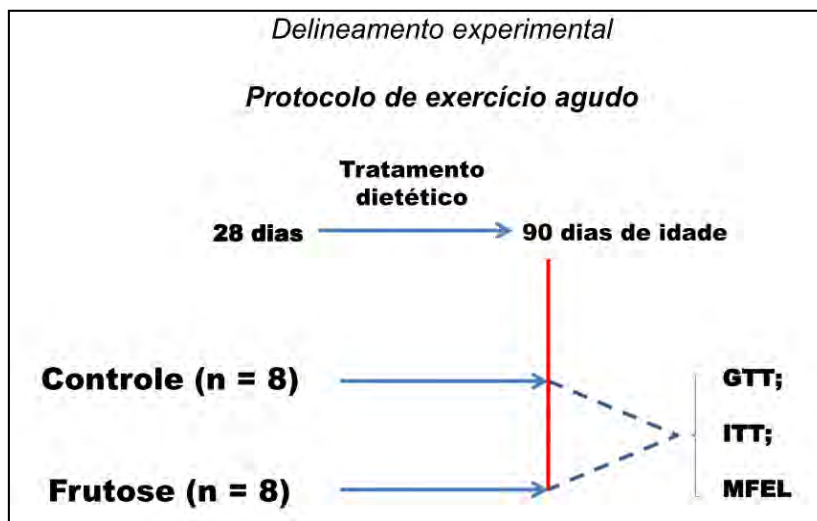
Nessa série de experimentos, ratos alimentados com as dietas balanceada e rica em frutose dos 28 aos 90 dias de idade e mantidos sedentários, foram adaptados ao meio líquido e tiveram a transição metabólica aeróbia/anaeróbia durante exercício de natação determinada pelo protocolo da máxima fase estável de lactato (MFEL). A capacidade aeróbia dos animais foi inferida como a carga de trabalho correspondente à MFEL. Transcorridas 48 horas, os animais foram mortos, por decapitação, para avaliação do perfil lipídico e glicêmico. Como controles foram empregados ratos alimentados com dieta balanceada, submetidos aos mesmos procedimentos.

Protocolo de exercício agudo e crônico preventivo

Agudo

Nessa série de experimentos, ratos alimentados com as dietas balanceada e rica em frutose dos 28 aos 90 dias de idade e mantidos sedentários, foram adaptados ao meio líquido e tiveram a transição metabólica aeróbia/anaeróbia durante exercício de natação determinada pelo protocolo da MFEL. Em seguida, foram submetidos a uma sessão de 30 minutos de natação, na intensidade da transição metabólica individual, para avaliação imediata de: tolerância à glicose (teste de tolerância à glicose oral). Transcorridas 48 horas, metade dos animais foi sacrificado, imediatamente, após uma sessão de 30 minutos de natação e a outra, em repouso, para avaliação do perfil lipídico e do metabolismo da

glicose pelo músculo sóleo isolado (captação e oxidação de glicose, síntese de glicogênio e produção de lactato). Como controles foram empregados ratos alimentados com dieta balanceada, submetidos aos mesmos procedimentos.



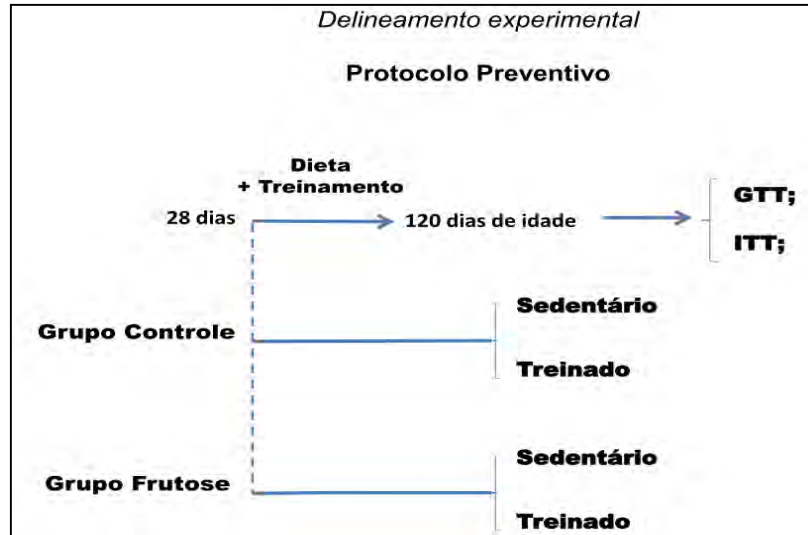
Crônico preventivo

Nessa série de experimentos, após adaptação ao meio líquido, animais alimentados com os dois tipos de dieta foram submetidos a testes de máxima fase estável de lactato (MFEL) para a identificação da transição metabólica aeróbia/anaeróbia durante exercício de natação aos 90 e 120 dias de idade. Metade dos animais alimentados com cada uma das dietas foi submetido ao treinamento por natação, a partir dos 28 dias, com intensidade equivalente a 5% do peso corporal. Aos 90 dias de idade a intensidade de exercício foi ajustada para a carga equivalente à transição metabólica individual. A outra metade dos animais permaneceu sedentária até o final do experimento (120 dias de idade). Para fins de adaptação similar à manipulação sofrida pelos animais treinados, os animais sedentários eram colocados em água rasa duas vezes por semana, durante 10 minutos. O impacto do treinamento na prevenção da instalação das alterações impostas pela dieta rica em frutose, tolerância à glicose, sensibilidade à insulina, perfil lipídico e metabolismo da glicose pelo músculo sóleo foi avaliado.

A separação dos grupos experimentais resume-se da seguinte maneira:

- **Controle:** alimentados com dieta balanceada (AIN-93G), mantidos sedentários;
- **Controle treinado:** alimentados com dieta balanceada e submetidos ao treinamento por natação, a partir dos 28 dias de idade;
- **Frutose:** alimentados com a dieta rica em frutose, mantidos sedentários;

- **Frutose treinado:** alimentados a dieta rica em frutose e submetidos ao treinamento por natação, a partir dos 28 dias de idade;



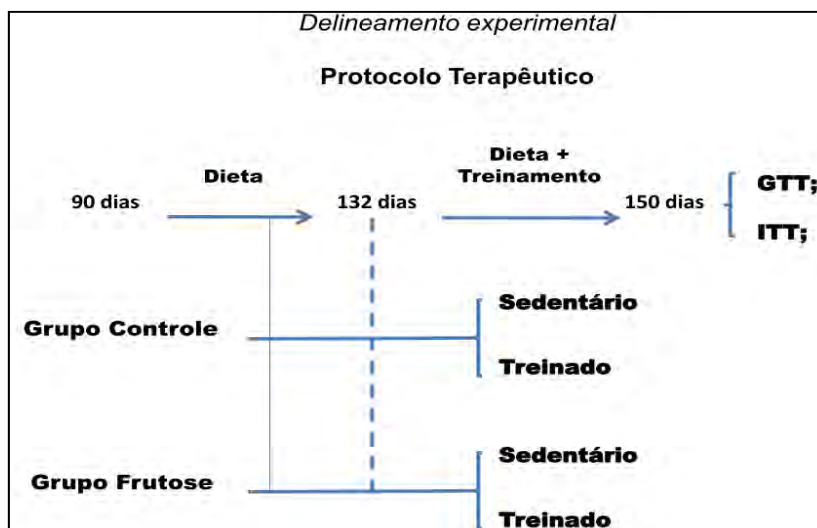
Protocolo de exercício crônico terapêutico

Nessa série de experimentos, ratos com idade de 90 dias foram submetidos à dieta controle ou rica em frutose. Decorridas seis semanas ao início do protocolo dietético, metade dos animais alimentados com cada uma das dietas foi submetido a testes de MFEL para a identificação da transição metabólica aeróbia/anaeróbia. Os animais permaneceram mais quatro semanas submetidos à dieta e ao treinamento por natação em intensidade equivalente a 80% da MFEL. A outra metade dos animais permaneceu sedentária até o final do experimento com adaptações à água rasa duas vezes por semana, durante cinco minutos. Ao final do experimento, após a décima semana, a tolerância à glicose, sensibilidade à insulina, perfil lipídico e expressão de proteínas envolvidas na sinalização da insulina foram avaliadas no gastrocnêmio e fígado.

A separação dos grupos experimentais resume-se da seguinte maneira:

- **Controle (C):** alimentados com dieta balanceada (AIN-93G), mantidos sedentários;
- **Controle treinado (CT):** alimentados com dieta balanceada e submetidos ao treinamento por natação em intensidade equivalente à 80% da MFEL a partir dos 132 dias de idade;
- **Frutose (F):** alimentados com a dieta rica em frutose, mantidos sedentários;

- **Frutose treinado (FT):** alimentados a dieta rica em frutose e submetidos ao treinamento por natação em intensidade equivalente à 80% da MFEL, a partir dos 132 dias de idade;



Adaptação ao nado

A adaptação ao nado ocorreu dentro de um período de uma semana, no mesmo tanque usado para o treinamento dos animais, com a temperatura da água mantida a $31 \pm 1^\circ\text{C}$. O intuito da adaptação foi reduzir o estresse dos animais sem, entretanto, promover adaptações fisiológicas decorrentes do treinamento. Inicialmente, os ratos foram inseridos em água rasa durante 15 minutos. No segundo dia, o nível da água foi aumentado, bem como o tempo de duração do esforço para 20 minutos. No terceiro dia os ratos nadaram em água profunda por 20 minutos. No quarto dia uma pequena bolsa vazia, confeccionada para abrigar as sobrecargas de chumbo, foi atada ao tórax dos animais enquanto realizavam o nado por 30 minutos. No quinto dia de adaptação os animais nadaram suportando um peso equivalente a 3% do peso corporal durante 30 minutos. Após um período de descanso de 48 horas iniciaram-se os testes de MFEL ou o treinamento com 5% do peso corporal para os animais de 28 dias.

Transição metabólica aeróbia/anaeróbia e avaliação do condicionamento aeróbio

A intensidade da transição metabólica aeróbia/anaeróbia dos animais, durante a natação, foi inferida através da MFEL sanguíneo. A MFEL equivale à mais alta concentração de lactato no sangue, durante exercícios com cargas constantes, de modo que,

a taxa de liberação desse metabólito na circulação é equilibrada com sua remoção (HECK *et al.*, 1985). A determinação da MFEL é um indicador útil para a prescrição de intensidades de exercício e avaliação do condicionamento aeróbio.

Para a determinação da MFEL utilizou-se o protocolo estabelecido por nosso grupo de pesquisa (GOBATTO *et al.*, 2001). Os animais foram submetidos a três testes de natação com intervalos de 48 horas entre eles. Em cada teste foi utilizado uma sobrecarga constante de chumbo, atada ao torax e relativa ao peso corporal. A duração de cada teste foi de 30 minutos ou até a exaustão do animal. A cada 5 minutos foram realizadas coletas de 25 µL de sangue da cauda dos animais, para a determinação das concentrações de lactato. A mais alta sobrecarga de trabalho, na qual ainda se observa estabilização do lactato sanguíneo é inferida como correspondente à MFEL. O critério empregado de estabilização do lactato sanguíneo foi uma diferença igual ou inferior a 1,0mM de lactato sanguíneo entre o 10º e 30º minutos de exercício. As concentrações de lactato sanguíneo foram determinadas pelo método enzimático e lidas em espectrofotômetro a 340 nm (ENGEL e JONES, 1978)

Treinamento físico

Os animais dos subgrupos treinados foram submetidos ao exercício de natação, em tanques individuais, contendo água a 31 ± 1 graus, 1 hora por dia, 5 dias por semana, suportando sobrecargas de chumbo atadas ao tórax, equivalentes ou relativas a 80% da transição metabólica aeróbia/anaeróbia individual, identificada pela MFEL.

Teste de tolerância à glicose - GTT

O teste de tolerância à glicose (GTT) foi realizado, na última semana do período experimental, após 15 horas de jejum. Uma primeira coleta de sangue foi feita através de corte na extremidade da cauda do animal (tempo 0). Em seguida, uma solução de glicose a 80% (2 g/kg de massa corporal) foi administrada aos ratos por sonda gástrica de polietileno. Amostras de sangue foram coletadas após 30, 60 e 120 minutos com capilares heparinizados e calibrados para 25 µL, visando a determinação das concentrações de glicose.

Teste de tolerância à insulina – ITT

O ITT foi realizado, via subcutânea ou intraperitoneal, 48 horas anteriormente ao GTT. Uma primeira coleta de sangue foi realizada através de corte na extremidade da cauda (tempo 0). Em seguida, foi administrada uma solução de insulina cristalina “LILLY U 40” na dose de 30 mU/100g de massa corporal do animal. Visando a determinação das concentrações de glicose, capilares heparinizados foram utilizados para coletar 25 µL de sangue aos 30, 60 e 120 minutos após a injeção, no protocolo com injeção subcutânea. No protocolo com injeção intraperitoneal a dosagem de insulina foi igual a 150 mU/100g. As coletas de sangue ocorreram nos tempos 0, 4, 8, 12 e 16 minutos.

A constante para o desaparecimento da glicose sanguínea (K_{ITT}) foi calculada através da fórmula $0.693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose sanguínea foi calculado a partir da inclinação da reta de regressão dos valores da concentração de glicose na fase de decaimento linear (BONORA et al., 1989).

As concentrações de glicose sanguínea inerentes ao GTT e ITT foram determinadas pelo método enzimático colorimétrico da glicose oxidase-peroxidase, com kit comercial (Laborlab). As amostras de sangue foram diluídas em 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 4%. Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm durante cinco minutos e o sobrenadante foi separado para dosagem. Após 15 minutos de incubação em banho à 37°C, as absorbâncias das amostras e do padrão foram lidas em espectrofotômetro a 505 nm.

Extração do material biológico

- Sangue

Ao final do experimento, os animais foram sacrificados por decaptação, 48 horas depois da última avaliação "in vivo", após jejum de uma noite e em repouso, sendo o sangue coletado para a separação do soro e dosagem de glicose, AGL, Colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, por métodos colorimétricos (NOGUEIRA *et al.*, 1990) e insulina por radioimunoensaio (HERBERT et al., 1965).

- Tecido adiposo

O tecido adiposo das regiões subcutânea posterior, mesentérica e retroperitoneal foi removido para pesagem e determinação das concentrações de lipídios totais. A excisão dos diferentes depósitos de gordura foi realizada de acordo com a descrição de Cinti (2005). As

concentrações de lipídios nesses depósitos foram determinadas pelo procedimento descrito por Nogueira *et al.* (1990).

- Músculo sóleo

O músculo sóleo da pata esquerda foi retirado para avaliação do metabolismo da glicose. Fatias musculares longitudinais pesando em torno de 25 - 35 mg foram incubadas em meio de Krebs-Ringer bicarbonato enriquecido com glicose (5,5 mM), contendo [U - ^{14}C] glicose (25 $\mu\text{Ci/mL}$), [^3H] 2-deoxiglicose (0,5 $\mu\text{Ci/mL}$) e insulina (100 mU/mL) dentro de frascos de vidro por 1 hora e meia e contínuo gaseamento com carbogênio O_2/CO_2 (95%/5%), sob agitação constante em banho-maria (37°C). O CO_2 liberado foi captado por hiamina 10x, colocada em aparato de vidro inserido no frasco supracitado. A captação de glicose foi avaliada utilizando-se a 2-deoxiglicose (2-DG) como marcador, e a incorporação do ^{14}C a glicogênio (síntese). A medida da quantidade de glicose oxidada foi realizada através da radioatividade do ^{14}C presente na hiamina. O lactato radioativo liberado no meio de incubação foi determinado por separação de metabólitos em coluna de troca iônica (Dowex-2, Sigma).

- Estatística

A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro Wilks, a homogeneidade de variância foi analisada através do teste de Bartlett. Os resultados foram analisados estatisticamente através de teste t-student ou pela Análise de Variância *two-way* (ANOVA), onde apropriado. Quando necessário foi utilizado teste *post hoc* de bonferroni. Em todas as análises, o nível de significância foi pré-estabelecido em $p < 0.05$.

RESULTADOS

Os resultados são apresentados na forma de quatro artigos:

Artigo 1: Desenvolvido com o intuito de verificar o efeito de diferentes protocolos de ingestão de frutose na indução da síndrome metabólica.

Metabolic Syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose diet protocols. **British Journal of Nutrition**, 2009 v. 101, p. 1178-84 – publicação online 14 de novembro 2008.

Autores: Rodrigo Ferreira de Moura, Carla Ribeiro, Juliana Aparecida de Oliveira, Eliane Stevanato e Maria Alice Rostom de Mello.

Artigo 2: Delineado para verificar o efeito da dieta rica em frutose na capacidade aeróbia de ratos jovens.

Capacidade Aeróbia de Ratos Alimentados com Dieta Rica em Frutose. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, p. 422-5, 2008.

Autores: Rodrigo Ferreira de Moura, Lucieli Teresa Cambri, Antonio Carlos de Quadros Junior, Carla Manuela Crispim Nascimento, Luciana Mendonça Arantes, Emerson Sebastião, Kátia Tanaka, Camila Bosquiero Papini, Merlyn Mércia Olini e Maria Alice Rostom de Mello.

Artigo 3: Desenvolvido para investigar os efeitos agudos e crônicos do exercício físico no metabolismo da glicose em músculo sóleo e parâmetros associados à Síndrome Metabólica em ratos.

Artigo 4: Desenvolvido para verificar os efeitos e possíveis mecanismos de atuação do exercício físico no tratamento de parâmetros associados à Síndrome metabólica.

Artigo 1 [versão em português – versão original no apêndice III]

British Journal of Nutrition (2009), 101: 1178-1184.

Sinais de Síndrome Metabólica em ratos Wistar submetidos a diferentes protocolos de elevada ingestão de frutose

RESUMO

Na busca de um modelo adequado da Síndrome Metabólica Humana, as características metabólicas de ratos Wistar foram analisadas após a submissão a diferentes protocolos de alta ingestão de frutose. Primeiramente, dois grupos de ratos adultos (90 dias de idade) foram estudados: grupo Controle (C1; n = 6) receberam ração regular para roedores (Labina, Purina®) e um grupo Frutose (F1; n = 6) também alimentado com ração regular para roedores. A frutose foi administrada diluída na água de beber na proporção de 10%. Em segundo lugar, dois grupos de ratos adultos (90 dias de idade) foram avaliados: grupo Controle (C2; n = 6) alimentado com dieta balanceada (AIN-93G) e um grupo Frutose (F2; n = 6) alimentado com dieta composta por 60% de frutose. Finalmente, dois grupos de ratos jovens (28 dias de idade) foram analisados: grupo Controle (C3; n = 6) alimentado com dieta AIN-93G e grupo Frutose (F3; n = 6) alimentado com dieta composta por 60% de frutose. Depois de 4-8 semanas, os animais foram avaliados. Nos grupos frutose F2 e F3 a tolerância à glicose e sensibilidade à insulina foram menores, enquanto a concentração de triglicerídeos plasmáticos foi mais alta em comparação com os respectivos controles C2 e C3 ($p < 0.05$). O colesterol total, HDL e LDL sanguíneos bem como a gordura corporal apresentaram diferenças apenas no segundo protocolo. Conclui-se que a alta ingestão de frutose é mais efetiva em produzir sinais de Síndrome Metabólica em ratos Wistar adultos do que em jovens. Além disso, a dieta parece ser uma via mais efetiva do que a ingestão na água.

Frutose: Síndrome Metabólica: Sensibilidade a Insulina: Gordura corporal.

INTRODUÇÃO

Clinicamente, a Síndrome metabólica envolve um agrupamento de distúrbios nos quais a intolerância a glicose representa um importante sintoma. O diagnóstico da Síndrome metabólica implica em resultados positivos para pelo menos três alterações metabólicas incluindo resistência a insulina, hipertensão, obesidade, disfunção endotelial e alterações no perfil lipídico (REAVEN, 1988; ZECCHIN *et al.*, 2004). Estes múltiplos fatores de risco contribuem em acelerar a incidência de doenças cardiovasculares (REAVEN, 1988; ZECCHIN *et al.*, 2004; FUJIOKA *et al.*, 1987; KAPLAN, 1989).

A prevalência de obesidade quadruplicou nos últimos 25 anos nos Estados Unidos; 16% das crianças e 30% dos adultos são agora afetados e muitas dessas pessoas obesas sofrem de Síndrome metabólica (NAKAGAWA *et al.*, 2005). Projeções estimam que no ano de 2010, existirá de 50 a 70 milhões de pessoas com manifestações dessa Síndrome naquele país (SAMAD *et al.*, 1999).

O aumento no consumo de frutose na sociedade contemporânea tem sido associado a alta prevalência de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (CAVE *et al.*, 2007), obesidade, diabetes tipo 2 e Síndrome metabólica (GROSS *et al.*, 2004; ASTRUP e FINER, 2000). De fato, animais de laboratório alimentados com dieta rica em frutose demonstram intolerância a glicose, resistência a insulina, hiperinsulinemia e dislipidemia (HWANG *et al.*, 1987). Um alto fluxo de frutose para o fígado perturba o metabolismo de glicose e a via de captação de glicose, levando a um significativo aumento na taxa de lipogênese e síntese de triglicerídeos, levado pelo alto fluxo de glicerol e porções acil das moléculas de triglicerídeo vindos do catabolismo da frutose (KATAKAM *et al.*, 1998; KELLEY *et al.*, 2004; HALLFRISCH, 1990). Estes distúrbios metabólicos talvez desempenhem um papel na ocorrência da resistência à insulina, comumente observada com alta ingestão de frutose tanto em homens quanto em modelos animais (BASCIANO *et al.*, 2005). Uma vez que ratos alimentados com frutose apresentam sinais da síndrome, estes são usados como modelo experimental para a condição em humanos (OKADA *et al.*, 2000).

As alterações metabólicas observadas em ratos tratados com frutose são muito divergentes entre os estudos, desde diferentes linhagens como Wistar (OKADA, 2000; JOYEUX-FAURE *et al.*, 2006) e Sprague-Dawley (LEE *et al.*, 2006; SÁNCHEZ-LOZADA *et al.*, 2007); quantidade e via de administração da frutose – dieta [60%] (JOYEUX-FAURE *et al.*, 2006; SÁNCHEZ-LOZADA *et al.*, 2007), gavagem [8g/kg]

(BARBOSA *et al.*, 2007) ou na água de beber [10%] (SÁNCHEZ-LOZADA *et al.*, 2007); idade dos animais no início do experimento – jovens (JOYEUX-FAURE *et al.*, 2006; SÁNCHEZ-LOZADA *et al.*, 2007) ou adultos (SÁNCHEZ-LOZADA *et al.*, 2007). Ainda, um período não padronizado de administração de frutose tem sido usado – desde quatro (BARBOSA *et al.*, 2007), seis (LEE *et al.*, 2006) ou até oito semanas (SÁNCHEZ-LOZADA *et al.*, 2007) ou durante muitos meses (LEE *et al.*, 2006). A variação no tipo de dieta controle é outro problema potencial dos estudos com animais. Esse pode ser um problema em particular com dietas não purificadas, mas o uso de dietas sintéticas também é largamente descrito na literatura (DALY *et al.*, 1997). Assim, diferentes delineamentos experimentais para administração de frutose em ratos induzem diferentes graus de respostas fisiológicas.

Na busca de um modelo experimental adequado para simular a Síndrome metabólica humana, o presente estudo foi delineado para analisar as características metabólicas de ratos Wistar submetidos a alta ingestão de frutose em diferentes protocolos.

MÉTODOS

Cuidado dos animais e desenho experimental

Ratos Wistar machos foram obtidos no Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – UNESP – *campus* de Botucatu. Os ratos foram mantidos em ambiente com temperatura ajustada para $25 \pm 1^{\circ} \text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12/12 horas no laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física da UNESP – *campus* de Rio Claro, SP. Foi permitido livre acesso à água e alimento. Todos os experimentos foram realizados com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade de Araras – UNIARARAS, parecer n. 069/2008.

Os animais foram separados randomicamente e os estudos foram conduzidos em três séries separadas de experimentos. No primeiro, dois grupos de ratos adultos foram estudados: o grupo Controle (C1; $n = 6$) recebeu ração regular para roedores (57.3% de carboidratos, 41.2% como amido de milho, Labina, Purina[®]) e o grupo Frutose (F1; $n = 6$) foi alimentado com ração regular para roedores e a água de beber foi composta por solução de frutose a 10%. Ambos os grupos iniciaram o experimento aos 90 dias de idade e foram acompanhados por oito semanas.

No segundo experimento, dois grupos de ratos adultos também foram avaliados: grupo Controle (C2; $n = 6$) foi alimentado com dieta balanceada semipurificada (AIN-93G)

(REEVES *et al.*, 1993), e um grupo Frutose (F2; n = 6) foi alimentado com dieta composta por 60% de frutose (tabela 1). Ambos os grupos iniciaram o experimento aos 90 dias de idade e foram acompanhados por quatro semanas.

Dois grupos de ratos jovens foram analisados no terceiro experimento: grupo Controle (C3; n = 6) recebeu dieta balanceada AIN-93G e o grupo Frutose (F3; n = 6) foi alimentado com dieta composta por 60% de frutose. Ambos os grupos iniciaram o experimento aos 28 dias de idade e foram acompanhados por oito semanas.

Tabela 1. Composição das dietas balanceada e rica em frutose.

Ingredient (g/kg)	AIN-93G	Fructose diet
Caseína	202	202
Amido de milho	397	-
Dextrina	130.5	-
Sacarose	100	27.5
Frutose	-	600
L-cistina	3	3
Óleo de soja	70	70
Mistura de minerais (AIN-93G)	35	35
Mistura de vitaminas (AIN-93)	10	10
Fibra	50	50
Cloridrato de Colina	2.5	2.5

Todos os animais foram pesados e medidos (comprimento focinho-ânus) uma vez por semana. No final do período experimental o índice de Lee foi calculado (BERNARDIS e PETERSON, 1968) (dividindo a raiz cúbica do peso final (g) pelo comprimento final (cm) e multiplicando por 1000). Este índice para ratos é equivalente em humanos ao índice de massa corporal.

Teste Oral de Tolerância à Glicose (GTT)

No final de cada experimento os ratos ficaram em jejum por 15 horas. Glicose foi administrada dentro do estômago através de uma sonda oro – gástrica com dose correspondente a 2.0 g.kg⁻¹ de peso corporal. Amostras de sangue foram obtidas através de um corte na extremidade da cauda em 0, 30, 60 e 120 minutos. A determinação da glicose sérica foi feita pelo método de glicose-oxidase (Laborlab Kit) (LATORRACA *et al.*,

1998). A resposta glicêmica durante o GTT foi avaliada pela área sob a curva da glicose sérica usando o método trapezoidal (MATHEWS *et al.* 1990).

Teste Subcutâneo de Tolerância à Insulina (ITT)

No final de todas as séries experimentais foram realizados testes subcutâneos de tolerância à insulina para avaliação da sensibilidade periférica à insulina. O ITT consistiu de uma injeção de insulina regular na região dorsal (30 μ m^g-1p.c.). Amostras de sangue foram obtidas de um corte na extremidade da cauda em 0, 30, 60 e 120 minutos para determinação da glicose sérica pelo método de glicose-oxidase (Laborlab Kit) (LATORRACA *et al.*, 1998). Uma constante para o desaparecimento da glicose sérica (Kitt) foi calculado através da fórmula $0.693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose sérica foi calculado a partir da análise da inclinação dos mínimos quadrados da concentração de glicose de 0-30 minutos depois da injeção de insulina, momento no qual a concentração de glicose diminui linearmente (LUNDBAEK, 1962).

Bioquímica do sangue e gordura corporal

Devido aos múltiplos aspectos envolvendo a avaliação da sensibilidade à insulina a concentração da insulina em jejum também foi avaliada.

Todos os animais foram mortos por decapitação e o sangue do tronco foi coletado para determinação das concentrações séricas de triglicerídeos, colesterol total, HDL – colesterol, LDL – colesterol e glicose através de procedimentos colorimétricos (NOGUEIRA *et al.*, 1990). Os depósitos de gordura retroperitoneal, mesentérico (visceral) e subcutâneo posterior foram extirpados e pesados de acordo com Cinti (2005). A concentração hepática de lipídeos totais (NOGUEIRA *et al.*, 1990) também foi determinada.

Estatística

Em cada experimento, os valores de peso e comprimento corporal ao longo de todo o período de ingestão das dietas foram analisados através de ANOVA *two way*. Todas as outras variáveis foram analisadas por teste *t student* para amostras independentes. Um nível de 5% foi estabelecido para significância estatística.

RESULTADOS

Os valores de peso e comprimento corporal do primeiro experimento são demonstrados na figura 1. Nenhuma diferença foi encontrada.

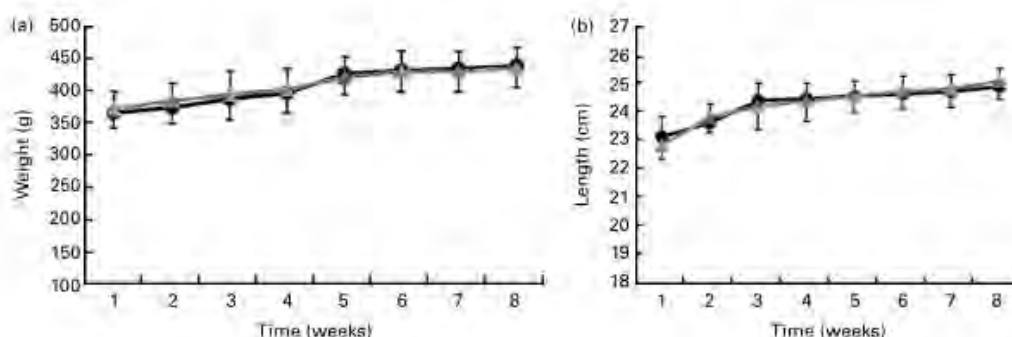


Fig.1. Peso (A) e comprimento (B) dos animais no primeiro experimento ($P>0.05$).

Os dados da primeira série de experimentos são expressos na tabela 2. Nenhuma diferença metabólica foi observada entre os ratos dos grupos controle (C1) e frutose (F1) em nenhum dos parâmetros avaliados. A quantidade média de frutose ingerida correspondeu a $1.74\text{g}.100\text{g de animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$.

Tabela 2. Efeitos de oito semanas de ingestão de frutose como solução a 10% da água de beber em ratos Wistar adultos (Exp 1). Valores em média e desvio padrão de seis animais por grupo.

PARÂMETRO	CONTROLE		FRUTOSE (F1)	
	Média	DP	Média	DP
Área sob a curva glicêmica ($\text{mM}.120\text{min}$)	845.0	187.3	1124.9	99.6
Kitt ($\%.\text{min}^{-1}$)	0.60	0.27	0.61	0.48
Insulina de jejum ($\mu\text{U/mL}$)	4.09	0.54	4.16	0.63
Glicose sérica (mM)	5.7	0.6	5.4	0.7
Colesterol total sérico (mM)	2,19	0,48	2,38	0,44
HDL-colesterol sérico (mM)	1.64	0.26	1.82	0.16
LDL-colesterol sérico (mM)	0.49	0.23	0.63	0.37
Triglicerídeos séricos (mM)	1.90	0.64	1.82	0.67
Peso da Gordura retroperitoneal ($\text{mg}/100\text{g}$)	533.7	233.2	572.5	155.0
Peso da gordura mesentérica ($\text{mg}/100\text{g p.c.}$)	651.5	139.9	697.8	167.6
Peso da gordura subcutânea ($\text{mg}/100\text{g p.c.}$)	514.4	171.5	521.2	94.1
Lipídeos totais hepáticos ($\text{mg}/100\text{mg}$)	5.35	0.94	5.23	0.57
Índice de Lee	318.6	10.8	316.6	10.0

GTT: Teste de tolerância à glicose, Kitt: constante de desaparecimento da glicose sérica.

Nenhuma diferença foi observada nos valores de peso ou comprimento corporal no segundo experimento (figura 2).

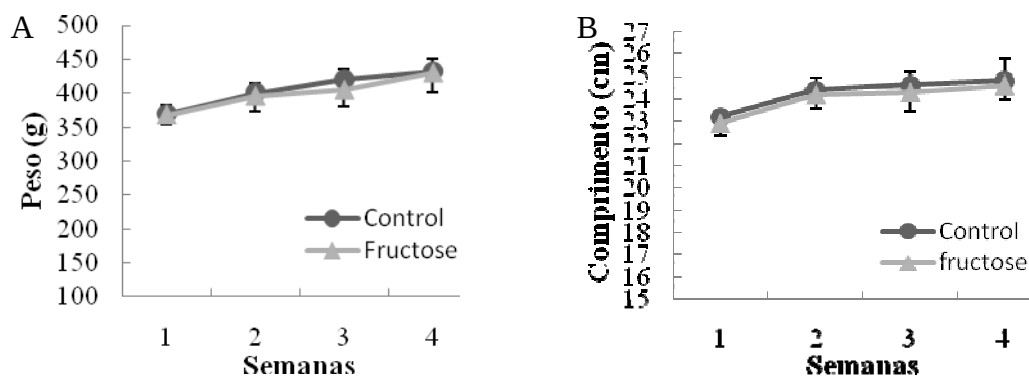


Fig.2. Peso (A) e comprimento (B) dos animais no segundo experimento ($P>0.05$).

Os dados do segundo experimento são descritos na tabela 3. O grupo frutose (F2) apresentou valores mais altos para área sob a curva glicêmica durante o GTT quando comparado ao grupo controle (C2). Os ratos F2 desenvolveram resistência à insulina quando comparados aos C2 evidenciada pelos menores valores de Kitt e alta concentração de insulina em jejum. Não foi encontrada diferença nos valores de glicose sérica basal entre os dois grupos. Colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos séricos foram maiores para F2 do que para C2. Neste experimento valores mais altos de peso dos depósitos de gordura foram observados em F2 em comparação com C2. A concentração hepática de lipídeos totais também foi maior em F2 comparado com C2. Não foi encontrada diferença entre os grupos nos resultados relacionados ao índice de Lee. A quantidade média de frutose ingerida no segundo experimento foi $2.70\text{g}.100\text{g de animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$.

Tabela 3. Efeitos de 4 semanas de ingestão de dieta composta por 60% de frutose em ratos Wistar adultos (Exp 2). Valores em media e desvio padrão de 6 animais por grupo.

PARÂMETRO	CONTROLE(C2)		FRUTOSE(F2)	
	Média	DP	Média	DP
Área sob a curva glicêmica (mM.120min)	862.5	80.4	951.4 *	106.8
Kitt (%.min ⁻¹)	0.73	0.16	0.47 *	0.16
Insulina de jejum (μU/mL)	4.04	0.93	4.91 *	1.42
Glicose sérica (mM)	6.83	0.93	6.33	1.3
Colesterol total sérico (mM)	2,54	0,16	5,82 *	1,92
HDL-colesterol sérico (mM)	0.78	0.17	1.08 *	0.16
LDL-colesterol sérico (mM)	0.51	0.19	0.74 *	0.20
Triglicerídeos séricos (mM)	1.28	0.44	2.55 *	0.84
Peso da Gordura retroperitoneal (mg/100g p.c.)	598.2	173.9	873.9 *	347.9
Peso da gordura mesentérica (mg/100g p.c.)	659.9	191.2	999.9 *	263.8
Peso da gordura subcutânea (mg/100g p.c.)	429.5	197.9	640.4 *	203.6
Lipídeos totais hepáticos (mg/100mg)	5.4	0.3	9.70 *	4.0
Índice de Lee	294.3	6.3	296.8	7.8

GTT: Teste de tolerância à glicose, Kitt: constante de desaparecimento da glicose sérica.

* P<0.05; teste t para amostras independentes.

Não foram observadas diferenças para os valores de peso ou comprimento corporal no terceiro experimento (figura 3).

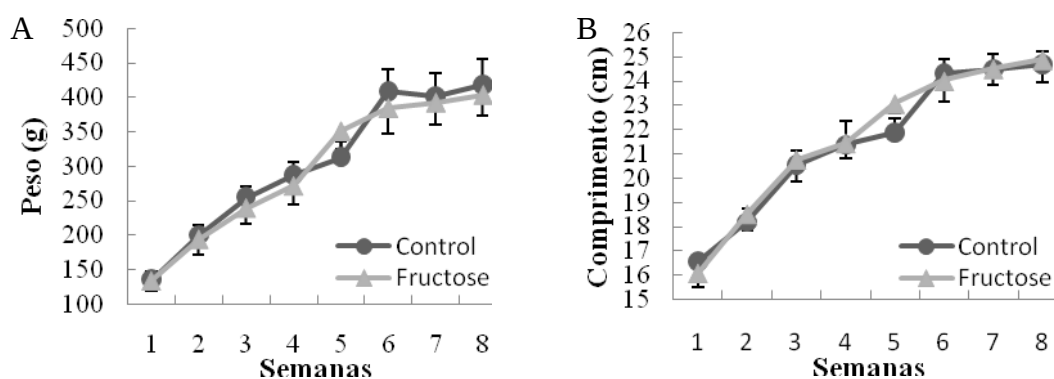


Fig.3. Peso (A) e comprimento (B) dos animais no terceiro experimento (P>0.05).

A tabela 4 mostra os dados da terceira séries de experimentos. A área sob a curva glicêmica durante o GTT e a concentração de triglicerídeos foram maiores em F3 quando comparados a C3. Não foram observadas diferenças entre os grupos para a resistência à insulina, colesterol total sérico, glicose basal, HDL, LDL, peso dos depósitos de gordura retroperitoneal, mesentérico e subcutâneo bem como índice de Lee. No terceiro experimento, a quantidade média de frutose ingerida foi 3.75g.100g de animal⁻¹.dia⁻¹.

Tabela 4. Efeitos de 8 semanas de ingestão de dieta composta por 60% de frutose em ratos Wistar jovens (Exp 3). Valores em média e desvio padrão de 6 animais por grupo.

PARÂMETRO	CONTROLE(C2)		FRUTOSE(F2)	
	Média	DP	Média	DP
Área sob a curva glicêmica (mM.120min)	1128.1	92.6	1246.8*	69.1
Kitt (%.min ⁻¹)	0.62	0.23	0.65	0.37
Insulina de jejum (μU/mL)	4.18	0.55	4.07	0.61
Glicose sérica (mM)	7.12	0.83	6.75	0.89
Colesterol total sérico (mM)	2,47	0,58	3,01	0,50
HDL-colesterol sérico (mM)	0.98	0.27	1.09	0.3
LDL-colesterol sérico (mM)	0.79	0.33	0.83	0.43
Triglicerídeos séricos (mM)	0.68	0.19	1.09 *	0.25
Peso da Gordura retroperitoneal (mg/100g p.c.)	713.7	290.4	764.8	228.1
Peso da gordura mesentérica (mg/100g p.c.)	762.6	237.7	782.0	143.5
Peso da gordura subcutânea (mg/100g p.c.)	772.0	356.6	696.4	249.5
Lipídeos totais hepáticos (mg/100mg)	6.48	1.34	6.80	2.55
Índice de Lee	298.8	7.6	307.9	10.7

GTT: Teste de tolerância à glicose, Kitt: constante de desaparecimento da glicose sérica.

* P<0.05; teste t para amostras independentes.

DISCUSSÃO

Existem evidências clínicas e epidemiológicas que sugerem uma associação progressiva entre o desenvolvimento da Síndrome metabólica e o elevado consumo de frutose (ELLIOTT *et al.*, 2002). Realmente, um expressivo aumento na prevalência da obesidade e Síndrome metabólica tem sido relacionado a 30% de aumento na ingestão total de frutose nos últimos 20 anos dentro dos Estados Unidos. Isso tem sido associado à introdução de xaropes de milho e adoçantes em refrigerantes e outros alimentos com elevada quantidade de frutose (NAKAGAWA *et al.*, 2005). No presente estudo, nós examinamos o efeito de três diferentes protocolos de administração de frutose no metabolismo de ratos Wistar.

No primeiro protocolo, uma solução de frutose a 10% foi administrada em ratos machos Wistar adultos durante oito semanas na água de beber. Não foram observadas diferenças metabólicas entre os grupos controle e frutose. Usando o mesmo procedimento, Sánchez-Lozada (2007) reportaram que administração de frutose era capaz de induzir hipertensão, hiperuricemia e hipertrigliceridemia sistêmica em ratos machos Sprague-

Dowley adultos. Roglans *et al.* (2007) relataram hipertrigliceridemia e esteatose hepática em ratos Sprague-Dowley (os autores não mencionaram a idade nem o peso dos animais no início do experimento) que tinham recebido frutose a 10% da água de beber por duas semanas. Adicionalmente, enquanto ratos adultos Sprague-Dowley desenvolveram características da Síndrome metabólica, ratos Wistar adultos apresentaram um perfil bioquímico considerado mais saudável para o sistema cardiovascular. Assim, as diferenças relatadas podem estar relacionadas com a linhagem dos ratos adotados. De fato, ratos Wistar parecem ser menos afetados pelos efeitos deletérios da frutose quando administrada via água de beber.

Sanchez-Lozada *et al.* (2007) compararam os efeitos metabólicos da frutose (10%) na água de beber e da alta ingestão de frutose através de dieta (60%) em ratos Sprague-Dowley. Ambos os procedimentos induziram hiperuricemia e hipertrigliceridemia. Entretanto, a dieta de 60% de frutose resultou em mais elevada ingestão calórica, que estava diretamente relacionada com o grau de severidade dos parâmetros da Síndrome. Outros estudos também reportaram hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e intolerância a glicose em ratos Sprague-Dowley alimentados com dieta composta por 60% de frutose com durações de quatro a sete semanas (KATAKAM *et al.*, 1998; KELLEY *et al.*, 2004; BARBOSA *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2006; ORON-HERMAN *et al.*, 2005; SHARABI *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2007). Desse modo, no segundo experimento uma dieta de frutose foi administrada em ratos machos wistar adultos (90 dias de idade) durante quatro semanas.

Usando o protocolo de dieta rica em frutose, nós também obtivemos sucesso com os ratos Wistar do grupo frutose em induzir sinais da Síndrome metabólica, tais como intolerância à glicose, resistência à insulina e elevada concentração de triglicerídeos, colesterol total e LDL séricos, bem como alta concentração de lipídeos totais hepáticos.

O elevado acúmulo hepático de lipídeos é um sinal da DHGNA que pode contribuir para o desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica (PITT, 2007) em indivíduos que não consomem quantidades significantes de etanol. Este resultado reforça o pressuposto que não somente alta ingestão dietética de gordura exerce um papel na DHGNA, mas uma elevada ingestão de frutose também. Nesse sentido, Ouyang *et al.* (2008) demonstraram que a ingestão de frutose em pacientes com DHGNA era 2 a 3 vezes do que grupos controle.

Foi reportado que ratos Sprague-Dowley adultos que receberam solução de frutose com dietas padrão ganharam mais peso corporal e tinham mais peso de tecidos gordurosos do que ratos do grupo controle alimentados apenas com a dieta padrão (KANAREK e ORTHEN-GAMBILL, 1982). Alterações na gordura corporal também foram observadas nos ratos alimentados com frutose do segundo experimento, os quais demonstraram aumento no peso dos depósitos de gordura retroperitoneal, mesentérico e subcutâneo.

Lau *et al.* (2005) em estudo prospectivo com pacientes não diabéticos não encontrou associação entre o índice glicêmico ou a carga glicêmica da dieta com a probabilidade de desenvolvimento de resistência à insulina. Barbosa *et al.* (2007) comparou os efeitos da suplementação com glicose ou frutose (8g/kg) durante três meses, em ratos Wistar. Os autores relataram resistência à insulina e hipertrigliceridemia em resposta a ambos os tratamentos, mas a glicemia foi maior no grupo frutose. O índice glicêmico da frutose é cerca de 3 vezes menor do que a glicose e então as alterações observadas não podem ser relacionadas a esse índice ou mesmo à carga glicêmica (índice glicêmico multiplicado pela quantidade em gramas). Em adição, o segundo experimento que revelou mais danos aos ratos, apresentou valor médio intermediário de ingestão diária de frutose em comparação ao primeiro e terceiro experimento.

A terceira série de experimentos foi delineada para analisar as alterações metabólicas causadas por administração de elevado teor de frutose na dieta de ratos Wistar jovens (28 dias de idade) durante oito semanas. Os animais jovens alimentados com frutose demonstraram hipertrigliceridemia e intolerância à glicose sem alteração da sensibilidade à insulina, concentração sérica de colesterol total, LDL e HDL, bem como o peso dos depósitos de gordura mesentérico, retroperitoneal e subcutâneo quando comparados ao grupo controle. Por outro lado, depois de 28 dias de ingestão de dieta com elevado teor de frutose, o comprometimento da sensibilidade à insulina foi descrito para ratos Wistar-Hannover (cinco semanas de idade) associado a hipertrigliceridemia, mas sem mudanças no ganho de peso corporal, glicose sérica basal e colesterol total sérico (BEZERRA *et al.*, 2001).

Interessantemente, o terceiro experimento demonstrou que a quantidade média de ingestão de frutose foi quase 40% maior em comparação ao segundo, mas não induziu o quadro completo de Síndrome metabólica nesses animais. Uma hipótese razoável poderia ser a influência de mecanismos protetores relacionados à idade jovem em ratos Wistar. Entretanto, isso ainda necessita de mais investigação.

É importante salientar que a dieta AIN-93G administrada em ambas as séries de experimentos é recomendada para a fase de crescimento e sua composição apresenta 75% mais gordura e 42.9% mais caseína do que a dieta para manutenção de ratos adultos. Entretanto, o C2 apresentou valores para os depósitos de gordura muito similares ao C1 que ingeriu ração regular para roedores.

A ingestão dietética de frutose em humanos é basicamente associada a refrigerantes, que é composto por 45% de glicose e 55% de frutose e respondem por apenas 8% do total de energia ingerida (PARK e YETLEY, 1993). Entretanto, Montonen *et al.* (2007) em um estudo com delineamento coorte reportaram que o risco da ocorrência de diabetes tipo 2 é 1.67 vezes maior com esse perfil dietético. O surgimento de evidências recentes em estudos epidemiológicos e bioquímicos sugere claramente que uma elevada ingestão de frutose rapidamente se tornou um fator de causa importante no desenvolvimento da Síndrome metabólica (GROSS *et al.*, 2004).

Não obstante, o presente estudo não foi delineado para investigar características de dose-resposta. Como há diferentes respostas metabólicas a dietas com elevado teor de frutose, mesmo entre roedores (BARBOSA *et al.*, 2007), a importância do presente estudo reside na identificação do protocolo mais adequado para induzir Síndrome metabólica em ratos Wistar. De acordo com os presentes achados, alimentar ratos adultos (90 dias de idade) com dieta purificada rica em frutose (60%) durante quatro semanas parece ser um protocolo apropriado para tal propósito.

Em conclusão, tomados conjuntamente os resultados das três séries de experimentos do presente estudo indicam que alta ingestão de frutose é mais efetiva para produzir sinais de Síndrome metabólica em ratos Wistar adultos do que em jovens, independente do menor período de tratamento. Adicionalmente, a dieta parece ser uma rota mais efetiva para administração da frutose do que a água de beber.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Clarice Y. Sibuya, Eduardo Custódio e José Roberto R. Silva pela assistência técnica. Esta pesquisa obteve suporte financeiro das fundações brasileiras FAPESP (processo: 07/5098-0 e 05/57741-6), CNPQ (processo: 30027/2004-6). RFM foi responsável pela análise estatística e escreveu o manuscrito. CR foi responsável pela análise bioquímica e também escreveu o manuscrito. JAO conduziu o estudo um. ES foi responsável pelo planejamento e delineamento do estudo um. MARM delineou,

planejou e supervisionou os estudos dois e três. Todos os autores leram e concordaram com o formato final. Os autores do estudo não apresentam conflitos de interesses.

REFERÊNCIAS

ASTRUP, A.; FINER, N. Redefining type 2 diabetes: 'diabesity' or 'obesity dependent diabetes mellitus'? **Obes Rev**, v.1, 57-9, 2000.

BARBOSA, C. R. et al. Opposite lipemic response of Wistar rats and C57BL/6 mice to dietary glucose or fructose supplementation. **Braz J Med Biol Res**, v.40, p.323-31, 2007.

BASCIANO, H., Federico, L.; Adeli, K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. **Nutrition & Metabolism** v.2, p. 5-18, 2005.

BERNARDIS, L.L.; PETTERSON, B.D. Correlation between "Lee index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J Endocrinology**, v.40, p.527-28, 1968.

BEZERRA, R.M.N, et al. A high-fructose diet induces insulin resistance but not blood pressure changes in normotensive rats. **Braz J Med Biol Res**, v.34, p.1155-60, 2001.

CAVE, M. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. **J Nutr Biochem**, v.18, p.184-95, 2007.

CINTI S. The adipose organ. **Prost, Leuk Essent Fatty Acids**, v.73, p.9–15, 2005.

DALY, M.E. et al. Dietary carbohydrates and insulin sensitivity: a review of the evidence and clinical implications. **Am J Clin Nutr**, v.66, 1072-85, 1997.

ELLIOT, S.S. et al. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. **Am J Clin Nutr**, v.76, p.911-22, 2002.

FUJIOKA, S. et al. Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. **Metabolism**, v.36, p.54-9, 1987.

GROSS, L.E.; LI, L.; FORD E.S.; LIU S. Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. **Am J. Clin. Nutr**, v.79, p.774-9, 2004.

HALLFRISCH, J. Metabolic effects of dietary fructose. **FASEB J**, v.4, p.2652-60, 1990.

HWANG, I.S. et al. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. **Hypertension**, v.10, p.512-6, 1987.

JOYEUX-FAURE, M. et al. Fructose-fed rat hearts are protected against ischemia-reperfusion injury. **Exp Biol Med**, v.231, p.456-62, 2006.

KANAREK, R.B.; ORTHEN-GAMBILL, N. Differential effects of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate- induced obesity in rats. **J Nutr**, v.112, p.1546-54, 1982.

KAPLAN, N.N. The deadly quartet. Upper body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. **Arch Intern Med**, v.149, p. 1514-20, 1989.

KATAKAM, P.V. et al. Endothelial dysfunction precedes hypertension in diet-induced insulin resistance. **Am J Physiol**, v.275, p.R788-92, 1998.

KELLEY, G.L.; ALLAN, G.; AZHAR, S. High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation. **Endocrinol**, v.145, p.548-55, 2004.

LATORRACA, M.C. et al. Protein deficiency during pregnancy and lactation impairs glucose-induced insulin secretion but increases the sensitivity to insulin in rats. **Br J Nutr**, v.80, 291 – 297, 1998.

LAU, C. et al. Dietary Glycemic Index, Glycemic Load, Fiber, Simple Sugars, and Insulin Resistance. **Diabet Care**, v.28, p.1397-1403, 2005.

LEE, Y.C. et al. Plasma leptin response to oral glucose tolerance and fasting/re-feeding tests in rats with fructose-induced metabolic derangements. **Life Sci**, v.78, p.1155-62, 2006.

LUNDBAEK, K. Intravenous glucose tolerance test as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. **Br Med J**, v.2, 1507-13, 1962.

MATHEWS, J.N.S. et al. Analysis of serial measurements in medical research. **Br. Med. J.** v. 27, p. 230-5, 1990.

MONTONEN, J. et al. A Consumption of sweetened beverages and intakes of fructose and glucose predict type 2 diabetes occurrence. **J Nutr**, v.137, p.1447-54, 2007.

NAKAGAWA, T. et al. Hypothesis: fructose induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. **Nat Clin Pract Nephrol**, v.1, p.80-6, 2005.

NOGUEIRA, D.M. et al. **Métodos de Bioquímica Clínica. Técnica e Interpretação**. São Paulo: Pancast, p.468; 1990.

OKADA, Y. et al. Effects of the K⁺ Channel Opener KRN4884 on the Cardiovascular Metabolic Syndrome Model in Rats. **J Cardio Pharmacol**, v.35, 287-93, 2000.

ORON-HERMAN M. et al. The effects of S-allylmercaptocaptopril, the synthetic product of allicin and captopril, on cardiovascular risk factors associated with the metabolic syndrome. **Atherosclerosis**, v.183 p.238 - 43, 2005.

OUYANG, X. et al. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. **J Hep** v.48,p.993-9, 2008.

PARK, Y. K.; YETLEY, E.A. Intakes and food sources of fructose in the United States. **Am J Clin Nutr**, v.58, p.737S-747S, 1993.

PITT, H.A. Hepato-pancreato-biliary fat: the good, the bad and the ugly. **HPB**, v.9, p.92-7, 2007.

REAVEN, G. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, p. 1595-1607, 1988.

REEVES P.G.; NIELSEN F.H.; FAHEY Jr G.C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **J Nutr**, v.123,p.1939-51, 1993.

ROGLANS, R. et al. Impairment of hepatic stat-3 activation and reduction of PPAR_α activity in fructose-fed rats. **Hepatology**, v.45, p.778-88, 2007.

SAMAD, F. et al. Tumor necrosis factor alpha is a key component in the obesity - linked elevation of plasminogen activator inhibitor 1. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, p. 6902-7, 1999.

SÁNCHEZ-LOZADA, L.G. et al. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. **AJP Renal Physiol**, v.292, p.422-9, 2007.

SHARABI, Y. et al. Effect of PPAR-gamma agonist on adiponectin levels in the metabolic syndrome: lessons from the high fructose fed rat model. **Am J Hypertens**, v.20, p.206-10, 2007.

WANG, X. et al. Tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and restores adiponectin levels in rats. **Eur J Pharmacol**, v.555, p48-53, 2007.

ZECCHIN, H.G.; CARVALHEIRA, J.B.C.; SAAD, M.J.A. Mecanismos moleculares da resistência à insulina na síndrome metabólica. **Rev. Soc. Cardiol Estado de São Paulo** v.14, p.574-89, 2004.

ZIVKOVI, A.C.; GERMAM, J.B.; SANYAL, A.J. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. **Am J Clin Nutr**, v.86, p.285-300, 2007.

Artigo 2

Revista Brasileira de Medicina do Esporte (2008), 14: 422 - 425.

Capacidade aeróbia de ratos alimentados com dieta rica em frutose

RESUMO

Introdução: Evidências apontam que a ingestão exacerbada de frutose pode desencadear distúrbios característicos da síndrome metabólica. **Objetivos:** Analisar os efeitos da ingestão de dieta rica em frutose sobre aspectos metabólicos de ratos da linhagem *Wistar*. Adicionalmente, verificar a capacidade aeróbia através da identificação da máxima fase estável de lactato (MFEL). **Materiais e Métodos:** Dezesesseis ratos foram separados em dois grupos de oito animais: a) Controle, alimentados com dieta balanceada e b) Frutose, alimentados com dieta rica em frutose. Foram analisadas a tolerância à glicose (área sob a curva de glicose durante teste de tolerância à glicose), sensibilidade à insulina (taxa de remoção da glicose sérica após sobrecarga exógena de insulina), perfil lipídico sérico e concentração de lactato sanguíneo [lac]s durante exercício na intensidade da MFEL. **Resultados:** Teste t não pareado ($p < 0,05$) revelou diferença para a tolerância à glicose e triglicérides, porém não houve diferença na sensibilidade à insulina e na [lac]s. Anova *one way* com *post hoc* de Newman Keuls ($p < 0,05$) revelou diferença para a cinética da glicose durante o teste de tolerância, mas não para a cinética do lactato durante exercício na MSSL. **Conclusão:** As alterações fisiológicas provocadas pela dieta rica em frutose e inerentes à síndrome metabólica não prejudicam a capacidade aeróbia de ratos.

Palavras-chave: Máxima fase estável de lactato, Síndrome metabólica, Exercício.

INTRODUÇÃO

O excesso de ingestão de frutose nos hábitos alimentares da sociedade contemporânea (GROSS *et al.*, 2004) tem despertado interesse nos pesquisadores da área da saúde, pois foi reportado que, em ratos, uma dieta rica em frutose, promove anormalidades metabólicas como a hiperinsulinemia, resistência à insulina e dislipidemia (DAI e MACNEILL, 1995; KATAKAM *et al.*, 1998).

A associação de dislipidemia, diabetes mellitus tipo 2 ou intolerância à glicose, hipertensão arterial e obesidade caracterizam a síndrome metabólica (REAVEN, 1988). Esses múltiplos fatores de risco aceleram a incidência das doenças coronarianas (REAVEN, 1988; FUJIOKA *et al.*, 1987; KAPLAN, 1989). A hipótese fisiopatológica que mais amplamente unifica os diversos itens da síndrome metabólica é uma interação entre obesidade e resistência à insulina.

Uma vez que, os modelos animais mimetizam diversas respostas fisiológicas humanas, ratos alimentados com frutose têm sido utilizados como modelo experimental da síndrome metabólica humana (SÁNCHEZ-LOZADA *et al.*, 2007; RAYSSIGUIER *et al.*, 2006).

A maioria dos trabalhos (SÁNCHEZ-LOZADA *et al.*, 2007; BARBOSA *et al.*, 2007; SHARABI *et al.*, 2007; BEZERRA *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007; JOIEUX-FAURE *et al.*, 2006; ORON-HERMAN, 2005; HWANG *et al.*, 1987) analisa a influência da elevada ingestão de frutose somente em parâmetros de repouso. Porém, o exercício físico é um componente importante na prevenção e no tratamento da síndrome. Foi demonstrado que o nível de capacidade aeróbia apresenta uma relação inversa com o risco de desenvolver essa doença (BRIEN *et al.*, 2007). Adicionalmente, a atividade física pode atenuar a gravidade do diabetes tipo 2 e melhorar a tolerância à glicose (LAKKA *et al.*, 2007).

Porém, diante das diversas alterações morfo-fisiológicas, provocadas por uma dieta rica em frutose, torna-se necessário investigar se a capacidade aeróbia também pode ser prejudicada, haja vista que é componente fundamental na prescrição de exercícios.

Desse modo, o objetivo do presente estudo foi analisar as características metabólicas de ratos submetidos ao tratamento com dieta rica em frutose. Adicionalmente,

verificar a influência dos possíveis distúrbios metabólicos, provocados pela dieta, na capacidade aeróbia inferida pela máxima fase estável de lactato sanguíneo (MFEL).

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e seu tratamento

Todos os experimentos com os animais foram realizados de acordo com as resoluções brasileiras específicas sob a Bioética em Experimentos com Animais (Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979 e Decreto nº 24.645 de 10 julho de 1934).

O estudo foi realizado com 16 ratos da linhagem *Wistar*, recém desmamados. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas de polietileno, a temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$ e em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com livre acesso a água e ao alimento. Todos os experimentos realizados foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Fundação Hermínio Ometto (processo número: 068/2008)

Tratamento dietético

A partir do desmame (21 dias) até a idade adulta (90 dias), o alimento consistiu de dietas semi-purificadas balanceada - AIN-93G (REEVES *et al.*, 1993), ou composta por 60% de frutose, conforme composição descrita na tabela 1.

Tabela 1. Composição das dietas.

<i>Componentes (g/kg)</i>	Balanceada	Rica em frutose
Caseína	202	202
Amido	397	-
Dextrina	130,5	-
Sacarose	100	27,5
Frutose	-	600
L-cistina	3	3
Óleo de soja	70	70
Mistura de sais (AIN-93GMX)	35	35
Mistura de vitaminas (AIN-93GVX)	10	10
Fibra	50	50
Cloridrato de colina	2,5	2,5

Grupos experimentais

Após o desmame até a idade adulta, os animais foram separados em dois grupos de tratamento compostos por oito ratos cada:

- Controle (GC): alimentados com dieta balanceada;
- Frutose (GF): alimentados com a dieta rica em frutose.

Avaliações gerais:

Todos os animais tiveram o peso corporal, ingestão alimentar e hídrica registrados uma vez por semana. No dia do sacrifício, o índice de Lee (BERNARDIS e PETTERSON, 1968), um indicativo de sobrepeso, foi calculado para os dois grupos pela equação:

$$\frac{\sqrt[3]{\text{massa}_{\text{corporal}}(g)}}{\text{comprimento}_{\text{focinho} - \text{ânus}}(cm)} \times 1000$$

Teste de tolerância à glicose – GTTo

O GTTo foi realizado com os animais aos 90 dias de idade, após 15 horas de jejum. Os ratos foram moderadamente anestesiados com éter etílico e uma primeira coleta de sangue foi feita através de corte na extremidade da cauda do animal (tempo 0). Em seguida, uma solução de glicose a 80% (2 g/kg de massa corporal) foi administrada aos ratos por sonda gástrica de polietileno. Amostras de sangue foram coletadas após 30, 60 e 120 minutos com capilares heparinizados e calibrados para 25 µL, visando a determinação das concentrações de glicose.

As concentrações de glicose sanguínea foram determinadas pelo método enzimático colorimétrico da glicose oxidase-peroxidase (HENRY *et al.*, 1974), com kit Wiener Lab. Após 15 minutos de incubação em banho à 37°C, as absorbâncias das amostras e do padrão foram lidas em espectrofotômetro a 505 nm. A área sob a curva da glicose (MATHEWS *et al.*, 1990) foi calculada utilizando-se o software ORIGIN 3.5.

Teste de tolerância à insulina – ITT

O ITT foi realizado com os animais 48 horas após o GTTo. Os ratos foram moderadamente anestesiados com éter etílico e uma primeira coleta de sangue foi feita através de corte na extremidade da cauda do animal (tempo 0). Em seguida, foi administrada via subcutânea, uma solução de insulina cristalina “LILLY U 40 na dose de 30 mU/100g de massa corporal do animal. Amostras de sangue foram coletadas após 30,

60 e 120 minutos com capilares heparinizados e calibrados para 25 µL, visando a determinação das concentrações de glicose.

As concentrações de glicose sanguínea foram determinadas pelo método enzimático colorimétrico da glicose oxidase-peroxidase, com kit Wiener Lab. Após 15 minutos de incubação em banho à 37°C, as absorbâncias das amostras e do padrão foram lidas em espectrofotômetro a 505 nm. A constante de redução da glicemia (K-ITT) foi calculada utilizando-se o software ORIGIN 3.5.

Teste de esforço

Aos 90 dias de idade, todos os ratos foram submetidos a testes de esforço para a identificação do limiar de transição entre os metabolismos aeróbio e anaeróbio - MFEL. Esse limiar equivale a mais alta concentração de lactato sanguíneo [lac]s, onde sua entrada na corrente sanguínea é compensada pela remoção durante exercícios com intensidade constante (HECK *et al.*, 1985). A determinação da MFEL é útil para a prescrição de exercícios e avaliação do condicionamento aeróbio.

Os ratos foram submetidos a testes de nado com carga constante após quatro dias de adaptação à água. As sobrecargas foram aplicadas em dias alternados, com intervalo mínimo de 48 horas. Para isso foram utilizadas pequenas bolsas com chumbo, atadas ao tórax que variaram entre 4 a 8 % da massa corporal, com 0,5% para a unidade mínima da variação. A duração dos testes foi de 25 minutos, com coletas de 25 µl de sangue da extremidade da cauda a cada 5 minutos, para dosagem de lactato pelo método de espectrofotometria.

O critério para determinação da MFEL foi a carga de trabalho em que a diferença dos valores de lactato, entre o 25º e o 10º minutos de exercício, era inferior a 1 mM. A [lac]s correspondente a MFEL foi assumida como a média dos valores entre o 10º e 25º minuto (GOBATTO *et al.*, 2001).

Sacrifício dos animais e obtenção de material biológico

- **Sangue**

Ao final do experimento, os animais foram sacrificados por decaptação, 48 horas após a última avaliação “in vivo” e após jejum de uma noite e em repouso. O sangue foi coletado e a separação do soro realizada para a dosagem de glicose, triglicérides, colesterol

total, colesterol LDL, colesterol HDL, por métodos colorimétricos (NOGUEIRA *et al.*, 1990).

- **Tecido Adiposo**

O tecido adiposo das regiões subcutânea posterior, mesentérica e retroperitoneal foi removido para pesagem. A excisão dos diferentes depósitos de gordura foi realizada de acordo com a descrição de Cinti (2005).

- **Análise Estatística**

Foi aplicado teste de *Shapiro-Wilk* para verificar a normalidade dos dados e teste *t* não pareado para comparar entre os grupos: a média de ingestão alimentar e hídrica, a área sob a curva do GTTo, o K-ITT, a média de carga correspondente a MFEL e da [lac]s, a glicemia basal, os lipídios séricos, o peso do tecido adiposo, a massa corporal e o índice de Lee.

Para comparar o padrão da curva do GTTo e a cinética do lactato sanguíneo na carga de MFEL, de ambos os grupos, foi utilizado Anova *one way* para medidas repetidas e quando necessário, análise *post hoc* de Newman Keuls. O nível de significância pré-estabelecido em todas as análises foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

Não foram encontradas diferenças significativas para a média de ingestão alimentar (GC: $6,43 \pm 2,48$ vs. GF: $6,24 \pm 2,23$ g/100g de massa corporal) e ingestão hídrica (GC: $10,19 \pm 3,15$ vs. GF: $8,0 \pm 2,20$ g/100g de massa corporal) diárias. Não houve diferença entre as cargas de MFEL encontradas (GC: $5,7 \pm 0,9$ vs. GF: $5,6 \pm 1,1$ % da massa corporal). O GF apresentou maior área sob a curva de glicose e padrão de resposta glicêmica em comparação ao GC. O perfil glicêmico durante o GTTo é apresentado na figura 1.

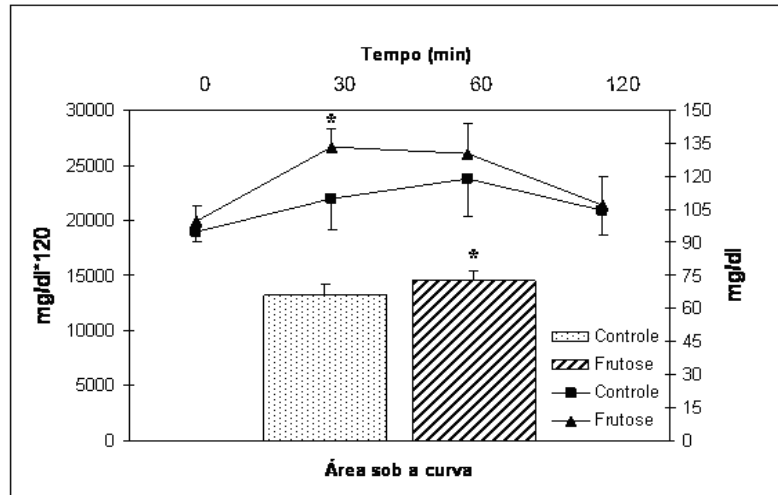


Figura 1. Glicemia e área sob a curva da glicose plasmática durante teste de tolerância à glicose. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. * diferente do controle $p < 0,05$.

A sensibilidade à insulina foi semelhante nos dois grupos, conforme evidenciado através do K-ITT (GC: $0,69 \pm 0,15$ vs. GF: $0,72 \pm 0,35 \text{ \%} \cdot \text{min}^{-1}$). A MFEL determinada para os animais de ambos os grupos variou de 4 a 7% peso corporal e não houve diferença entre as concentrações médias de lactato durante exercício na intensidade da MFEL (GC: $4,97 \pm 1,36$ vs. GF: $5,59 \pm 1,55 \text{ mmol/l}$).

A cinética do lactato sanguíneo do GF não foi diferente do GC. A figura 2 apresenta o comportamento do lactato sanguíneo durante exercício na intensidade da MFEL.

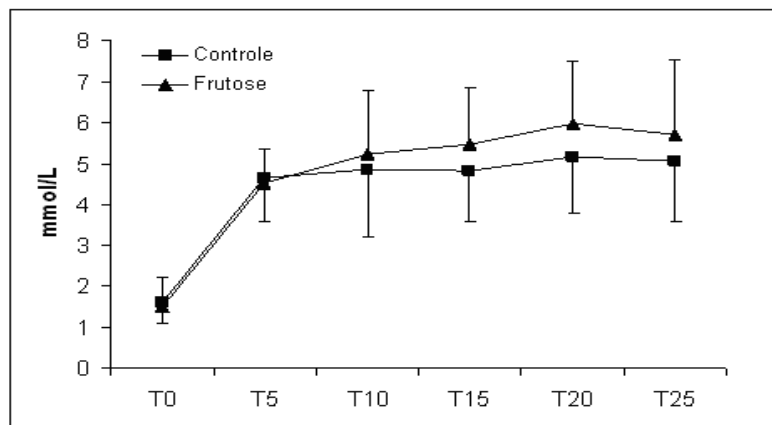


Figura 2. Cinética do lactato sanguíneo na intensidade da máxima fase estável. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Dados referentes aos lipídios séricos, peso do tecido adiposo em diferentes regiões, massa corporal e índice de Lee são apresentadas na tabela 2. A concentração de triglicérides séricos do GF foi maior do que a encontrada no GC, as demais variáveis não apresentaram diferenças significativas.

Tabela 2. Glicose e lipídios séricos, peso do tecido adiposo de diferentes regiões, massa corporal e índice de Lee dos animais ao final do experimento (90 dias de idade).

	Controle	Frutose
Glicemia basal (mg/dl)	127,3 ± 14,9	120,6 ± 15,9
Triglicérides séricos (mg/dl)	60,6 ± 17,1	96,2 ± 22,3 *
Colesterol total sérico (mg/dl)	95,6 ± 22,8	116,5 ± 19,7
Colesterol HDL sérico (mg/dl)	37,7 ± 10,3	41,8 ± 11,6
Colesterol LDL sérico (mg/dl)	30,6 ± 12,7	32,0 ± 16,8
Gordura subcutânea posterior (g/100g animal)	0,77 ± 0,35	0,64 ± 0,20
Gordura mesentérica (g/100g animal)	0,76 ± 0,23	0,75 ± 0,18
Gordura retroperitoneal (g/100g animal)	0,71 ± 0,29	0,74 ± 0,25
Massa corporal (g)	422,6 ± 50,8	426,7 ± 45,1
Índice de Lee	298,8 ± 7,65	307,9 ± 10,6

* Diferente do grupo controle $p < 0,05$; valores expressos em média ± desvio padrão.

DISCUSSÃO

O aumento no consumo alimentar de frutose coincide com a crescente prevalência de obesidade e síndrome metabólica nas duas últimas décadas (ELLIOT *et al.*, 2002). Foi demonstrado que uma dieta rica em frutose em humanos e animais de laboratório pode afetar o metabolismo de carboidratos e lipídios (KELLEY *et al.*, 2004). Essas alterações provocam distúrbios característicos da síndrome metabólica, a qual foi primeiramente descrita por Reaven (1988). A ocorrência dos componentes desta patologia aumenta o risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2, aterosclerose, doenças cardiovasculares e renais (REAVEN, 1988; FUJIOKA *et al.*, 1987).

O modelo de síndrome metabólica induzido em ratos, pela ingestão de elevado teor de frutose, caracteriza-se pela hipertensão, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e resistência à insulina (DAI e MACNEILL, 1995; REAVEN, 1988). Foi reportado que este modelo experimental induz a resistência à insulina com perfil metabólico muito similar ao da síndrome observada em humanos (DAI e MACNEILL, 1995).

No presente estudo, o peso corporal dos ratos não diferiu entre os grupos, o que coincide com achados anteriores (KATAKAM *et al.*, 1998; SHARABI *et al.*, 2007;

BEZERRA *et al.*, 2001; KELLEY *et al.*, 2004; GIRARD *et al.*, 2006; ROGLANS *et al.*, 2007), assim como a ingestão de alimento (ORON-HERMAN *et al.*, 2005). De fato, poucas investigações relatam o incremento no peso corporal devido à dieta rica em frutose (WANG *et al.*, 2007; JÜRGENS *et al.*, 2005).

A ausência de diferenças no ganho de peso corporal, assim como, na quantidade de tecido adiposo nas regiões mensuradas demonstra que a dieta apresentada não foi eficaz na indução da obesidade. Esse fato é importante, pois de acordo com os atuais critérios para diagnóstico da síndrome metabólica, propostos pela Federação Internacional de Diabetes (2005), a obesidade central é característica indispensável. Essa limitação do modelo pode estar associada à linhagem dos ratos adotada no presente estudo, pois o ganho excessivo de peso em função de elevada ingestão de frutose foi relatada para ratos da linhagem Sprague Dawley (KANAREK e ORTHEN-GAMBILL, 1982).

Corroborando estudos prévios (SHARABI *et al.*, 2007; THORBURN *et al.*, 1989), a elevada ingestão de frutose ocasionou intolerância à glicose, o que pode ter sido mediada pela redução na translocação dos transportadores de glicose do meio intracelular para a membrana, já que a resistência à insulina não foi alterada (PEREIRA *et al.*, 2003).

Contrariamente aos nossos achados, Bezerra *et al.* (2001) relataram resistência à insulina ao observar a constante de decaimento da glicose após administração endovenosa de insulina. Adicionalmente, Joyeux-Faure *et al.* (2006) aplicaram a técnica de clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico em ratos *Wistar* e também constataram redução na sensibilidade à insulina. Uma possibilidade a ser investigada para esse tipo de modelo seria uma menor sensibilidade do ITT com administração subcutânea em comparação com a endovenosa. Contudo, uma vez que, a resistência à insulina pode ser consequência natural da intolerância à glicose, infere-se que a exposição continuada à dieta somada aos efeitos deletérios do envelhecimento culminaria nesse distúrbio adicional.

A elevação nas concentrações de triglicérides constatada no presente trabalho, é quase unanimidade, nos mais diferentes estudos (KATAKAM *et al.*, 1998; BARBOSA *et al.*, 2007; SHARABI *et al.*, 2007; BEZERRA *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2007; ORON-HERMAN *et al.*, 2005; HWANG *et al.*, 1987; KELLEY *et al.*, 2004; THORBURN *et al.*, 1989) em alguns destes, tais modificações foram igualmente observadas no fígado (WANG *et al.*, 2007; ZAVARONI *et al.*, 1989).

Altos níveis de triglicérides séricos são descritos como consequência da ingestão de frutose (KELLEY *et al.*, 2004), uma vez que, esta é mais lipogênica que a glicose

(KATAKAM *et al.*, 1998). Dentre os mecanismos sugeridos para explicar este fenômeno, destaca-se o aumento da lipogênese hepática com elevada produção de VLDL (ELLIOT *et al.*, 2002). Contrariamente aos nossos achados, alguns estudos evidenciaram também aumento no colesterol total (KELLEY *et al.*, 2004). No entanto, os efeitos da frutose no metabolismo do colesterol total não estão bem claros (BEZERRA *et al.*, 2001; GIRARD *et al.*, 2006).

Em linhas gerais, este padrão alimentar induz uma resposta estressante ao fígado e outros tecidos que respondem com resistência a insulina e desregulação no metabolismo de lipídios (KELLEY *et al.*, 2004). Sánchez-Lozada *et al.* (2007) verificaram relação direta entre o aumento na proporção de frutose ingerida na dieta com a piora nas características da síndrome metabólica (controle < frutose10% < frutose60%).

As discrepâncias com outros estudos relacionadas à indução de obesidade (WANG *et al.*, 2007; JÜRGENS *et al.*, 2005) e resistência à insulina (BEZERRA *et al.*, 2001; JOYEUX-FAURE *et al.*, 2006) também podem estar relacionadas à linhagem dos animais adotados e ao tempo de exposição à dieta. Os períodos de administração da dieta descritos na literatura variaram de 2 a 13 semanas (SÁNCHEZ-LOZADA *et al.*, 2007; BEZERRA *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007; JOYEUX-FAURE *et al.*, 2006; ORON-HERMAN *et al.*, 2005; KELLEY *et al.*, 2004; ROGLANS *et al.*, 2007; JÜRGENS *et al.*, 2005; KANAREK e ORTHEN-GAMBILL, 1982), e muitos destes estudos utilizaram ratos da linhagem Sprague-Dawley (DAI e MACNEILL, 1995; SÁNCHEZ-LOZADA *et al.*, 2007; SHARABI *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007; KELLEY *et al.*, 2004; ROGLANS *et al.*, 2007; JÜRGENS *et al.*, 2005) ou cepa SHR - ratos espontaneamente hipertensos (CESARETTI e KOHLMANN *et al.* 2006).

A resposta do lactato sanguíneo durante o teste de esforço, permitiu determinar a MFEL em ambos os grupos. Gobatto *et al.* (2001) relataram que em ratos eutróficos a MFEL ocorreu quando os animais exercitaram-se suportando sobrecargas equivalentes a 5-6% do peso corporal e foram encontradas concentrações médias de lactato em 5.5 mmol/L.

No presente estudo, para as cargas correspondentes à MFEL não houve diferenças entre os grupos, o que indica que os animais alimentados com frutose não tiveram sua capacidade aeróbia prejudicada. Ainda, em exercício na carga de trabalho referente à transição dos metabolismos aeróbio/anaeróbio, apresentaram respostas fisiológicas similares quanto à cinética e [lac]s final. Pode-se inferir que os mecanismos de produção e/ou remoção do lactato não foram afetados ou de alguma maneira contrabalanceados.

Na metabolização da frutose ingerida, a maior parte é extraída pelos tecidos esplânicos, nos quais pode ser convertida em glicose, lipídios (MAYES, 1993) ou lactato (HITTEL *et al.* 2005). A ausência de diferenças na glicemia basal e no lactato sanguíneo aponta para a via lipogênica do metabolismo como a preferencial no organismo de ratos sedentários.

O nível de capacidade aeróbia de humanos adultos (BORODULIN *et al.* 2005) e crianças (RIZZO *et al.*, 2007) apresenta relação inversa com o risco de desenvolver a síndrome metabólica (LAKKA e LAAKSONEN, 2007). Provavelmente, essa relação é o reflexo de um estilo de vida fisicamente ativo, através do qual pode-se desenvolver uma capacidade aeróbia mais elevada. Os achados de Hittel *et al.* (2005) corroboram essa hipótese, pois reportaram que a prática regular de atividade física promove alterações na atuação de algumas enzimas chaves do sistema metabólico. Tais alterações são descritas como capazes de prevenir e atenuar os efeitos da síndrome metabólica (HITTEL *et al.* 2005).

A constatação de que a capacidade aeróbia não é prejudicada na presença de algumas alterações fisiológicas inerentes à síndrome metabólica, tem especial importância para a prescrição de atividade física para os grupos de risco. O fato do metabolismo da frutose não alterar a MFEL indica que esse parâmetro também pode ser empregado, em estudos futuros, para determinar a intensidade e o volume adequados de exercício.

Pode-se concluir que as alterações na tolerância à glicose e nos triglicérides séricos, provocados pela dieta rica em frutose, não prejudicam a capacidade aeróbia de ratos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Clarice Sibuya, José Roberto Rodrigues e Eduardo Custódio pela contribuição técnica. Suporte financeiro: Fapesp processo 07/54098-0; CNPq processo 30027/2004-6.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, C. R. et al. Opposite lipemic response of Wistar rats and C57BL/6 mice to dietary glucose or fructose supplementation. **Braz J Med Biol Res**, v.40, p.323-31, 2007.
- BERNARDIS, L.L.; PETTERSON, B.D. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J Endocrinology**, v.40, p.527-28, 1968.
- BEZERRA, R.M.N, et al. A high-fructose diet induces insulin resistance but not blood pressure changes in normotensive rats. **Braz J Med Biol Res**, v.34, p.1155-60, 2001.
- BORODULIN, K. et al. Associations between estimated aerobic fitness and cardiovascular risk factors in adults with different levels of abdominal obesity. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil**, v.12, n.2, p.126-31, 2005.
- BRIEN, S.E.; JANSSEN, I.; KATZMARZYK, P.T. Cardiorespiratory fitness and metabolic syndrome: US National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. **Appl Physiol Nutr Metab**, v.32, n.1, p.143-7, 2007.
- CESARETTI, M.L.R.; KOHLMANN-Jr, O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.50, n.2, p.190-97, 2006.
- CINTI S. The adipose organ. **Prost, Leuk Essent Fatty Acids**, v.73, p.9–15, 2005.
- DAI, S.; MCNEILL, J.H. Fructose-induced hypertension in rats is concentration-and duration-dependent. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v.33, p.101-7, 1995.
- ELLIOT, S.S. et al. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. **Am J Clin Nutr**, v.76, p.911-22, 2002.
- FUJIOKA, S. et al. Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. **Metabolism**, v.36, p.54-9, 1987.
- GIRARD, A. et al. Fructose-enriched diet modifies antioxidant status and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. **Nutrition**, v.22, p.758-66, 2006.
- GOBATTO, C.A. et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Bioch Phys**, part A, v.130, p.21-27, 2001.
- GROSS, L.E.; LI, L.; FORD E.S.; LIU S. Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. **Am J. Clin. Nutr**, v.79, p.774-9, 2004.
- HECK, H. et al. Justification for 4.0 Mmol/L Lactate Threshold. **Int. J. Sports Med.**, v.6, p.117-30, 1985.

HENRY, R.J.; CANNON, D.C., WILKEMAN, J. **Clinical Chemistry, principles and techniques. Harper and Harper Row Publishes.** New York, 1974.

HITTEL, D.S. et al. Exercise training increases electron and substrate shuttling proteins in muscle of overweight men and women with the metabolic syndrome. **J Appl Physiol**, v.98, p.168-79, 2005.

HWANG, I.S. et al. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. **Hypertension**, v.10, p.512-6, 1987.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf. 2005.

JOYEUX-FAURE, M. et al. Fructose-fed rat hearts are protected against ischemia-reperfusion injury. **Exp Biol Med**, v.231, p.456-62, 2006.

JÜRGENS, H. et al. Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. **Obes Res**, v.13, n.7, p.1146-56, 2005.

KANAREK, R.B.; ORTHEN-GAMBILL, N. Differential effects of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate- induced obesity in rats. **J Nutr**, v.112, p.1546-54, 1982.

KAPLAN, N.N. The deadly quartet. Upper body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. **Arch Intern Med**, v.149, p. 1514-20, 1989.

KATAKAM, P.V. et al. Endothelial dysfunction precedes hypertension in diet-induced insulin resistance. **Am J Physiol**, v.275, p.R788-92, 1998.

KELLEY, G.L.; ALLAN, G.; AZHAR, S. High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation. **Endocrinol**, v.145, p.548-55, 2004.

LAKKA, T.A.; LAAKSONEN, D.E. Physical activity in prevention and treatment of the metabolic syndrome. **Appl Physiol Nutr Metab**, v.32, n.1, p.76-88, 2007.

LEE, Y.C. et al. Plasma leptin response to oral glucose tolerance and fasting/re-feeding tests in rats with fructose-induced metabolic derangements. **Life Sci**, v.78, p.1155-62, 2006.

MATHEWS, J.N.S. et al. Analysis of serial measurements in medical research. **Br. Med. J.** v. 27, p. 230-5, 1990.

MAYES, P.A. Intermediary metabolism of fructose. **Am J Clin Nutr**, v.58, p.7545–55, 1993.

NOGUEIRA, D.M. et al. **Métodos de Bioquímica Clínica. Técnica e Interpretação.** São Paulo: Pancast, p.468; 1990.

ORON-HERMAN M. et al. The effects of S-allylmercaptocaptopril, the synthetic product of allicin and captopril, on cardiovascular risk factors associated with the metabolic syndrome. **Atherosclerosis**, v.183 p.238 - 43, 2005.

PEREIRA, L.O.; FRANCISHCHI, R.P.; LANCHI JR, A.H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.47, n.2, p.111-27, 2003.

RAYSSIGUIER, Y. et al. High fructose consumption combined with low dietary magnesium intake may increase the incidence of the metabolic syndrome by inducing inflammation. **Magnes Res**, v.19, n.4, p.237-43, 2006.

REAVEN, G. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, p. 1595-1607, 1988.

REEVES P.G.; NIELSEN F.H.; FAHEY JR G.C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **J Nutr**, v.123,p.1939-51, 1993.

RIZZO, N.S. et al. Relationship of physical activity, fitness, and fatness with clustered metabolic risk in children and adolescents: the European youth heart study. **J Pediatr**, v.150, n.4, p.388-94, 2007.

ROGLANS, R. et al. Impairment of hepatic stat-3 activation and reduction of PPAR α activity in fructose-fed rats. **Hepatology**, v.45, p.778-88, 2007.

SÁNCHEZ-LOZADA, L.G. et al. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. **AJP Renal Physiol**, v.292, p.422-9, 2007.

SHARABI, Y. et al. Effect of PPAR- γ agonist on adiponectin levels in the metabolic syndrome: lessons from the high fructose fed rat model. **Am J Hypertens**, v.20, n.2, p.206-10, 2007.

THORBURN, A.W. et al. Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. **Am J Clin Nutr**, v.49, p.155-63, 1989.

WANG, X. et al. Tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and restores adiponectin levels in rats. **Eur J Pharmacol**, v.555, p48-53, 2007.

ZAVARONI, I. et al. Risk factors for coronary artery disease in healthy persons with hyperinsulinemia and normal glucose tolerance. **N Engl J Med**, v.320, p.702-6, 1989

Artigo 3

Efeitos do exercício físico no metabolismo da glicose em músculo esquelético de ratos alimentados com dieta rica em frutose

RESUMO

A resistência à insulina, um dos principais componentes da Síndrome Metabólica, pode ser induzida em ratos através de dietas ricas em frutose. O metabolismo da frutose ocorre principalmente no fígado e segue uma via muito similar à glicólise. Devido a ausência de alguns passos limitantes presentes na via da glicose, a frutose pode ser metabolizada mais rapidamente, mas seu excesso estimula a lipogênese no fígado e esse mecanismo é o responsável pela instalação da resistência à insulina. Esse distúrbio pode promover alteração na metabolização da glicose pelo músculo esquelético. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar as vias de metabolização da glicose no músculo esquelético e se podem ser afetadas pela interação da dieta de frutose e exercício, de modo a favorecer a produção de um determinado metabólito. Ratos Wistar jovens (28 dias) foram submetidos a dois protocolos de estudo para averiguar os efeitos agudos e crônicos do exercício mediante a ingestão de dietas ricas em frutose. Os animais foram submetidos a 8 (agudo) ou 12 semanas (crônico) de dieta balanceada AIN93-G ou à base de 60% de frutose. Ao final do experimento a tolerância à glicose foi avaliada em repouso ou após uma sessão de exercício físico (agudo), a tolerância à insulina foi avaliada em repouso. No protocolo agudo, parte dos animais foi morta, imediatamente, após uma sessão de exercício de natação e comparado com seus pares em repouso. No protocolo crônico a morte dos animais ocorreu 60 horas após a última sessão de exercício. O músculo sóleo, em ambos os protocolos, foi extraído e incubado para avaliação da captação, oxidação, síntese de glicogênio e formação de lactato. A glicemia, insulinemia e perfil lipídico foram avaliados. Observou-se, no grupo frutose exercitado, melhora na cinética do GTT após o exercício no protocolo agudo e aumento na captação de glicose e síntese de glicogênio provocados pelo exercício. O grupo controle sedentário apresentou menor oxidação de glicose comparado aos outros grupos. Após o treinamento observou-se aumento na captação de glicose apenas do grupo controle treinado, porém o grupo frutose treinado apresentou diminuição da taxa de produção de lactato em comparação com seu par sedentário. Conclui-se que o exercício

físico deve ser realizado frequentemente, para que os efeitos na melhora da captação de glicose e síntese de glicogênio possam permanecer constantes.

INTRODUÇÃO

Dietas ricas em frutose têm sido apontadas como potentes indutores de alterações metabólicas no organismo. Relata-se a indução de resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão, intolerância à glicose e esteatose hepática não alcoólica em modelos animais alimentados com frutose (HWANG et al., 1987; SANCHEZ-LOZADA et al., 1990).

O metabolismo da frutose no organismo ocorre principalmente no fígado e com exceção de alguns passos na via, segue uma sequência similar com o metabolismo da glicose. Através da frutose também pode-se chegar à síntese de glicogênio, formação de lactato, ou ainda, o acetil-CoA produzido pode ser oxidado no ciclo do ácido cítrico ou utilizado como substrato para a formação de ácidos graxos livres. A síntese de triglicerídeos também pode ser favorecida pela redução dos subprodutos diidroxiketona fosfato a glicerol-3-fosfato ou de gliceradeído a glicerol, de modo a prover o esqueleto necessário para a formação dos triglicerídeos (HALLFRISCH, 1990). Apesar de apresentarem os mesmos subprodutos e disponibilidades como substratos a frutose apresenta uma maior tendência a favorecer a lipogênese quando comparada à glicose (BASCIANO et al., 2005).

O metabolismo da glicose pode ser afetado direta- ou indiretamente pela ingestão prolongada de dietas ricas em frutose. Resistência hepática e muscular à insulina e intolerância à glicose são comumente relatadas em modelos animais (HWANG et al., 1987). Por outro lado, o exercício físico é apontado como um potente regulador do metabolismo da glicose (MILLER et al., 1994).

Melhoras na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina foram relatadas, em pacientes diabéticos do tipo 2, após uma única sessão de atividade física. Observou-se um aumento na expressão protéica do transportador de glicose GLUT4 no músculo quadríceps após uma única sessão de exercício a 60-70% do VO_{2max} (KENNEDY et al., 1999). Ratos obesos Zucker ou induzidos à resistência a insulina, através de dietas ricas em gorduras, também apresentaram melhoras na sensibilidade à insulina após uma sessão aguda de exercício (HENRIKSEN, 2002; ROPELLE et al. 2006).

O músculo esquelético é um dos mais importantes tecidos periféricos atuando na captação da glicose, de modo a colaborar com a homeostase glicêmica (SALTIEL E

KAHN, 2001). Sabe-se que dietas ricas em frutose podem prejudicar a sensibilidade à insulina (BEZERRA et al., 2001), entretanto, pouco é discutido sobre as alterações agudas ou crônicas nas vias de metabolização da glicose no músculo esquelético mediante influência da frutose e do exercício físico. Pode-se hipotetizar que os efeitos agudos de uma sessão de exercício ou o treinamento podem sobrepujar possíveis limitações instaladas e redirecionar o metabolismo da glicose, alterando a distribuição dos metabólitos finais produzidos. Portanto, o objetivo do presente estudo é verificar a influência do exercício físico, agudo ou crônico, no metabolismo da glicose no músculo esquelético de ratos submetidos à dieta rica em frutose.

Materiais e métodos

Animais e seu tratamento

O estudo foi realizado com ratos adultos da linhagem Wistar, obtidos no Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – UNESP – *campus* de Botucatu. Cinco animais foram mantidos por gaiola, a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com livre acesso a água e alimento. O peso corporal e as ingestões alimentar e hídrica foram registrados uma vez por semana ao longo do experimento. Todos os experimentos com os animais foram realizados de acordo com as resoluções brasileiras específicas sobre a Bioética em Experimentos com Animais (Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979 e Decreto nº 24.645 de 10 julho de 1934). Adicionalmente, os experimentos realizados foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Fundação Hermínio Ometto (processo número: 068/2008)

Os animais foram separados randomicamente e os estudos foram conduzidos em duas séries separadas de experimentos. O primeiro experimento foi planejado para investigar os efeitos agudos de uma sessão de exercício físico realizada na intensidade da transição metabólica aeróbia/anaeróbia. Ratos jovens Wistar (28 dias de idade) foram separados, aleatoriamente, em dois grupos e receberam, durante oito semanas, dieta controle (C1) balanceada AIN93-G (REEVES et al., 1993) ou com substituição dos carboidratos por 60% de frutose (F1). Ao final do experimento parte dos animais de cada grupo foi submetido a duas sessões de exercício físico com intervalo de 48 horas entre elas e duração de 30 minutos cada. Após a primeira sessão de exercício foi realizado um teste de tolerância à glicose oral para verificação da cinética de absorção de glicose. A morte e

extração do material biológico dos animais foram realizadas imediatamente após a segunda sessão de exercício físico.

O segundo experimento foi realizado para investigar os efeitos crônicos do exercício físico sobre o metabolismo de glicose do músculo esquelético de ratos alimentados com dieta rica em frutose. Ratos jovens Wistar (28 dias de idade) foram separados, aleatoriamente, em quatro grupos e receberam, durante 12 semanas, dieta controle balanceada AIN93-G (REEVES et al., 1993) ou com substituição dos carboidratos por 60% de frutose. Parte dos animais de cada grupo foi submetida a exercício crônico (Controle treinado; Frutose treinado) em natação por 1h/dia, 5 dias/semana, durante as 12 semanas correspondentes à ingestão das dietas. Na fase de rápido aumento de peso corporal (28-90 dias) a intensidade de exercício aplicada foi correspondente a 5% do peso corporal. A partir da fase adulta dos animais (90 dias) e até o final do experimento, a intensidade do exercício foi correspondente à intensidade de transição metabólica aeróbia/anaeróbia. Ao final do experimento os animais realizaram testes de tolerância à insulina e glicose. A morte dos animais e extração do material biológico foi realizada após 60 horas de repouso em relação à última sessão de exercício.

Transição metabólica aeróbia/anaeróbia

A intensidade da transição metabólica aeróbia/anaeróbia dos animais, durante a natação, foi inferida através da Máxima Fase Estável de Lactato (MFEL) sanguíneo. A MFEL equivale à mais alta concentração de lactato no sangue, durante exercícios com cargas constantes, de modo que, a taxa de liberação desse metabólito na circulação é equilibrada com sua remoção (HECK *et al.*, 1985). A determinação da MFEL é um indicador útil para a prescrição de intensidades de exercício e avaliação do condicionamento aeróbio.

Para a determinação da MFEL utilizou-se o protocolo estabelecido por nosso grupo de pesquisa (GOBATTO et al., 2001). Os animais foram submetidos a três testes de natação com intervalos de 48 horas entre eles. Em cada teste foi utilizado uma sobrecarga constante de chumbo, atada ao torax e relativa ao peso corporal, a duração de cada teste foi de 30 minutos ou até a exaustão do animal. A cada 5 minutos foram realizadas coletas de 25 µL de sangue da cauda dos animais, para a determinação das concentrações de lactato. A mais alta sobrecarga de trabalho, na qual ainda se observa estabilização do lactato sanguíneo é inferida como correspondente à MFEL. O critério empregado de estabilização

do lactato sanguíneo foi uma diferença igual ou inferior a 1,0mM de lactato sanguíneo entre o 10° e 30° minutos de exercício. As concentrações de lactato sanguíneo foram determinadas pelo método enzimático e lidas em espectrofotômetro a 340 nm (ENGEL e JONES, 1978)

Teste de tolerância à glicose – GTT

Em ambos os experimentos o teste de tolerância à glicose (GTT) foi realizado, na última semana do período experimental, após 15 horas de jejum. Uma primeira coleta de sangue foi feita através de corte na extremidade da cauda do animal (tempo 0). Em seguida, uma solução de glicose a 80% (2 g/kg de massa corporal) foi administrada aos ratos por sonda gástrica de polietileno. Amostras de sangue foram coletadas após 30, 60 e 120 minutos com capilares heparinizados e calibrados para 25 µL, visando a determinação das concentrações de glicose.

Para verificar efeitos agudos do exercício, no primeiro experimento os animais também foram submetidos a um GTT em repouso e após uma sessão de exercício na intensidade da MFEL.

Teste de tolerância à insulina – ITT

No primeiro experimento, o ITT foi realizado, via subcutânea, 48 horas anteriormente ao GTT. Uma primeira coleta de sangue foi realizada através de corte na extremidade da cauda (tempo 0). Em seguida, foi administrada uma solução de insulina cristalina “LILLY U 40” na dose de 30 mU/100g de massa corporal do animal. Visando a determinação das concentrações de glicose, capilares heparinizados foram utilizados para coletar 25 µL de sangue aos 30, 60 e 120 minutos após a injeção.

No segundo experimento o ITT foi realizado através de injeção intraperitoneal. Uma solução de insulina com dosagem igual a 150 mU/100g foi injetada e as coletas de sangue ocorreram nos tempos 0, 4, 8, 12 e 16 minutos.

A constante para o desaparecimento da glicose sanguínea (K_{ITT}) foi calculada através da fórmula $0.693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose sanguínea foi calculado a partir da inclinação da reta de regressão dos valores da concentração de glicose em logarítimo natural na fase de decaimento linear (BONORA et al., 1989).

As concentrações de glicose sanguínea inerentes ao GTT e ITT foram determinadas pelo método enzimático colorimétrico da glicose oxidase-peroxidase, com kit comercial

(Laborlab). As amostras de sangue foram diluídas em 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 4%. Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm durante cinco minutos e o sobrenadante foi separado para dosagem. Após 15 minutos de incubação em banho à 37°C, as absorbâncias das amostras e do padrão foram lidas em espectrofotômetro a 505 nm.

Extração do material biológico

- Sangue

Todos os animais foram mortos por decaptação 60 horas depois da última avaliação "in vivo", com exceção do grupo exercitado do primeiro experimento, que foi morto após uma sessão aguda de exercício. O sangue foi coletado para a separação do soro e dosagem de glicose, ácidos graxos livres (AGL), Colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, por métodos calorimétricos (NOGUEIRA *et al.*, 1990) e a insulina por radioimunoensaio (HERBERT *et al.*, 1965).

- Tecido adiposo

O tecido adiposo das regiões subcutânea posterior, mesentérica e retroperitoneal foi removido para pesagem e determinação das concentrações de lipídios totais. A excisão dos diferentes depósitos de gordura foi realizada de acordo com a descrição de Cinti (2005). As concentrações de lipídios totais foram determinadas pelo procedimento descrito por Nogueira *et al.* (1990).

- Músculo sóleo

O músculo sóleo da pata esquerda foi retirado para avaliação da concentração total de glicogênio e do metabolismo da glicose. Fatias musculares longitudinais pesando em torno de 25 - 35 mg foram incubadas em meio de Krebs-Ringer bicarbonato enriquecido com glicose (5,5 mM), contendo [U - ^{14}C] glicose (25 µCi/mL), [^3H] 2-deoxiglicose (0,5 µCi/mL) e insulina (100 mU/mL) dentro de frascos de vidro por 1 hora e meia e contínuo gaseamento com carbogênio O_2/CO_2 (95%/5%), sob agitação constante em banho-maria (37°C). O CO_2 liberado foi captado por hiamina 10x, colocada em aparato de vidro inserido no frasco supracitado. A captação de glicose foi avaliada utilizando-se a 2-deoxiglicose (2-DG) como marcador, e a incorporação do ^{14}C a glicogênio (síntese), medindo-se a radioatividade do ^3H da 2-DG e do ^{14}C da glicose, respectivamente. A medida da quantidade de glicose oxidada foi realizada através da radioatividade do ^{14}C presente na hiamina. O lactato radioativo liberado no meio de incubação foi determinado por separação de metabólitos em coluna de troca iônica (Dowex-2, Sigma).

- Estatística

Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão e foram analisados, estatisticamente, através de teste t-student ou pela Análise de Variância *two-way* (ANOVA), onde apropriado. Quando necessário foi utilizado teste *post hoc* de bonferroni. Em todas as análises, o nível de significância foi pré-estabelecido em $p < 0.05$.

Resultados

Protocolo Agudo

A ingestão de água foi menor nos animais que receberam dieta rica em frutose (controle: $10,2 \pm 3,2$ g de água/100 g de animal vs frutose: $8,1 \pm 2,2$ g de água/100g de animal; $p < 0,05$). A ingestão média de ração por semana não foi diferente entre os grupos (controle: $6,4 \pm 2,5$ g de ração/100 g de animal vs frutose: $6,2 \pm 2,2$ g de ração/100 g de animal; $p > 0,05$). Os valores de MFEL não diferiram entre os grupos (controle: 5.7 ± 0.36 vs frutose: 5.6 ± 0.44 % da massa corporal). A sensibilidade periférica à insulina, inferida pelo índice K_{ITT} não foi diferente entre os grupos (controle: 0.69 ± 0.05 $\% \cdot \text{min}^{-1}$ vs frutose: 0.72 ± 0.12 $\% \cdot \text{min}^{-1}$; $p > 0,05$).

O GTT em repouso permitiu evidenciar uma cinética inicial de captação de glicose mais lenta para o grupo frutose, $p < 0.05$. Entretanto, após uma única sessão de exercício na intensidade da MFEL não mais foram encontradas diferenças na cinética (figura 1).

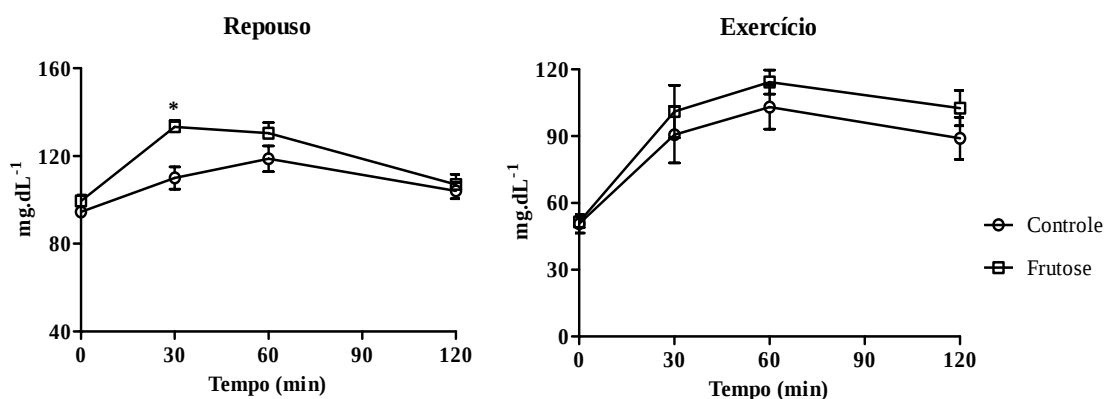


Figura 1. Cinética da glicose sangüínea em repouso e após uma sessão de exercício, * $p < 0.05$.

Embora tenha sido evidenciado diferença entre os grupos na cinética de captação de glicose em repouso, Anova não revelou diferença na área sob a curva de glicose do GTT relacionada à dieta, porém evidenciou efeito do exercício nos menores valores apresentados pelos grupos exercitados (figura 2).

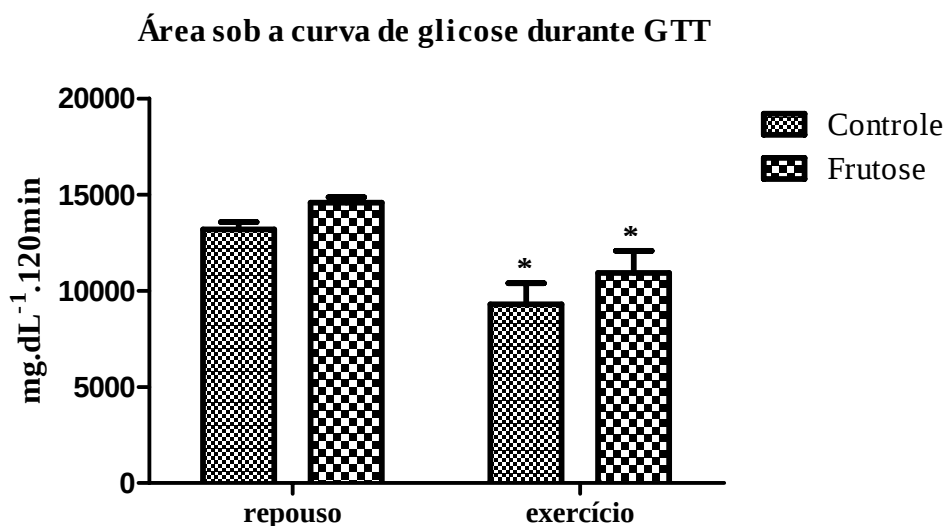


Figura 2. Área sob a curva glicêmica durante teste de tolerância à glicose, realizado na situação de repouso e após uma sessão de exercício. *diferente da situação repouso $p < 0,05$.

A tabela 1 apresenta os resultados das variáveis analisadas no experimento agudo. A glicose e insulina séricas não foram afetadas pela dieta ou exercício. O colesterol total sérico apresentou efeitos de dieta e exercício, porém não houve interação entre esses fatores, de modo que os grupos sedentários e/ou alimentados com frutose apresentaram concentrações mais altas. As concentrações de triglicerídeos séricos foram mais altas nos grupos alimentados com frutose e nenhum efeito do exercício pode ser observado. Efeitos da dieta e do exercício puderam ser observados no HDL-colesterol, a dieta de frutose e o exercício agudo evidenciaram concentrações mais altas dessa lipoproteína. As concentrações de LDL-colesterol, lipídeos totais no fígado e de glicogênio no músculo sóleo não apresentaram diferenças. Também não foram observadas diferenças na massa dos tecidos adiposos retroperitoneal, mesentérico e subcutâneo.

Tabela 1. Variáveis analisadas no protocolo de exercício agudo, após 8 semanas de tratamento dietético.

PARAMETRO	<i>Sedentário</i>		<i>Exercício</i>	
	<i>Controle</i>	<i>Frutose</i>	<i>Controle</i>	<i>Frutose</i>
Glicose sérica (mM)	5.24 ± 0.09	5.52 ± 0.14	5.25 ± 0.10	5.49 ± 0.16
Insulina sérica (μU/mL)	22.6 ± 6.12	21.8 ± 1.85	25.5 ± 9.3	25.7 ± 6.6
Colesterol total (mM)	2.79 ± 0.36	2.88 ± 0.16 ^a	2.05 ± 0.07 ^b	2.40 ± 0.19 ^{a,b}
Triglicerídeos séricos (mM)	0.73 ± 0.09	1.11 ± 0.10 ^a	0.77 ± 0.08	0.91 ± 1.0 ^a
LDL-colesterol (mM)	0.79 ± 0.14	0.94 ± 0.14	0.58 ± 0.09	0.80 ± 0.07
HDL-colesterol (mM)	0.97 ± 0.11	1.08 ± 0.1 ^a	1.14 ± 0.09 ^b	1.52 ± 0.13 ^{a,b}
Lipídeos totais fígado (mg/100mg)	6.49 ± 0.47	6.85 ± 0.9	5.17 ± 0.35	6.15 ± 1.12
Glicogênio sóleo (mg/100g)	47.9 ± 0.74	46.9 ± 1.67	48.0 ± 0.60	45.6 ± 2.19
Gordura Retroperitoneal (mg/100g)	714 ± 119	743 ± 96	639 ± 49	627 ± 82
Gordura Mesentérica (mg/100g)	763 ± 97	756 ± 68	616 ± 72	709 ± 72
Gordura Subcutânea (mg/100g)	776 ± 146	644 ± 78	574 ± 69	553 ± 49

^a ≠ da dieta controle; ^b ≠ dos grupos sedentários; p<0,05. Valores apresentados em média ± EP. (n=8).

Os resultados do metabolismo da glicose em músculo sóleo incubado no protocolo agudo podem ser observados na figura 3. Foi observada interação entre o exercício e a dieta na captação de glicose. O grupo frutose sedentário apresentou menor captação em comparação com os grupos exercitados. Também observou-se interação entre os fatores para a oxidação da glicose. O grupo controle sedentário apresentou menor oxidação em comparação com todos os outros grupos. A incorporação de glicose no músculo incubado, inferida como síntese de glicogênio, foi maior no grupo controle exercitado em comparação com todos os outros grupos. A produção de lactato foi influenciada pelo fator exercício, os grupos sedentários apresentaram menor produção desse metabólito da glicose.

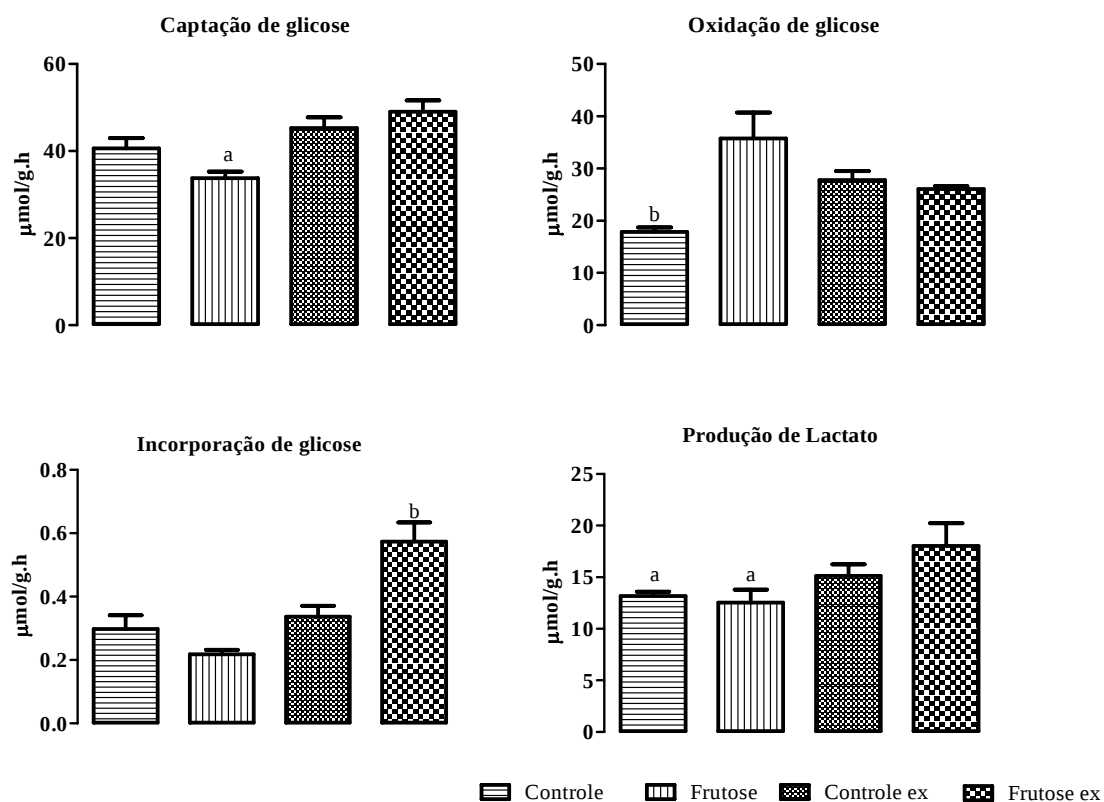


Figura 3. ^a ≠ dos grupos exercitados; ^b ≠ de todos os grupos; valores expressos em média ± EP, p<0.05.

Protocolo crônico

A figura 4 apresenta a evolução da massa corporal dos animais submetidos ao protocolo crônico durante 12 semanas. Não foram observadas diferenças na evolução e na massa final dos animais entre os grupos.

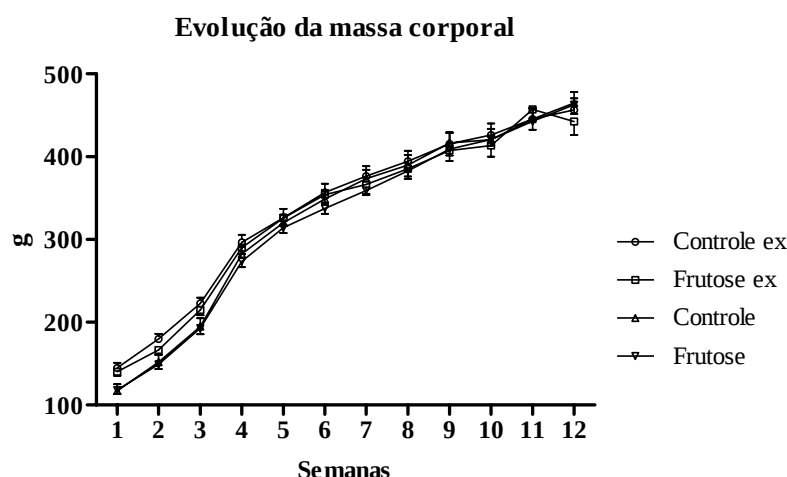


Figura 4. Evolução da massa corporal dos animais submetidos ao protocolo crônico. Valores em média $\pm$ EP.

Os valores da MFEL não foram diferentes entre os grupos exercitados (controle: 5.65 ± 0.42 vs frutose: 5.04 ± 0.33 % da massa corporal) A tabela 2 apresenta a área sob a curva da ingestão alimentar e hídrica, bem como da curva glicemia durante o GTT e os valores do K_{ITT} . Não foram encontradas diferenças na ingestão alimentar, porém a ingestão hídrica foi menor nos grupos alimentados com frutose. O índice K_{ITT} não evidenciou resistência à insulina em nenhum dos grupos. A área sob a curva de glicose durante o GTT não foi diferente entre os grupos. Também não foram encontradas diferenças entre os grupos na cinética da glicemia durante o GTT (figura 5).

Tabela 2. Ingestão alimentar e hídrica, índice K_{ITT} e área sob a curva de glicose durante GTT.

PARAMETRO	Sedentário		Exercício	
	Controle	Frutose	Controle	Frutose
ASC – Ingestão alimentar (g.12sem.)	246.1 $\pm$ 11.0	245.3 $\pm$ 10.4	244.8 $\pm$ 9.5	225.0 $\pm$ 3.3
ASC – Ingestão hídrica (g.12sem.)	235.0 $\pm$ 8.9	187.1 $\pm$ 4.5 ^a	203.3 $\pm$ 6.7	185.5 $\pm$ 3.5 ^a
ASC – glicemia no GTT mM.120min	801.9 $\pm$ 24.2	820.1 $\pm$ 29.2	840.5 $\pm$ 31.6	850.0 $\pm$ 27.0
K_{ITT} (%.min ⁻¹)	4.2 $\pm$ 0.73	3.5 $\pm$ 0.42	3.7 $\pm$ 0.46	4.5 $\pm$ 0.35

^a $\neq$ da dieta controle, $p < 0.05$. ASC: Área sob a curva; GTT: Teste de tolerância à glicose; K_{ITT} : constante de decaimento da glicose durante teste de tolerância à insulina.

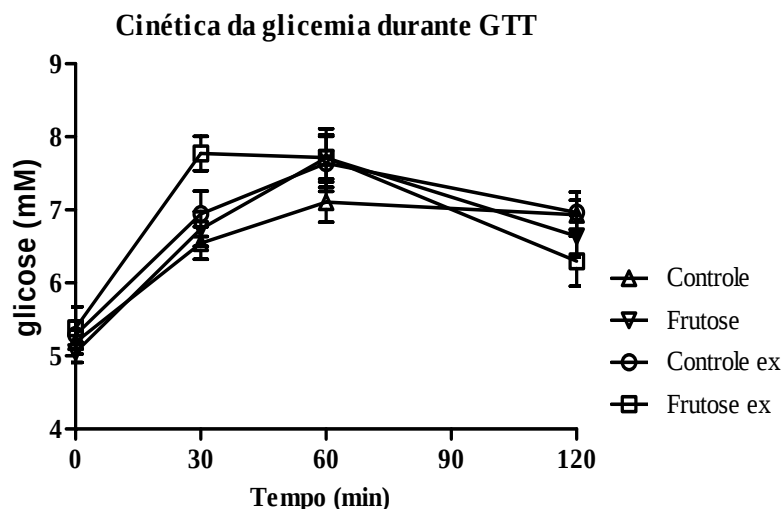


Figura 5. Cinética da glicemia durante teste de tolerância à glicose.

A tabela 3 apresenta os resultados das variáveis analisadas no protocolo de exercício crônico. A glicose, a insulina e o colesterol total séricos não apresentaram diferenças entre os grupos. As concentrações séricas de triglicerídeos foram maiores nos grupos alimentados com dieta rica em frutose e não apresentaram interação com o exercício. A fração LDL do colesterol não apresentou diferença entre os grupos, porém a fração HDL sofreu influência do exercício e foi menor nos grupos exercitados. As concentrações de triglicerídeos no fígado e de glicogênio muscular no sóleo não foram afetadas pelos tratamentos. Os depósitos de gordura mesentérico e subcutâneo apresentaram-se significativamente reduzidos nos grupos treinados e não houve influência da dieta. Entretanto, a massa do tecido adiposo retroperitoneal não foi diferente entre os grupos.

Tabela 3. Variáveis analisadas no protocolo de exercício crônico, após 12 semanas de treinamento e tratamento dietético.

PARÂMETRO	Sedentário		Exercício	
	Controle	Frutose	Controle	Frutose
Glicose sérica (mM)	4.7 ± 0.1	5.3 ± 0.2	5.2 ± 0.2	4.9 ± 0.2
Insulina sérica (μU/mL)	20.0 ± 3.3	25.4 ± 2.7	15.3 ± 1.6	18.2 ± 2.1
Colesterol Total sérico (mM)	2.8 ± 0.13	3.0 ± 0.05	2.7 ± 0.13	2.7 ± 0.10
Triglicerídeos séricos (mM)	1.14 ± 0.1	1.81 ± 0.3 ^a	1.37 ± 0.1	1.74 ± 0.2 ^a
LDL-C sérico (mM)	1.43 ± 0.10	1.57 ± 0.05	1.32 ± 0.07	1.41 ± 0.06
HDL-C sérico (mM)	1.13 ± 0.04	1.18 ± 0.02	1.03 ± 0.03 ^b	1.10 ± 0.03 ^b
Lipídeos totais fígado (mg/100mg)	6.7 ± 0.35	6.9 ± 0.21	6.8 ± 0.62	6.9 ± 1.03
Glicogênio sóleo (mg/100g)	38.9 ± 6.4	23.9 ± 2.5	38.4 ± 2.1	35.9 ± 1.7
Gordura retroperitoneal (mg/100g)	871.2 ± 135.7	924.6 ± 54.0	697.5 ± 87.9	687.2 ± 120.1
Gordura mesentérica (mg/100g)	868.5 ± 89.2	1017 ± 77.3	765.6 ± 100.1 ^b	750.1 ± 63.0 ^b
Gordura subcutânea (mg/100g)	631.8 ± 97.4	482.4 ± 53.8	391.7 ± 26.9 ^b	321.3 ± 36.4 ^b

^a ≠ da dieta controle; ^b ≠ do grupo sedentário; valores expressos em média ± EP, p<0.05.

Os resultados do metabolismo da glicose no músculo sóleo de ratos do protocolo crônico podem ser observados na figura 6. Houve interação entre o exercício e a dieta na captação de glicose, o grupo controle treinado apresentou valores de captação de glicose ~20% maiores em comparação ao controle sedentário, porém não foram encontradas diferenças para os grupos frutose. A oxidação de glicose e síntese de glicogênio não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Porém a produção de lactato do grupo frutose exercitado é cerca de 25% menor em comparação com o frutose sedentário.

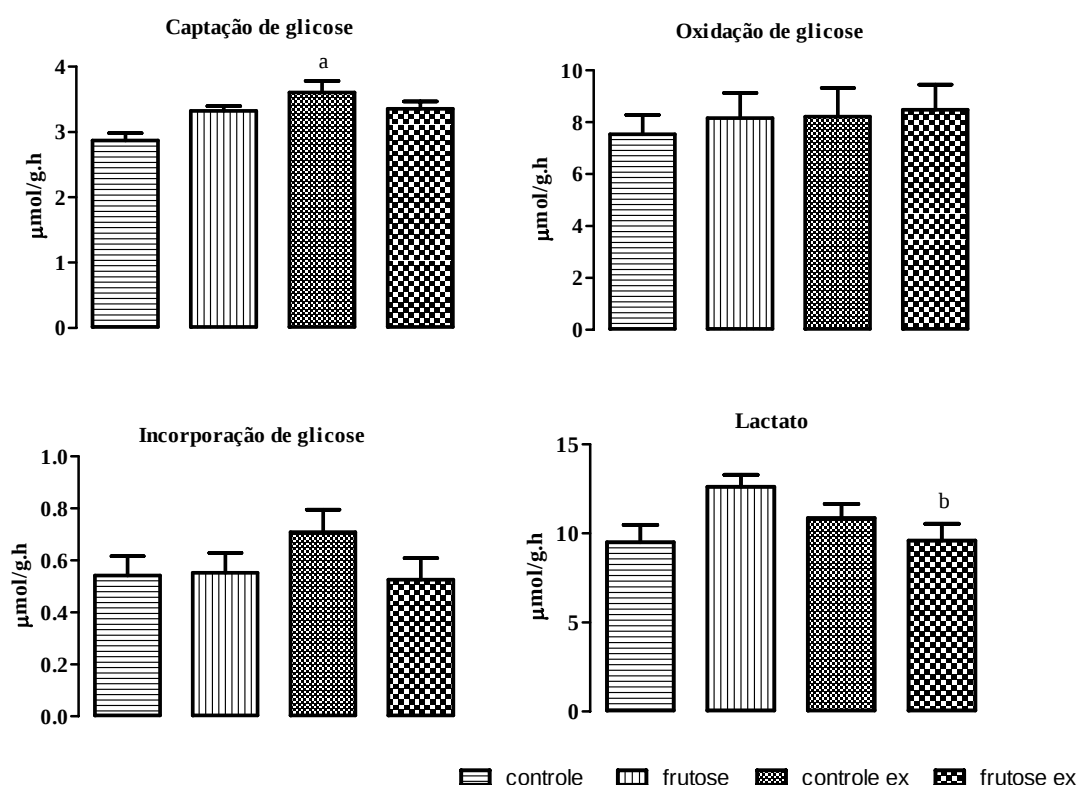


Figura 6. ^a ≠ controle sedentário; ^b ≠ frutose sedentário; valores expressos em média ± EP, p<0.05.

Discussão

O aumento na ingestão de frutose nas últimas décadas tem sido apontado como um dos fatores associados à elevação na prevalência de obesidade (ELLIOT et al., 2002). Estudos com modelos animais demonstraram que dietas ricas em frutose são capazes de promover alterações metabólicas correspondentes à síndrome metabólica humana (HWANG et al., 1987; KELLEY et al., 2004). O presente estudo investigou a hipótese de que as respostas fisiológicas agudas ou crônicas promovidas pelo exercício físico, em ratos, poderiam atenuar eventuais distúrbios metabólicos provocados pela frutose.

Não foram encontradas diferenças na massa corporal dos animais em nenhum dos dois protocolos. De fato, diferenças na massa corporal pertinentes à ingestão de frutose são mais frequentes em hamsters (KASIN-KARAKAS et al., 1996), ratos Sprague-Dawley (KANAREK e ORTHEN-GAMBILL, 1982) e também em humanos (TORDOFF et al., 1990). A ingestão alimentar durante as oito (protocolo agudo) ou doze semanas (protocolo crônico) de tratamento dietético não apresentou diferenças entre os grupos, corroborando

resultados de Nandhini *et al* (2005). A baixa liberação de insulina e leptina e o esvaziamento gástrico mais rápido, provocados pela frutose, levantou a hipótese de seu menor efeito na saciedade quando comparada à glicose (MORAN *et al*, 2009). Não há consenso na literatura sobre esse tema. Alguns estudos que utilizaram pré-cargas de frutose ou glicose em diferentes tempos, anteriormente à disponibilização de alimento, encontraram menor saciedade para a frutose quando o tempo entre a pré-carga e a disponibilização de alimento eram mais curtos (RODIN *et al.*, 1990) ou mais longos (RODIN *et al.*, 1988; GUSS *et al.*, 1994). Esses resultados parecem ser diretamente influenciados pelas concentrações dos nutrientes nas pré-cargas ou ainda, pelo estado alimentado ou de jejum da noite anterior aos experimentos. De qualquer forma, o padrão de ingestão alimentar observado nos protocolos agudo ou crônico não foi influenciado pelos nutrientes da dieta. Assim mesmo se alterações na taxa de ingestão estiverem presentes (MORAN *et al.*, 1981), o consumo total de alimento não é afetado.

A menor ingestão hídrica evidenciada para os ratos alimentados com frutose em ambos os protocolos é interessante. Barbosa *et al.* (2007) em protocolo de suplementação através de gavagem relataram ingestão de água duas vezes menor em ratos suplementados com frutose, em comparação com glicose. Mas o resultado oposto foi observado em camundongos C57BL/6, com a glicose estimulando mais a ingestão de água em comparação com a frutose.

Os protocolos dietéticos de 8 ou 12 semanas não foram capazes de induzir intolerância à glicose, resistência à insulina ou hiperinsulinemia. Entretanto a absorção mais lenta de glicose, observada nos primeiros 30 minutos do GTT no protocolo agudo em repouso, indica um leve comprometimento da captação de glicose. Porém, após o exercício, o reestabelecimento do padrão normal de absorção de glicose corrobora estudos que apontaram melhoras nesse parâmetro em resposta ao exercício (HENRIKSEN, 2002).

Embora outros estudos tenham reportado resistência à insulina induzida por dieta rica em frutose (BEZERRA *et al*, 2001; BEZERRA *et al.*, 2000), a idade inicial e a linhagem dos roedores parecem exercer papel fundamental na indução. Em estudo anterior nosso grupo observou que ratos Wistar adultos (90 dias de idade) submetidos a 4 semanas de dieta rica em frutose apresentaram menor índice K_{ITT} e maior área sob a curva de glicose comparado a seus pares controles. Entretanto, ratos Wistar jovens (28 dias de idade) não apresentaram resistência à insulina apesar de 8 semanas de tratamento dietético (MOURA *et al.*, 2009). No presente estudo pode-se observar que mesmo com a extensão

do tratamento dietético por até 12 semanas, a glicemia e tolerância à glicose não foram afetadas. Foi demonstrado em ratos jovens que a via PI3-kinase/Akt, via molecular envolvida na regulação da captação de glicose, está diretamente relacionada com a captação de frutose através de seu transportador específico GLUT5. Os autores demonstraram que inibidores químicos da PI3-kinase e da Akt diminuía, a captação de frutose via atuação pós-transcricional (CUI et al., 2005). Foi relatado aumento na expressão da PI3-kinase em ratos Sprague-Dawley submetidos à dieta rica em frutose (BHANOT et al., 1999). Pode-se inferir que a PI3-kinase e o GLUT5 estariam relacionados de modo a formar um *feedback* positivo. A expressão do GLUT5 desenvolve-se após o período de amamentação e é fortemente associada à disponibilidade de seu substrato (DOUARD e FERRARIS, 2009). Porém, ativação da Akt também está associada a aumento em transportadores da glicose, como o GLUT 2 nos enterócitos e GLUT4 nos músculos e tecido adiposo, de forma que a captação de glicose poderia ser favorecida indiretamente. O rápido aumento na expressão do GLUT5 e possível aumento na sinalização da via PI3-kinase/Akt poderiam ser os responsáveis pela manutenção do metabolismo normal de glicose quando a dieta é administrada em ratos Wistar, logo após o desmame. Entretanto, essa hipótese não é suficiente para explicar possíveis mecanismos de proteção contra resistência à insulina em diferentes linhagens de ratos jovens. Pois, ratos Sprague-Dawley demonstram grande sensibilidade aos efeitos deletérios da frutose mesmo com dietas iniciadas a partir de cinco semanas de idade (BHANOT et al., 1999).

Em ambos os protocolos observou-se aumento nos triglicerídeos séricos nos grupos alimentados com frutose, em concordância com os achados de outros autores, em ratos (SLEDER et al, 1980) e humanos (HALLFRISCH et al., 1990). Entretanto, a atividade física aguda ou crônica não foi capaz de promover alterações nesse parâmetro. A dieta de frutose não foi eficaz em induzir aumento na fração LDL do colesterol e nas concentrações de lipídeos totais no fígado conforme relatado por outros autores (BASCIANO et al., 2005). Entretanto, após oito semanas de dieta a fração HDL foi aumentada pela dieta de frutose e também após uma sessão aguda de exercício. Dentre todos os efeitos metabólicos provocados pela dieta de frutose, o aumento no HDL é o único efeito benéfico em contraposição aos fatores associados ao aumento do risco cardiovascular. Em estudo com diferentes concentrações de frutose na dieta de ratos, também foram observados aumentos na concentração de HDL-C. Os autores sugerem uma concentração de 10% como o ideal para eliciar aumento no HDL-C sem entretanto, promover outras alterações prejudiciais

(BENADO et al., 2004). Apesar do aumento no HDL-C após o exercício agudo, o efeito crônico do exercício levou a uma pequena, mas significativa diminuição nessa lipoproteína. O tempo entre a última sessão de exercício e a morte dos animais no protocolo crônico pode ter mascarado possíveis efeitos agudos. Porém, o mecanismo de atuação do exercício no HDL-C não está esclarecido, e o aumento na concentração plasmática não é consenso na literatura (SHIEKEN, 1991) esses resultados podem estar relacionados aos protocolos de exercício adotados, predisposição genética ou variáveis não identificadas associadas ao exercício. No protocolo de oito semanas foram encontradas diferenças para o colesterol total relacionada à dieta e ao exercício agudo, porém nenhuma diferença foi observada no protocolo crônico. A possibilidade de efeitos transitórios do metabolismo da frutose (HILL, 1970) dificulta a reprodutibilidade dos parâmetros metabólicos mediante diferentes períodos de indução.

Os protocolos de ingestão de frutose de 8 ou 12 semanas não promoveram alterações na massa total dos tecidos adiposos. Entretanto, o exercício crônico foi capaz de promover valores mais baixos para os depósitos de gordura mesentérica e subcutânea. Esse dado demonstra que a utilização do tecido adiposo como substrato energético (CURI et al., 2003) e/ou a diminuição da sinalização para acúmulo de gordura (PLAISANCE et al., 2009), características importantes do treinamento físico, não são afetadas pela ingestão de frutose.

A captação muscular de glicose no grupo frutose exercitado, do protocolo agudo, foi superior à observada no grupo frutose sedentário. Apesar de não haver diferença significativa entre os grupos controle e frutose sedentários, é importante destacar que os animais exercitados submetidos à dieta controle não apresentaram a necessidade e/ou capacidade de aumentar a taxa de captação em comparação com seus pares sedentários. Assim, após o exercício parece haver um favorecimento para a entrada de glicose na musculatura esquelética de ratos alimentados com frutose. Em contrapartida, foi reportado que, em ratos controle submetidos a uma sessão de corrida, durante 1 hora, houve aumento de ~1.5 vezes na captação de glicose, nos primeiros 30 minutos após o exercício, em comparação com sedentários, porém a diferença desapareceu após 2 horas. Os autores relataram que essa elevação na captação muscular de glicose é devido a aumento na quantidade e atividade de transportadores de glicose (GOODYEAR et al., 1990).

Interessantemente, a oxidação da glicose no grupo frutose sedentário é maior em comparação ao grupo controle e não tem diferença em relação aos grupos exercitados.

Somando-se ao fato da produção de lactato ser menor nos grupos sedentários em comparação aos exercitados, observa-se que a via preferencial de metabolização da glicose, no músculo esquelético, após oito semanas de dieta rica em frutose é a oxidação. Esse efeito pode denotar uma diminuição na oxidação de ácidos graxos, os quais têm preferência de oxidação em repouso e em exercício leves como uma forma de poupar a glicose (CURI et al., 2003). Já o efeito agudo do exercício no grupo frutose exercitado, permite um redirecionamento da via, favorecendo a incorporação da glicose na forma de glicogênio, em proporções mais altas do que em repouso ou mesmo em comparação com o grupo controle exercitado. Corroborando os achados de Ploug et al. (1987), esse aumento na velocidade de incorporação de glicose não pode ser considerado uma resposta à depleção de glicogênio, haja visto, que suas concentrações totais no músculo não foram diferentes entre os grupos.

Já o metabolismo da glicose no protocolo crônico obedeceu a padrões diferentes dos observados após o exercício agudo. A captação de glicose no grupo controle exercitado é maior em comparação aos seus pares. Isso demonstra uma adaptação positiva do tecido muscular que não pôde ser reproduzida pelo grupo frutose treinado em comparação ao sedentário. Ao observar o aumento na captação de glicose do grupo frutose exercitado no protocolo agudo, pode-se levantar duas possibilidades. A primeira delas é a de que os efeitos agudos tendem a desaparecer depois de um período de exercício crônico, ou a possibilidade mais provável, de que o tempo de 60 horas, desde a última sessão de exercício até a morte dos animais, foi demasiado longo para que o grupo frutose treinado pudesse sustentar um aumento na captação observado agudamente. Bonen et al. (1992) investigaram os efeitos agudos e crônicos do exercício no metabolismo da glicose em diferentes tempos após a última sessão de exercício. Foi relatado que, diferentemente dos animais sedentários, o metabolismo da glicose permaneceu ativo em ratos treinados em até 96 horas. Adicionalmente, observou-se que animais não treinados, mas submetidos a uma sessão aguda apresentam maior síntese de glicogênio comparados aos não exercitados (BONEN, et al., 1992). Assim, pode-se inferir que os efeitos crônicos do exercício na captação de glicose muscular são reduzidos pela ingestão de frutose em comparação com a dieta balanceada. Não houve diferenças nas vias de oxidação ou síntese de glicogênio entre os grupos, entretanto, um aspecto positivo do treinamento no grupo frutose foi a diminuição na taxa de produção de lactato. Em associação à captação de glicose similar ao grupo frutose sedentário, observa-se que a razão captação/produção de lactato também é

menor, diminuindo a acidose celular e o possível desgaste energético para a manutenção do equilíbrio ácido-básico (ARONSON, 1983).

Conclui-se que os efeitos agudos do exercício físico aplicado em ratos alimentados com dieta rica em frutose, incluem melhora na cinética de captação da glicose durante GTT e aumento na taxa de captação da glicose muscular, favorecendo a síntese de glicogênio. O exercício crônico promove diminuição da massa dos tecidos adiposos e na taxa de produção muscular de lactato. Porém, após 60 horas de repouso a dieta rica em frutose não permitiu evidenciar diferenças na captação de glicose entre os animais treinados e sedentários. Assim, o exercício físico deve ser realizado frequentemente para que os efeitos agudos possam sobrepujar efeitos prejudiciais da frutose na captação de glicose pelo tecido muscular.

Referências

- ARONSON, P. Mechanisms of active H⁺ secretion in the proximal tubule. **Am. J Physiol**, v.245, p.F647-F659, 1983.
- BARBOSA, C. R. et al. Opposite lipemic response of Wistar rats and C57BL/6 mice to dietary glucose or fructose supplementation. **Braz J Med Biol Res**, v.40, p.323-31, 2007.
- BASCIANO, H., Federico, L.; Adeli, K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. **Nutrition & Metabolism** v.2, p. 5-18, 2005.
- BENADO, M. et al. Effects of various levels of dietary fructose on blood lipids of rats. *Nutrition Research*, v.24, n.7, p.565-571, Jul. 2004.
- BEZERRA, R. M. N., et al. A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver rats. **J Nutr**, v. 130, p. 1531-1535, 2000.
- BEZERRA, R. M. N., et al. A high-fructose diet induces insulin resistance but not blood pressure changes in normotensive rats. **Braz J Med Biol Res**, v.34, p.1155-60, 2001.
- BHANOT S., et al. In vivo regulation of protein-serine kinases by insulin in skeletal muscle of fructose-hypertensive rats. **Am J Physiol**, v. 277 (Endocrinol Metabl, v. 40), p. E299-E307, 1999.
- BONEN et al. Persistence of glucose metabolism after exercise in trained and untrained soleus muscle. **Diabetes Care**, v.15, p. 1694-1700, Nov. 1992.
- BONORA, E. et al. Estimates of *in vivo* insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J Clin Endocrinol Metabol**, v. 68, n. 2, p. 374-378, 1989.
- CINTI S. The adipose organ. **Prost, Leuk Essent Fatty Acids**, v.73, p.9–15, 2005.
- CUI, et al. Fructose-induced increases in neonatal rat intestinal fructose transport involve the PI3-kinase/Akt signaling pathway. **Am J Gastrointest Liver Physiol**, v. 288, p. G1310-G1320, 2005.
- CURI, R. et al. Ciclo de Krebs Como Fator Limitante naUtilização de Ácidos Graxos Durante o Exercício Aeróbico. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.47, p.135-143, 2003.
- DOUARD, V. ; FERRARIS, R. P. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, p. E227-E237, 2008.
- ELLIOT, S.S. et al. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. **Am J Clin Nutr**, v.76, p.911-22, 2002.
- ENGEL R.C.; JONES J.B. Causes and elimination of erratic blanc in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for assay of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. **Anal Bioch**, v.88, p.475-84, 1978.

GOBATTO, C.A. et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Bioch Phys**, part A, v.130, p.21-27, 2001.

GOODYEAR, L. J. Skeletal muscle plasma membrane glucose transport and glucose transporters after exercise. **J Appl Physiol**, v. 68, n. 1, 1990.

GUSS, J. L.; KISSILEFF, H. R., PI-SUNYER, F. X. Effects of glucose and fructose solutions on food intake and gastric emptying in nonobese women. **Am J Physiol**, v. 267, p. R1537-R1544, 1994

HALLFRISCH, J. Metabolic effects of dietary fructose. **FASEB J**, v.4, p.2652-60, 1990

HECK, H. et al. Justification for 4.0 Mmol/L Lactate Threshold. **Int. J. Sports Med**, v.6, p.117-30, 1985.

HENRIKSEN, E. J. Exercise effects of muscle insulin signaling and action. Invited Review: Effects of acute exercise training on insulin resistance. **J Appl Physiol**, v. 93, n. 2, p. 788-796, 2002.

HERBERT, V. et al. Coated charcoal immunoassay of insulin. **J Clin Endocrinol Metab**, v.25, n.10, p.1375-1384, Oct. 1965.

HILL, P. Effect of fructose on rat lipids. **Lipids**, v. 5, n. 7, 1970.

HWANG, I.S. et al. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. **Hypertension**, v.10, p.512-6, 1987.

KANAREK, R.B.; ORTHEN-GAMBILL, N. Differential effects of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate- induced obesity in rats. **J Nutr**, v.112, p.1546-54, 1982.

KASIM-KARAKAS, S.E. et al. Effects of dietary carbohydrates on glucose and lipid metabolism in golden Syrian hamsters. **J Lab Clin Med**, , v.128, p.208-213, 1996.

KELLEY, G.L.; ALLAN, G.; AZHAR, S. High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation. **Endocrinol**, v.145, p.548-55, 2004.

KENNEDY J.W. et al. Acute exercise induces GLUT4 translocation in skeletal muscle of normal human subjects and subjects with type 2 diabetes. **Diabetes**, v.48, n.5, p.1192-1197, May. 1999.

MILLER, J.P. et al. Strength training increases insulin action in healthy 50- to 65-yr-old men. **J Appl Physiol**, v.77, p.1122-7, 1994.

MORAN, T. H. Fructose and satiety. **J Nutr**, v. 139, p. 1253S-1256S, 2009.

MORAN, T. H.; McHUGH PR. Distinctions among three sugares in their effects on gastric emptying and satiety. **Am J Physiol**, v. 241, p. R25-R30, 1981

MOURA, R. F. et al. Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose diet protocols, **Br J Nutr**, v. 101, p. 1178-1184, 2009. First published online on November 28th, 2008.

NANDHINI, A. T. et al. Effect of taurine on biomarkers of oxidative stress in tissues of fructose-fed insulin-resistant rats. **Singapore Med J**, v. 46, n. 2, p. 82-87, 2005.

NOGUEIRA, D.M. et al. **Métodos de Bioquímica Clínica. Técnica e Interpretação**. São Paulo: Pancast, p.468; 1990.REEVES P.G.; NIELSEN F.H.; FAHEY Jr G.C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **J Nutr**, v.123,p.1939-51, 1993.

PLAISANCE, E.P.; GRANDJEAN, P.W.; MAHURIN, A.J. Independent and Combined Effects of Aerobic Exercise and Pharmacological Strategies on Serum Triglyceride Concentrations: A Qualitative Review. **The Physician and Sports medicine**, v.37, n.1, 2009.

PLOUG, T et al. Kinetics of glucose transport in rat muscle: effects of insulin and contractions. **Am J Physiol**, v. 253 (1 pt 1), p. E12-20, Jul, 1987.

REEVES P.G.; NIELSEN F.H.; FAHEY Jr G.C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **J Nutr**, v.123,p.1939-51, 1993.

RODIN, J. Comparative effects of fructose, aspartame, glucose, and water preloads on calorie and macronutrient intake. **Am J Clin Nutr**, v. 51, p. 428-435, 1990.

RODIN, J.; REED, D.; JAMNER, L. Metabolic effects of fructose and glucose: implications for food intake. **Am J Clin Nutr**, v. 47, p. 683-689, 1988.

ROPELLE, E. R. et al. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. **J Physiol**, 577.3, p. 997-1007, 2006.

SALTIEL, R.; KAHN, C. R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, p.799-806, 2001.

SÁNCHEZ-LOZADA, L.G. et al. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. **AJP Renal Physiol**, v.292, p.422-9, 2007.

SLEDER, J. et al. Hyperinsulinemia in fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. **Metabolism**, v.29, n.4, p.303-305, Apr. 1980.

TORDOFF, M.G.; ALLEVA, A.M. Effect of drinking soda sweetened with aspartame or high-fructose corn syrup on food intake and body weight. **Am J Clin Nutr**, v.51, p. 963-969, 1990.

Artigo 4

Influencia do treinamento físico na resistência à insulina de ratos alimentados com dieta rica em frutose.

RESUMO

A síndrome metabólica envolve um conjunto de alterações metabólicas caracterizadas pela resistência à insulina, hipertrigliceridemia, intolerância à glicose, obesidade e dislipidemia. Dietas ricas em frutose podem mimetizar características dessa doença em ratos. O efeito da frutose na indução da resistência à insulina está associado à estimulação de vias moleculares lipogênicas. A melhora na resistência à insulina promovida pelo exercício físico atua, agudamente, através da fosforilação/ativação de duas importantes proteínas, Akt e AMPK, sinalizadoras para a captação de glicose, mas também reguladoras de funções anabólicas e catabólicas. O exercício físico crônico promove alterações no perfil lipídico e melhora na resistência à insulina e pode estar associado à alteração da Akt e/ou AMPK no fígado e músculo esquelético. Para investigar essa hipótese, ratos Wistar adultos foram submetidos à dieta rica em frutose ou controle, durante seis semanas, seguidas de um protocolo de treinamento aeróbico em natação, ou manutenção da situação sedentária, por quatro semanas, sem alteração da dieta. Após o treinamento, os animais foram submetidos a testes de tolerância à glicose e insulina. A morte dos animais ocorreu 60 horas após a última sessão de exercício e amostras do fígado e do músculo gastrocnêmio foram coletadas para análise do conteúdo de triglicerídeos e da expressão das proteínas Akt e AMPK totais e fosforiladas. No sangue o colesterol total, ácidos graxos livres, LDL- e HDL-colesterol e triglicerídeos foram analisados. Observou-se que a dieta de frutose induziu resistência à insulina, hipertrigliceridemia, aumento nas concentrações séricas de AGL, colesterol total e de suas frações LDL e HDL. O exercício induziu melhora na resistência à insulina e níveis de AGL iguais ao controle sedentário. Não foram observadas diferenças na Akt no fígado e gastrocnêmio ou na AMPK do gastrocnêmio. Entretanto, a AMPK no fígado se mostrou mais ativa nos grupos treinados. Conclui-se que essa ativação prolongada da AMPK pode estar associada à inibição da lipogênese e/ou maior oxidação de AGL no hepatócito. Esse mecanismo pode estar diretamente relacionado com a melhora observada na sensibilidade à insulina.

INTRODUÇÃO

Fatores de risco cardiovascular como resistência à insulina, hipertrigliceridemia, intolerância à glicose, obesidade e dislipidemia estão envolvidos no espectro de doenças que caracterizam a síndrome metabólica (ALBERTI e ZIMMET, 1998; BALKAU e CHARLES, 1999). O aumento na prevalência de distúrbios metabólicos, obesidade e diabetes tipo 2 nas últimas décadas é associado a mudanças nutricionais na dieta regular da sociedade moderna. De acordo com esse cenário, observou-se que o consumo de frutose aumentou em paralelo com os índices de obesidade e levantou a hipótese de sua associação a essas patologias metabólicas (ELLIOT et al., 2002).

Dietas ricas em frutose promovem aumento na *de novo* lipogênese e têm sido empregadas na indução de dislipidemia e resistência à insulina em modelos animais (SHARABI et al, 2007; HWANG et al., 1987; BEZERRA et al., 2007). O metabolismo e as vias de captação da glicose no fígado são perturbadas mediante a alta disponibilidade de frutose. A síntese de triglicerídeos e as taxas de lipogênese aumentam significativamente devido ao alto fluxo de glicerol e porções acil provenientes do catabolismo da frutose (HALLFRISCH, 1990). O aumento na expressão de enzimas das vias lipogênicas está associado com a resistência à insulina encontrada em ratos alimentados com dieta rica em frutose. Por outro lado, sabe-se que o exercício físico pode atuar no tratamento da obesidade e no reestabelecimento do perfil metabólico saudável (ANDERSEN et al. 1999; PERSGHINET *et al.*, 1996).

O treinamento físico está associado à melhora na captação de glicose através de aumento na ativação da sinalização da insulina (SALTIEL e KAHN, 2001). Duas proteínas importantes para essa sinalização são a serina/treonina proteína kinase (Akt) e a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), que nas suas formas ativas/fosforiladas ajudam a desencadear a translocação do transportador de glicose GLUT4 para a membrana celular, aumentando sua captação (SAKAMOTO et al., 2003; CHEN et al., 2003). A Akt pode ser ativada por estimulação da insulina através de uma sequência de passos dependentes da fosfatidilinositol 3 kinase (PI-3 kinase) (CHAN et al., 1999). A fosforilação da Akt através da insulina promove, aumento na captação de glicose, inibição da glicogenólise e aumento da síntese de glicogênio (ARMSTRONG et al., 2000). Já a AMPK tem sua atividade aumentada em resposta a um aumento na razão AMP/ATP, funcionando com um sensor do estado energético celular. A fosforilação da AMPK promove aumento na

captação de glicose, oxidação de ácidos graxos e inibição dos mecanismos de síntese proteica e de lipídeos (STEINBERG e KEMP, 2009).

O exercício físico crônico pode levar a melhoras no metabolismo da glicose e no perfil lipídico. A hipótese do presente estudo é que essas alterações podem estar associadas à alteração na ativação da Akt e AMPK, após um período de treinamento, mas com um tempo longo de repouso para última sessão, para evitar influência aguda. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar a influência de quatro semanas de exercício físico na sensibilidade à insulina, lipemia e sua relação com a expressão proteica da Akt e AMPK, em ratos submetidos à dieta rica em frutose.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e seu tratamento

O estudo foi realizado com 40 ratos adultos da linhagem Wistar, obtidos no Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – UNESP – *campus* de Botucatu. Quatro animais foram mantidos por gaiola, a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com livre acesso a água e alimento. O peso corporal e as ingestões alimentar e hídrica foram registrados uma vez por semana ao longo do experimento. Todos os experimentos com os animais foram realizados de acordo com as resoluções brasileiras específicas sobre a Bioética em Experimentos com Animais (Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979 e Decreto nº 24.645 de 10 julho de 1934).

Tratamento dietético

O alimento consistiu de rações semipurificadas balanceada controle (C) ou rica em frutose (F), numa proporção de 60%.

Tabela 1. Composição das dietas.

Componentes (g/kg)	Balanceada ¹	Rica em frutose (60%)
Caseína ²	202	202
Amido	397	-
Dextrina	130,5	-
Sacarose	100	27,5
Frutose	-	600
L-cistina	3	3
Óleo de soja	70	70
Mistura de sais (AIN-93GMX) ¹	35	35
Mistura de vitaminas (AIN-93GVX) ¹	10	10
Fibra	50	50
Cloridrato de colina	2,5	2,5

1. De acordo com American Institute of Nutrition (REEVES et al., 1993).

2. Valores corrigidos em função do conteúdo de proteína na caseína.

Delineamento experimental

Ao atingirem a idade de 90 dias, os animais foram divididos, de forma aleatória, em dois grupos e submetidos ao tratamento dietético C ou F durante 10 semanas. Na sexta semana de tratamento, os grupos foram novamente subdivididos para constituir os grupos de animais treinados: controle treinado (CT) e frutose treinado (FT), sem alterações na dieta.

O exercício físico consistiu em uma hora de nado em água aquecida a 31 ± 1 °C com sobrecargas de chumbo atadas ao tórax, cinco dias por semana, durante quatro semanas. As sobrecargas corresponderam a 80% da máxima fase estável de lactato determinada segundo protocolo de Gobatto *et al.* (2001).

Teste de Tolerância à Glicose- GTT

Ao final das 10 semanas de tratamento os animais foram submetidos a um teste de tolerância à glicose, após um período de jejum de 12 horas. A glicose, em concentração de 2.0g.kg^{-1} de peso, foi administrada via oral com auxílio de uma sonda oro-gástrica. Amostras de sangue foram coletadas (25 µl), através de um corte na extremidade da cauda, antes da administração e nos tempos 30, 60 e 120 minutos. As amostras foram desproteinizadas em 200 µl de TCA 4% e a determinação da glicose foi feita pelo método de glicose-oxidase através de *kit* comercial (Laborlab). A resposta glicêmica durante o GTT foi

avaliada pela área sob a curva da glicose, calculada através de método trapezoidal (MATHEWS *et al.* 1990).

Teste de Tolerância à Insulina-ITT

Com a finalidade de avaliar a sensibilidade à insulina, ao final do experimento, os animais foram submetidos a um teste de tolerância à insulina. A injeção de insulina regular foi administrada na cavidade intraperitoneal na concentração de 1.5 UI. kg⁻¹ de peso. Amostras de sangue foram coletadas (25 µl), através de um corte na extremidade da cauda, imediatamente antes da administração e nos tempos 4, 8, 12 e 16 minutos. As amostras foram desproteinizadas em 200 µl de TCA 4% e a determinação da glicose foi feita pelo método de glicose-oxidase através de *kit* comercial (Laborlab). A constante para o desaparecimento da glicose sanguínea (Kitt) foi calculada através da fórmula $0.693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose sanguínea foi calculado a partir da inclinação da reta de regressão dos valores da concentração de glicose em logaritmo natural na fase de decaimento linear (BONORA *et al.*, 1989).

Bioquímica do sangue

Após anestesia em CO₂ os animais foram mortos por decapitação e o sangue do tronco foi coletado para determinação das concentrações séricas de glicose, triglicerídeos, colesterol total, HDL – colesterol, LDL – colesterol, através de colorimetria (NOGUEIRA *et al.*, 1990) utilizando *kits* comerciais (Laborlab). A excisão e pesagem do depósito de gordura epididimal foi realizada de acordo com o protocolo de Cinti (2005). A concentração hepática e muscular de triglicerídeos também foi avaliada (NOGUEIRA *et al.*, 1990).

Extração de tecido e imunoblotting

Frações do fígado e do gastrocnêmio foram homogeneizadas em 1 mL de tampão de lise contendo 1% de Triton X100, 100 mM de Tris (pH 7.4), 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA, 100 mM de ortovanadato de sódio, 2 mM de PMSF e 0.1 µg/mL de aprotinina, utilizando-se para isso um homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Foram acrescentados 100 uL de triton X100 a 10% no homogeneizado de cada amostra e mantidos no gelo por mais 40 minutos. Após

esse procedimento as amostras foram centrifugadas a 11000 rpm por 30 minutos. Foi separada uma alíquota do sobrenadante para determinação da concentração de proteína utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). A alíquota restante foi acrescida de tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970) e armazenada a -80°C, para análise posterior através de *Western Blot*.

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e em aparelho de eletroforese BIO-RAD *miniature slab gel apparatus* (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 120 minutos à 120 V em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD (TOWBIN et al., 1979). Para diminuição de ligações inespecíficas as membranas de nitrocelulose (Amersham Corp., Aylesbury, UK) foram pré-incubadas em solução bloqueadora (5% BSA; 10 mM de Tris; 150 mM de NaCl; 0.02% de *Tween* 20) durante duas horas. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos anti-Akt (#2966), anti-pSer473AKT (#4058), anti-AMPK (#2795) e anti- pAMPK (#2537), obtidos da empresa Cell Signaling Technology (Beverly, MA) e diluídos em solução para anticorpo (3% BSA dissolvido em solução basal). Logo após, as membranas foram lavadas por 15 minutos com solução basal (150 mM NaCl, 10 mM Trisma base e 0.02% *Tween* 20) e após duas horas de incubação com o anticorpo secundário conjugado à *horseradish* peroxidase (diluído 1:1000 em 5% de leite desnatado; Invitrogen, Carlsbad, CA). A detecção do complexo antígeno-anticorpo fixo à membrana de nitrocelulose foi obtida por quimioluminescência, utilizando-se *kit* comercial da Amersham segundo orientações do fabricante. Após a revelação das auto-radiografias, as bandas identificadas foram quantificadas através de densitometria ótica (Image J, NIH)

Análise estatística

Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão e foram analisados, estatisticamente, através de teste t-student ou pela Análise de Variância *two-way* (ANOVA), onde apropriado. A normalidade e homogeneidade de variância foram analisadas pelos testes de Shapiro Wilks e Bartlett, respectivamente. Quando necessário foi utilizado teste *pos hoc* de bonferroni. Em todas as análises, o nível de significância foi pré-estabelecido em $p < 0.05$.

Resultados

Anova revelou que, independente do tipo de dieta, os grupos treinados apresentaram massa corporal final cerca de 10% menor que os grupos sedentários. A figura 1 ilustra a evolução da massa corporal ao longo de todo o experimento.

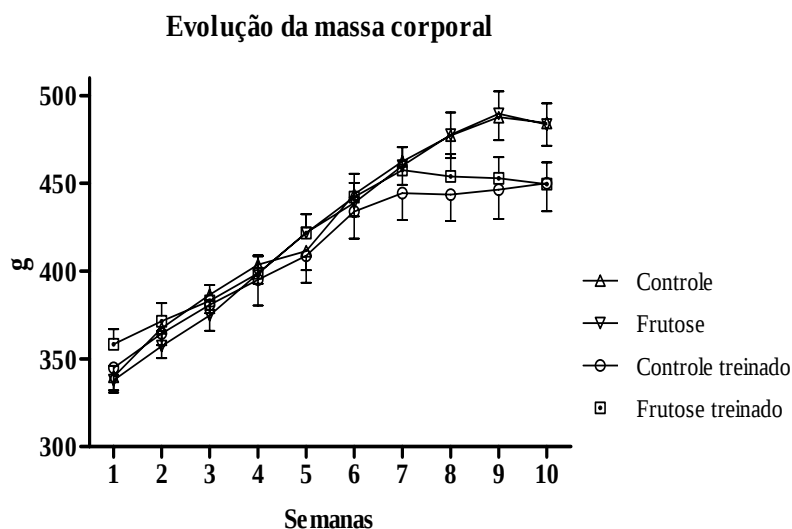


Figura 1. Evolução da massa corporal ao longo do experimento.

A tabela 2 apresenta os valores das áreas sob a curva de ingestão alimentar e GTT, índice K_{ITT} , triglicerídeos no fígado e gastrocnêmio e massa da gordura epididimal. A área sob a curva de ingestão alimentar, no período, foi aproximadamente 10% menor para os grupos alimentados com dieta rica em frutose e não houve interação com o exercício. A área sob a curva durante o GTT apresentou menores valores para os grupos treinados, independente da dieta. O K_{ITT} apresentou diminuição relacionada à dieta de frutose, mas aumento relacionado ao exercício, porém não houve interação entre os fatores. As concentrações de triglicerídeos no fígado e gastrocnêmio não apresentaram diferença entre os grupos. A massa de gordura epididimal foi cerca de 50% menor nos grupos treinados e não houve interação com a dieta.

Tabela 2. Efeitos metabólicos de quatro semanas de exercício em ratos alimentados com dieta rica em frutose ou balanceada.

PARAMETRO	Sedentário		Exercício	
	Controle	Frutose	Controle	Frutose
ASC – Ingestão alimentar (g*12 semanas)	251.3 ± 5.5	219.7 ± 5.3 ^a	227.0 ± 8.3	209.7 ± 8.9 ^a
ASC – glicemia no GTT (mM.120min)	843.9 ± 19.1	863.5 ± 26.0	760.9 ± 16.5 ^b	799.1 ± 19.4 ^b
K _{ITT} (%.min ⁻¹)	3.2 ± 0.4	1.7 ± 0.2 ^a	3.8 ± 0.4 ^b	3.0 ± 0.4 ^{a,b}
Triglicerídeos no Fígado (mg/g)	11.8 ± 0.89	12.7 ± 0.49	12.3 ± 0.71	14.3 ± 0.72
Triglicerídeos no gastrocnêmio (mg/g)	3.0 ± 0.48	2.3 ± 0.29	3.0 ± 0.62	2.78 ± 0.37
Gordura epididimal (mg/100g)	924.7 ± 73	1113 ± 125	600.5 ± 64 ^b	632.7 ± 59 ^b

ASC: Área sob a curva, GTT: Teste de tolerância à glicose, K_{ITT}: Constante de decaimento da glicose em teste de tolerância à insulina. ^a diferente dos grupos controle; ^b diferente dos grupos sedentários; p<0,05.

A tabela 3 demonstra os valores séricos de glicose, insulina, AGL, triglicerídeos, colesterol total, LDL- e HDL-colesterol. As concentrações de glicose e insulina séricas não foram diferentes entre os grupos. Os grupos exercitados apresentaram diferença nas concentrações séricas de AGL em relação aos sedentários, houve interação entre a dieta e exercício e o grupo frutose sedentário apresentou valores cerca de 2 vezes maior. Entretanto, o grupo frutose exercitado não apresentou diferença em relação aos controles. Os triglicerídeos séricos dos grupos frutose apresentaram valores cerca de 40% maiores em relação aos controles, o exercício físico não foi capaz de promover melhoras nesse parâmetro. As concentrações de colesterol total, LDL- e HDL-colesterol foram maiores nos grupos que receberam frutose, não houve interação com o exercício.

Tabela 3. Efeitos de quatro semanas de exercício nos parâmetros séricos em ratos alimentados com dieta rica em frutose ou balanceada.

PARAMETRO	Sedentario		Exercicio	
	Controle	Frutose	Controle	Frutose
Glicose sérica (mmol/L)	5.8 ± 0.29	6.0 ± 0.17	5.5 ± 0.24	5.6 ± 0.24
Insulina sérica (μU/mL)	15.4 ± 2.3	14.1 ± 1.5	9.4 ± 1.4	13.2 ± 1.7
AGL (mg/L)	88.9 ± 10.2	230 ± 27.7 ^b	91.4 ± 7.8	70.7 ± 6.6
Triglicerídeo sérico (mmol/L)	1.3 ± 0.18	2.4 ± 0.33 ^a	1.5 ± 0.13	2.3 ± 0.32 ^a
Colesterol Total sérico (mmol/L)	2.99 ± 0.09	3.46 ± 0.07 ^a	2.97 ± 0.11	3.45 ± 0.10 ^a
HDL- C sérico (mmol/L)	0.98 ± 0.07	1.2 ± 0.07 ^a	0.92 ± 0.04	1.1 ± 0.06 ^a
LDL-C sérico (mmol/L)	1.3 ± 0.10	1.6 ± 0.04 ^a	1.3 ± 0.09	1.7 ± 0.07 ^a

AGL: Ácidos Graxos Livres. ^a diferente dos grupos controle; ^b diferente de todos os grupos p<0,05.

A expressão proteica da Akt e AMPK totais e fosforiladas no fígado e no músculo são apresentadas nas figuras 2 e 3. No fígado não foram observados aumento na AMPK e Akt totais ou na p-Akt, porém foi observado aumento na p-AMPK relacionada ao exercício sem interação com a dieta.

No músculo gastrocnêmio não foram observadas diferenças significativas em nenhuma das proteínas analisadas, embora a p-AMPK tenha apresentado uma tendência a ser aumentada pela dieta de frutose (p=0.06)

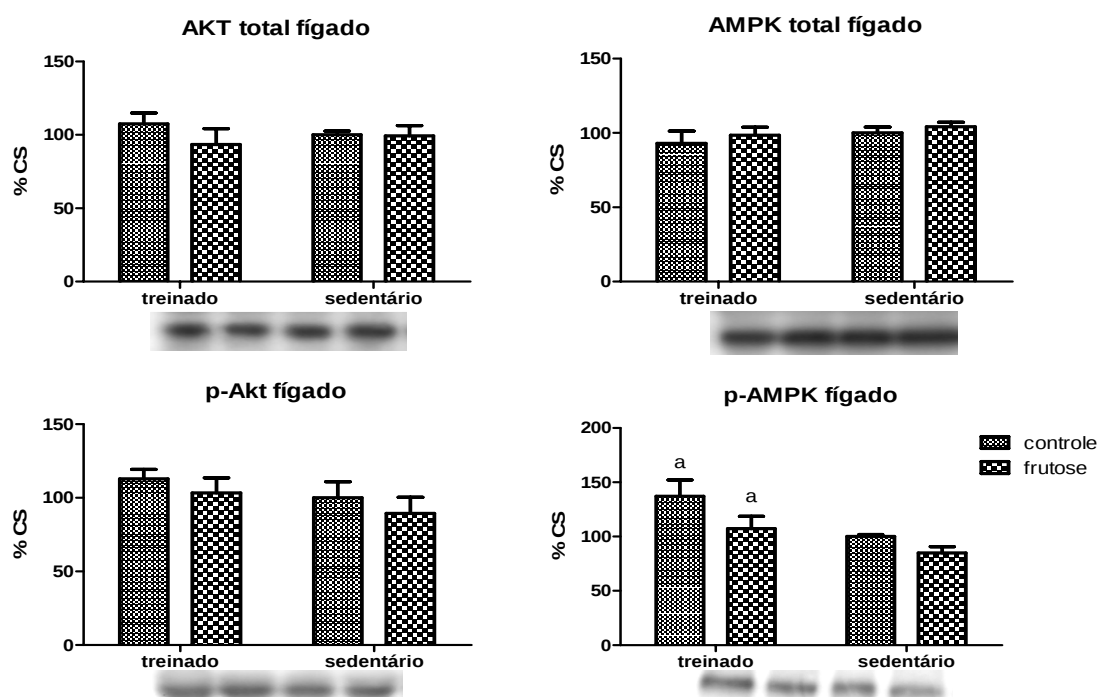


Figura 2. Expressão proteica da Akt e AMPK totais e fosforiladas no fígado. ^a diferente do grupo sedentário (p<0.05). CS: Controle sedentário.

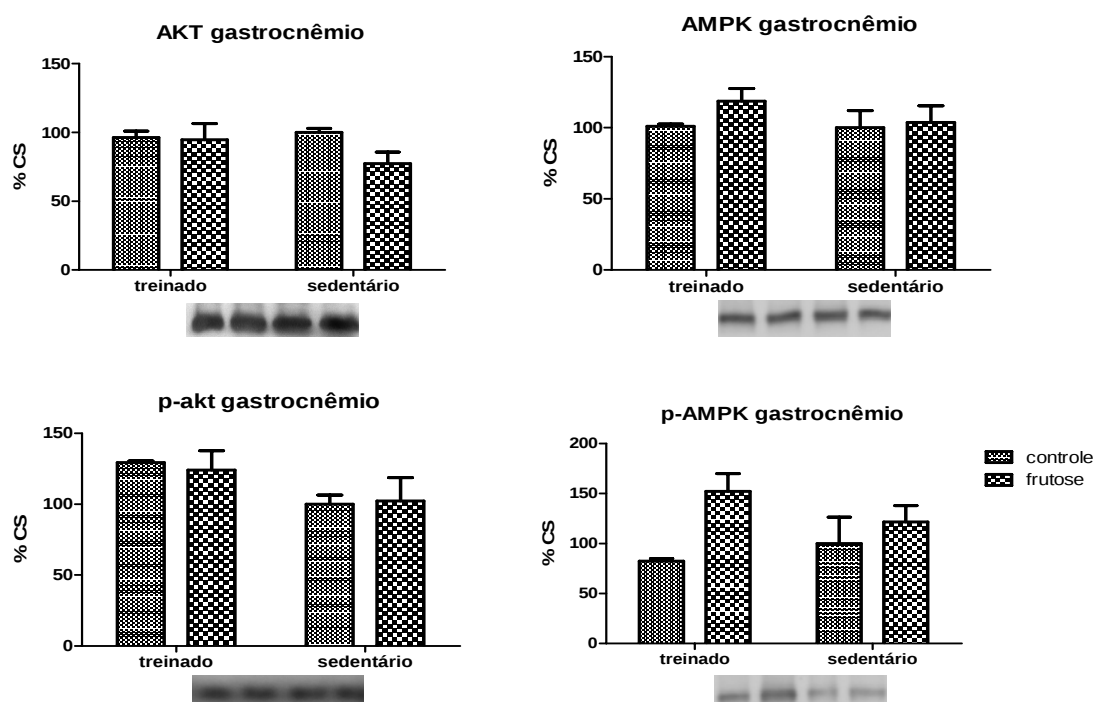


Figura 3. Expressão proteica da Akt e AMPK totais e fosforiladas no músculo gastrocnêmio. CS: Controle sedentário.

Discussão

Os valores mais baixos de ingestão alimentar de frutose indicam uma maior eficiência desse nutriente, uma vez que não houve diferenças na massa corporal relacionadas à dieta. Este resultado não corrobora a teoria de que a frutose pode levar a alterações no mecanismo central de controle da fome, de forma a gerar inibição da saciedade. Em estudo com injeção intracerebroventricular de frutose, foi demonstrado uma diminuição no sinalizador anoréxico malonyl-CoA e consequente aumento na fome (CHA et al., 2008). Porém, a capacidade da frutose ultrapassar a barreira hemato-encefálica ainda não foi comprovada.

Apesar de não ter sido evidenciada intolerância à glicose nos grupos alimentados com frutose, pode-se observar, através da menor área sob a curva do GTT que o exercício físico foi eficaz em promover melhoras nesse parâmetro. Adicionalmente, a resistência à ação da insulina observada nos animais alimentados com frutose foi atenuada com o treinamento físico. Esses achados corroboram os relatos, de outros autores, pertinentes à melhora no metabolismo da glicose mediado pela atividade física em ratos (BONEN, 2009) e humanos (HOLLOSZY et al., 1986).

A resistência à insulina, induzida por dieta rica em frutose, promove inibição da fosforilação da Akt mediante estimulação à insulina (BEZERRA et al., 2000). A fosforilação da Akt (p-Akt) mediada pelo exercício é bem documentada na literatura, estando associada à melhora na captação de glicose nos tecidos periféricos (SAKAMOTO et al., 2003). Porém, o efeito da fosforilação da Akt implica em uma regulação a curto prazo da captação de glicose e desse modo, o tempo entre a última sessão de exercício e a extração do tecido sem estímulo exógeno de insulina não permitiram evidenciar a forma fosforilada da Akt. Homens e mulheres sedentários submetidos a 10 semanas de treinamento resistido, 3 vezes por semana, também não apresentaram aumento na p-Akt, 4 a 5 dias após a última sessão de exercício, porém evidenciou-se aumento na expressão proteica da Akt total (GOODMAN et al., 2007). Esse aumento indica uma adaptação ao treinamento que permitiria um maior número de moléculas disponíveis para serem ativadas mediante estímulo. A Akt total permaneceu inalterada no presente estudo e pode estar relacionada a diferenças do tipo de treinamento aeróbio versus resistido, ou mesmo por conta de respostas espécie-dependentes.

O aumento nos triglicerídeos séricos, LDL-C e AGL, considerados efeitos clássicos da dieta de frutose no perfil lipídico, foram reproduzidos no presente estudo. Entretanto, o

exercício físico foi capaz de promover alterações apenas nos AGL e a melhora na resistência à insulina pode estar relacionada a esse fator. Concentrações elevadas de AGL foram associadas com resistência à insulina em indivíduos saudáveis (MCGARRY, 2002, BODEN e JADALI, 1991). Foi demonstrado que durante infusão de lipídeos em indivíduos saudáveis, submetidos a clamp euglicêmico/hiperinsulinêmico, os AGL promoveram diminuição no transporte e níveis mais baixos de oxidação da glicose e síntese de glicogênio (RODEN et al, 1996). Ratos submetidos a dieta hiperlipídica também apresentaram transporte de glicose prejudicado com menor expressão de GLUT4 (KAHN e PEDERSEN, 1993). A diminuição de AGL sérico encontrada no presente estudo pode estar relacionada com a maior ativação da AMPK, observada no fígado dos animais treinados. A fosforilação/ativação da AMPK promove fosforilação/inibição da Acetil-CoA carboxilase (ACC) com consequente diminuição de malonil-CoA. O malonil-CoA é um importante substrato da ácido graxo sintetase para a síntese do ácido palmítico. Na membrana celular atua como inibidor da carnitina palmitoiltransferase (CPT1) diminuindo a oxidação de ácidos graxos (ABU-ELHEIGA et al., 2000). A ativação da AMPK pode ocorrer na musculatura esquelética através da contração durante exercício, e também por diminuição dos níveis de glicogênio, sendo este último o principal sinalizador no fígado (STEINBERG e KEMP, 2009). Embora os níveis de glicogênio hepáticos não tenham sido medidos no presente estudo, relatou-se que ratos alimentados com dieta composta por 20% de frutose apresentam concentrações de glicogênio hepáticas e musculares aumentadas e, em conjunto com o exercício, chegam a até 3 vezes mais comparado ao controle (MURAKAMI, 1997). O fato da dieta de frutose não apresentar efeito na ativação da AMPK é concordante com a inferência de estoques adequados de glicogênio. Desse modo, a ativação da AMPK no fígado pode ser considerada um efeito do treinamento físico. O tempo de 60 horas, entre a última sessão de exercício e a morte dos animais, não permitiu evidenciar aumento na fosforilação da AMPK no músculo. Foi relatado que decorridas oito horas do fim de uma sessão aguda de exercício a ativação da AMPK no músculo e no fígado levaram a uma diminuição da glicemia em jejum de ratos diabéticos (PADUA et al., 2009). Infere-se que a fosforilação da AMPK no fígado parece apresentar um tempo mais longo de ativação. A fosforilação da AMPK promove redução na atividade da enzima chave na síntese de colesterol 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase) e de síntese de ácidos graxos ACC (VIOLETTE et al., 2009). Porém, o efeito redutor da AMPK nas concentrações de AGL não foi observado no colesterol total. Uma

possível explicação seria uma maior preferência da via em oxidar o AGL ao invés de inibir a síntese. Isso seria possível através de maior fosforilação/inibição da isoforma β da ACC, localizada na membrana mitocondrial externa e responsável pela regulação da concentração de malonil-CoA intramitocondrial (ABU-ELHEIGA et al., 2000). Entretanto, não foram observadas diminuição nas concentrações de triglicerídeos no fígado e no músculo, de forma que nessas condições poderia haver uma preferência para a captação do AGL circulante, através da translocação do transportador de gorduras FAT/CD36 (STEINBERG e KEMP, 2009) ao invés da oxidação do substrato armazenado.

O fígado possui as duas isoformas, α e β da ACC, mas o músculo esquelético possui apenas a isoforma β , relacionada ao controle da oxidação de ácidos graxos na mitocondria. Assim, embora não tenha sido possível evidenciar a fosforilação da AMPK no músculo, devido ao tempo decorrido desde a última sessão, é coerente assumir que durante o exercício a oxidação dos ácidos graxos na célula muscular desempenha um importante papel na redução sérica de AGL. A intensidade do exercício é fator limitante para a oxidação de ácidos graxos em qualquer atividade física, altas intensidades promovem maior utilização de glicose em detrimento aos ácidos graxos (VAN LOON et al., 2001). O exercício realizado pelos animais do presente estudo foi realizado a 80% da MFEL, intensidade que pode privilegiar a oxidação dos ácidos graxos na geração de energia. Nessas condições, a abundância de AGL no sangue favorece sua utilização como substrato energético (CURI et al., 2003). Dessa forma, a AMPK ativada pelo exercício pode atuar na melhora da resistência à insulina aumentando a captação de glicose, via aumento na translocação dos transportadores de glicose agudamente (VIOLLET et al., 2009), mas também via diminuição da síntese de lipídeos e aumento na oxidação de ácidos graxos séricos no hepatócito, mesmo após um período de 60 horas após a última sessão de exercício.

Conclui-se que a melhora na sensibilidade à insulina através do treinamento físico, em ratos alimentados com dieta rica em frutose, pode estar associada ao aumento na fosforilação da AMPK hepática e consequente diminuição dos AGL circulantes.

Referências

ABU-ELHEIGA, L. et al. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v.97, p. 1444-1449, 2000.

ALBERTI, K.G., ZIMMET, P.Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. II:diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabet Med**, v.15, p.539-53, 1998.

ANDERSEN, R. E., et al. Effects of lifestyle activity vs. structured aerobic exercise in obese women: a randomized trial. **JAMA**, v. 281, p. 335-340, 1999.

ARMSTRONG, J. L. Regulation of glycogen synthesis by amino acids in cultured human cells. **JBC**, v. 276, n. 2, p. 952-956, Jan, 2001.

BALKAU, B.; CHARLES, M.A. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). **Diabet Med**, v.16, p.442-43, 1999.

BEZERRA, R. M. N., et al. A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver rats. **J Nutr**, v. 130, p. 1531-1535, 2000.

BEZERRA, R.M.N, et al. A high-fructose diet induces insulin resistance but not blood pressure changes in normotensive rats. **Braz J Med Biol Res**, v.34, p.1155-60, 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BODEN, G.; JADALI, F. Effects of lipid on basal carbohydrate metabolism in normal men. **Diabetes**, v.40, p.686 – 692, 1991.

BONEN A. PGC-1 α -induced improvements in skeletal muscle metabolism and insulin sensitivity 1. **Appl. Physiol. Nutr. Metab** v.34, p.307–314, 2009.

BONORA, E. et al. Estimates of *in vivo* insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J Clin Endocrinol Metabol**, v. 68, n. 2, p. 374-378, 1989.

CHA, S. H. et al. Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl-CoA and food intake. **PNAS**, v. 105, n. 44, p. 16871-16875, Nov, 2008.

CHAN, T.O.; RITTENHOUSE, S.E.; TSICHLIS, P.N. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. **Annu Rev Biochem**, v.68, p.965-1014, 1999.

CHEN Z., et al. Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. **Diabetes**, v. 52, p. 2205-2212, 2003.

- CINTI S. The adipose organ. **Prost, Leuk Essent Fatty Acids**, v.73, p.9–15, 2005.
- CURI, R. et al. Ciclo de Krebs Como Fator Limitante na Utilização de Ácidos Graxos Durante o Exercício Aeróbico. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.47, p.135-143, 2003
- ELLIOT, S.S. et al. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. **Am J Clin Nutr**, v.76, p.911-22, 2002.
- GOBATTO, C.A. et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Bioch Phys**, part A, v.130, p.21-27, 2001.
- GOODMAN, C.A. et al. Resistance training increases total AKT, but decreases basal AS160 phosphorylation in individuals with clusters of metabolic risk factors. **Proceedings of the Australian Physiological Society**, Australia, v.38, p.118, 2007. Disponível em: <http://www.apps.org.au/Proceedings/38/118P>. Acesso em: 15 set. 2010.
- HALLFRISCH, J. Metabolic effects of dietary fructose. **FASEB J**, v.4, p.2652-60, 1990.
- HWANG, I.S. et al. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. **Hypertension**, v.10, p.512-6, 1987.
- HOLLOSZY, J.O. et al. Effects of exercise on glucose tolerance and insulin resistance. **Acta Med Scand**, v.711(Suppl), p.55-65, 1986.
- KAHN, B.B.; PEDERSEN, O. Suppression of GLUT4 expression in skeletal muscle of rats that are obese from high fat feeding but not from high carbohydrate feeding or genetic obesity. **Endocrinology**, v. 132, n.1, p. 13-22, Jan. 1993.
- KATAKAM, P.V. et al. Endothelial dysfunction precedes hypertension in diet-induced insulin resistance. **Am J Physiol** 275, 788 – 792, 1998.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227, 680-5, 1970.
- MATHEWS, J.N.S. et al. Analysis of serial measurements in medical research. **Br. Med. J.** v. 27, p. 230-5, 1990.
- MCGARRY, J. Banting lecture 2001: Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. **Diabetes**, v.51, p.7–18, 2002.
- MURAKAMI, T et al. Enlargement of glycogen store in rat liver and muscle by fructose-diet intake and exercise training. **J Appl Physiol**, v.82, n.3, p.772-775, Mar. 1997.
- NOGUEIRA, D.M. et al. **Métodos de Bioquímica Clínica. Técnica e Interpretação**. São Paulo: Pancast, p.468; 1990.
- PADUA, M. F. et al. Exercício físico reduz a hiperglicemia de jejum em camundongos diabéticos através da ativação da AMPK. **Rev Bras Med Esporte**, v. 15, n. 3, 2009.

PERSGHINET, G. et al. Increased glucose transport-phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulin-resistant subjects. **N Engl J Med**, v.335, p.1357-62, 1996.

RODEN et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. **J Clin Invest**, v.97, n.12, p.2859–2865, 1996.

SAKAMOTO, K. et al. AKT signaling in skeletal muscle: regulation by exercise and passive stretch. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.285, p.E1081-E1088, 2003.

SALTIEL, R.; KAHN, C. R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, p.799-806, 2001.

SHARABI, Y. et al. Effect of PPAR-gamma agonist on adiponectin levels in the metabolic syndrome: lessons from the high fructose fed rat model. **Am J Hypertens**, v.20, p.206-10, 2007.

STEINBERG, G. R.; KEMP, B. E. AMPK in health and disease. **Physiol Rev**, v. 89, p. 1025-1078, 2009.

TOWBIN, H., STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, 4350-4, 1979.

VAN LOON, L. J. et al. The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilization in humans. **J Physiol**, v. 536, p. 295-304, 2001.

VIOLLET, B. et al. Targeting the AMPK pathway for the treatment of type 2 diabetes. **Front Biosci**, v. 14, p. 3380-3400, Jan, 2009.

DISCUSSÃO GERAL

A Síndrome Metabólica é classificada como um espectro de distúrbios que incluem resistência à insulina, intolerância à glicose, hipertrigliceridemia, baixas concentrações da fração HDL do colesterol (KELLEY *et al.*, 2004; ROGLANS *et al.* 2007). Essa doença é classificada como um fator de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (GRUNDY *et al.*, 2005). Alguns estudos demonstraram que a ingestão de altas quantidade de frutose induziam sinais da doença em roedores (SHARABI *et al.*, 2007; HWANG *et al.*, 1987). Assim, o presente estudo buscou investigar a viabilidade do uso de dietas rica em frutose para mimetizar características importantes da doença e os efeitos do exercício físico sobre elas.

O primeiro estudo foi delineado para verificar o efeito de diferentes protocolos de administração da dieta, em ratos jovens ou adultos. Ratos adultos que ingeriram frutose na água de beber a 10%, durante oito semanas, não apresentaram alterações metabólicas significativas. Em contrapartida, ratos adultos submetidos à dieta rica em frutose (60%) apresentaram intolerância à glicose, resistência à insulina, hipertrigliceridemia, aumento nos lipídeos totais do fígado e na massa total dos depósitos de gordura. Porém, quando ratos jovens foram submetidos a oito semanas da mesma dieta os efeitos foram bastante reduzidos. Uma questão interessante é a maior sensibilidade apresentada pelos ratos adultos (90 dias) com dieta de 60%. Parece haver algum mecanismo de proteção ou compensatório em ratos jovens que não permite o surgimento dos distúrbios. Os transportadores de frutose GLUT5 no intestino ganham competência após o desmame e são altamente regulados pela disponibilidade de frutose. Antes desse período a ingestão de frutose pode levar a sintomas de intolerância à frutose (DOUARD e FERRARIS, 2009). É possível especular que, juntamente com o amadurecimento de um sistema para a regulação de um determinado substrato exista, em algum passo da via molecular, um sistema contra-regulatório preventivo para permitir um ajuste refinado. Porém, esse sistema poderia apresentar uma involução com o avançar da idade. Curiosamente, nos ratos jovens de todos os experimentos a ingestão de alimento não diferiu entre os dois tipos de ração, mas nos ratos adultos do último experimento a ingestão de frutose foi menor, em contraposição à dislipidemia e hipertrigliceridemia instalada. Essa menor ingestão de alimento contraria o postulado de que dietas ricas em frutose poderiam suprimir o estímulo de saciedade no hipotálamo, levando à aumento da fome e ingestão alimentar (CHA *et al.*, 2008). Por outro

lado, essa ingestão diminuída poderia também estar associada à uma tentativa do organismo em compensar os distúrbios lipídicos. Porém, mais estudos são necessários para investigar esse tema, uma vez que outras linhagens não parecem apresentar o mesmo comportamento. Esses resultados parecem ser peculiares aos ratos Wistar, pois ratos Sprague-Dawley demonstram grande sensibilidade à frutose e foram relatados distúrbios em ratos jovens ou adultos e com diferentes tempos de exposição ao tratamento dietético (LEE *et al.*, 2006; ORON-HERMAN *et al.*, 2005; SHARABI *et al.*, 2007).

Nos estudos que buscaram investigar os efeitos agudos e crônicos do exercício de natação em ratos jovens, não foram observadas diferenças na capacidade aeróbia dos animais. Em estudo com 17 homens comparou-se os efeitos da ingestão de glicose, frutose ou placebo, antes e durante teste exaustivo em cicloergômetro, a 75% do VO_{2max} . Os autores reportaram tempos até a exaustão, lactacidemia e AGL plasmático similares entre os grupos que ingeriram frutose ou glicose, em conjunto com um melhor desempenho destes em comparação ao grupo placebo (BRUNDLE *et al.*, 2000). Assim, a ingestão de frutose não parece provocar alterações críticas para o desempenho.

No presente trabalho, a indução de hipertrigliceridemia foi o efeito mais reprodutivo nos estudos que utilizaram a dieta de frutose. Porém, o exercício físico agudo ou crônico não foi capaz de alterar esse parâmetro. Reduções nos níveis de triglicerídeos induzidas pelo exercício de forma aguda ou crônica estão associadas a aumento na atividade da enzima Lipase lipoproteica no músculo e diminuição da produção e secreção da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) no fígado (PLAISANCE *et al.*, 2009). Zavaroni *et al.* (1982) demonstram que a hipertrigliceridemia observada em ratos Sprague-Dawley, mediante dieta rica em frutose, estava associada à maior produção de VLDL hepático, hiperinsulinemia e resistência à insulina. Os autores também relataram que a hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia foram reduzidas em ratos submetidos a treinamento físico. A diferença das respostas observadas pode estar relacionada à linhagem dos ratos adotados, pois também não foi observado hiperinsulinemia no presente estudo.

As diferenças encontradas no metabolismo muscular de glicose após uma sessão aguda de exercício ou após um período de treinamento, revelaram as alterações metabólicas promovidas pela ingestão de frutose. A menor captação de glicose observada no grupo frutose sedentário do estudo agudo, foi restaurada após uma única sessão de exercício. Porém, no estudo crônico não se observou menor captação de glicose para o grupo frutose sedentário, mas também não se observou aumento na captação de glicose do

grupo treinado, a exemplo do grupo controle. A oxidação de glicose foi maior no grupo frutose sedentário do estudo agudo, comparado a seu par controle e não houve alteração com o exercício, mas no estudo crônico não se observou tal diferença nos controles. É importante ressaltar que no estudo agudo os animais permaneceram sob o tratamento dietético durante oito semanas, enquanto no estudo crônico o tratamento foi prolongado por mais quatro semanas. Isso demonstra que alguns efeitos da frutose no metabolismo muscular podem ser transitórios e/ou promovem respostas adaptativas. O aumento na síntese de glicogênio duas vezes maior no grupo frutose treinado, logo após uma sessão de exercício, foi o efeito mais importante observado no protocolo agudo. Já no protocolo crônico a menor produção de lactato em repouso, observada nos ratos frutose treinado permitem um menor gasto energético para manter o equilíbrio ácido-básico intracelular (ARONSON, 1983).

No estudo com animais adultos o desenho experimental foi desenvolvido para intervir com a atividade física após um período suficiente de ingestão de frutose, capaz de promover alterações inerentes à Síndrome Metabólica. Como foi observado em estudo anterior que quatro semanas de ingestão eram suficientes para promover os distúrbios, adotou-se como margem de segurança um período de seis semanas antes do início do exercício. Os resultados mais relevante nesse estudo foram a diminuição da resistência à insulina, a menor concentração sérica de AGL no grupo frutose treinado e o maior nível de expressão proteica basal da p-AMPK no fígado dos animais treinados. Os menores níveis de AGL observados podem estar relacionados com a melhor sensibilidade à insulina após o treinamento (RODEN et al., 1996). O exercício físico também aumenta a expressão da PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator α) fator de transcrição responsável pela regulação de vários genes associados à oxidação de gorduras e está relacionado à melhora na sensibilidade à insulina em ratos Zucker obesos (BONEN, 2009). Foi demonstrado que a AMPK é um dos fatores responsáveis pela ativação da PGC-1 α (LEE et al., 2006; JAGER et al. 2007), sendo provável que a diminuição nos AGL séricos e melhora na resistência à insulina tenha sido influenciada por esse mecanismo.

Embora a expressão proteica da Akt e p-Akt basal também tenham sido estudadas não foram encontradas diferenças. Contrariamente a esse resultado, Liu et al. (2009) propuseram que a expressão da p-Akt no estado basal, ou seja, sem estimulação exógena de insulina, estaria aumentada em ratos resistentes à insulina provocada por dieta rica em gordura saturada. Os autores também associaram o aumento na expressão da p-Akt ao

acúmulo de gordura no fígado e no músculo, estresse oxidativo e supressão de produção mitocondrial. Porém, esse aumento na expressão da p-Akt pode estar associado à hiperinsulinemia observada nos animais, característica não observada no presente estudo.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a dieta rica em frutose é capaz de induzir características inerentes à Síndrome Metabólica em ratos Wistar. Porém, os resultados são mais pronunciados quando a dieta é administrada em animais adultos;

A capacidade aeróbia, inferida pela máxima fase estável de lactato, dos animais submetidos à dieta de frutose não é prejudicada;

Uma sessão aguda de exercício, em ratos jovens alimentados com dieta de frutose, é capaz de promover melhoras na captação de glicose e aumento na síntese muscular de glicogênio;

Em ratos jovens alimentados com frutose e submetidos a exercício crônico há diminuição da taxa de produção de lactato em repouso, sem alteração na captação de glicose;

Ratos adultos alimentados com frutose e submetidos ao treinamento apresentam melhora na sensibilidade à insulina e menores concentrações séricas de AGL, provavelmente associadas ao aumento na fosforilação da AMPK hepática.

REFERÊNCIAS

- AIJAZ, B. et al. Exercise as a treatment for the risk of cardiovascular disease. **Curr Treat Options Cardiovasc Med**, v. 12, n. 4, p. 329-341, Aug, 2010
- AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. ACSM stand position on the appropriate intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. **Med Sci Sports Exerc**, v.33, p.2145-56, 2001.
- ALBERTI, K.G., ZIMMET, P.Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. II:diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabet Med**, v.15, p.539-53, 1998.
- ANDERSEN, R. E., et al. Effects of lifestyle activity vs. structured aerobic exercise in obese women: a randomized trial. **JAMA**, v. 281, p. 335-340, 1999.
- ARONSON, P. Mechanisms of active H⁺ secretion in the proximal tubule. **Am. J Physiol**, v.245, p.F647-F659, 1983.
- BALKAU, B.; CHARLES, M.A. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). **Diabet Med**, v.16, p.442-43, 1999.
- BONEN et al. Persistence of glucose metabolism after exercise in trained and untrained soleus muscle. **Diabetes Care**, v.15, p. 1694-1700, Nov. 1992.
- BONEN A. PGC-1 α -induced improvements in skeletal muscle metabolism and insulin sensitivity 1. **Appl. Physiol. Nutr. Metab** v.34, p.307–314, 2009.
- BONORA, E. et al. Estimates of *in vivo* insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J Clin Endocrinol Metabol**, v. 68, n. 2, p. 374-378, 1989.
- BRUNDLE, S. ; THAYER, R. ; TAYLOR, A. W. Comparison of fructose and glucose ingestion before and during endurance cycling to exhaustion. **J Sports Med Phys Fitness**, v. 40, n. 4, p. 343-349, 2000.
- CAMHI, S.M. et al. Metabolic syndrome and changes in body fat from a low-fat diet and/or exercise randomized controlled trial. **Obesity** (Silver Spring), v.18, n.3, p.548-554, Mar. 2010.
- CARRIER, J. Review: Exercise plus diet prevents type 2 diabetes. **Evid Based Nurs**, v. 12, n. 1, Jan. 2009.
- CHA, S. H. et al. Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl-CoA and food intake. **PNAS**, v. 105, n. 44, p. 16871-16875, Nov, 2008.
- CINTI S. The adipose organ. **Prost, Leuk Essent Fatty Acids**, v.73, p.9–15, 2005.

COAKLEY, E. H., et al. Predictors of weight change in men: results from the Health Professional Follow-up Study. **Int J. Obes. Relat. Metab. Disord**, v.22, p. 89-96, 1998

CURI, R. et al. Ciclo de Krebs Como Fator Limitante na Utilização de Ácidos Graxos Durante o Exercício Aeróbico. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.47, p.135-143, 2003.

DANTAS, E. M. Effects of chronic treadmill training on body mass gain and visceral fat accumulation in overfed rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 5, p. 515-521, 2010.

DOUARD, V. ; FERRARIS, R. P. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, p. E227-E237, 2008.

ELLIOT, S.S. et al. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. **Am J Clin Nutr**, v.76, p.911-22, 2002.

ENGEL R.C.; JONES J.B. Causes and elimination of erratic blank in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for assay of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. **Anal Bioch**, v.88, p.475-84, 1978.

ERIKSSON, J.; TAIMELA, S.; KOIVISTO, V.A. Exercise and the metabolic syndrome. **Diabetologia**, v.40, p.125-35, 1997.

FLIER J. S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. **Cell**, v. 116, p. 337-350, 2004.

FORD, E. S. et al. Prevalence of the metabolic syndrome among u.s. Adults: Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **JAMA**, v. 287, p. 356-359, 2002.

GALE E.A. The myth of the metabolic syndrome. **Diabetologia**, v. 48, p. 1679-83, 2005.

GOBATTO, C.A. et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Bioch Phys**, part A, v.130, p.21-27, 2001.

GRUNDY, S.M. et al. Diagnosis and Management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. **Circulation**, v.112, p.2735-52, 2005.

GRUNDY, S.M. Does a diagnosis of metabolic syndrome have a value in clinical practice? **J. Clin Nutr**, v.83, p.1248-51, 2006.

HALLFRISCH, J. Metabolic effects of dietary fructose. **FASEB J**, v.4, p.2652-60, 1990.

HASLAM, D. W.; JAMES, W. P. Obesity. **Lancet**, v. 366, n. 9492, p.1197-209, 2005.

HECK, H. et al. Justification for 4.0 Mmol/L Lactate Threshold. **Int. J. Sports Med**, v.6, p.117-30, 1985.

HILL, P. Effect of fructose on rat lipids. **Lipids**, v. 5, n. 7, 1970.

- HOLLOSZY, J.O. et al. Effects of exercise on glucose tolerance and insulin resistance. **Acta Med Scand**, v.711 (Suppl), p.55-65, 1986.
- HOLLOSZY, J.O. et al. Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity. *J. Appl. Physiol*, v.99, p.338-343, 2005.
- HORTON, E.S. Metabolic aspects of exercise and weight reduction. **Med Sci Sports Exerc**, v.18, p.10-8, 1985.
- HWANG, I.S. et al. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. **Hypertension**, v.10, p.512-6, 1987.
- HUNTER, G.R. et al. A role for high intensity exercise on energy balance and weight control. **Int J Obes Rel Metab Dis**, v.6, p.489-493, 1998.
- IRWIN, M. L., et al. Effect of exercise on total and intra-abdominal body fat in postmenopausal women: a randomized controlled trial **JAMA**, v. 289, p. 323-330, 2003.
- JAGER, S., et al. AMP-activated kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 104, p.12017–22, 2007.
- KAPLAN, N.N. The deadly quartet. Upper body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. **Arch Intern Med**, v.149, p. 1514-20, 1989.
- KAHN, R. et al. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. **Diabet Care**, v.28, p.2289-304, 2005.
- KELLEY, G.L.; ALLAN, G.; AZHAR, S. High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation. **Endocrinol**, v.145, p.548-55, 2004.
- KELLY, T., et al. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. **Int J Obes**, v.32, n.9, p.1431-7, 2008.
- KENNEDY J.W. et al. Acute exercise induces GLUT4 translocation in skeletal muscle of normal human subjects and subjects with type 2 diabetes. **Diabetes**, v.48, n.5, p.1192-1197, May. 1999.
- LAAKSONEN, D. E. et al. Low levels of leisure-time Physical Activity and Cardiorespiratory Fitness Predict Development of the Metabolic Syndrome. **Diabetes Care**, v. 25, p. 1612-1618, 2002.
- LAKKA, T. A. et al. Sedentary life style, poor cardiorespiratory fitness, and the metabolic syndrome. **Med Sci Sports Exerc**, v. 35, p.1279-86, 2003.
- LAKKA, T. A. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. **JAMA**, v. 288, n. 21, p. 2709-16, Dec. 2002.

LEE, S. et al. Cardiorrespiratory fitness attenuates metabolic risk independent of abdominal subcutaneous and visceral fat in men. **Diabetes Care**, v. 28, p. 895-901, 2005.

LEE, Y.C. et al. Plasma leptin response to oral glucose tolerance and fasting/re-feeding tests in rats with fructose-induced metabolic derangements. **Life Sci**, v.78, p.1155-62, 2006.

LEMIEUX I. et al. Hypertriglyceridemic waist: a marker of the atherogenic metabolic triad (hyperinsulinemia; hyperapolipoprotein B; small, dense LDL) in men? **Circulation**, v. 102, p. 179-84. 2000.

LIU, H. et al. Increased Basal Level of Akt-Dependent Insulin Signaling May Be Responsible for the Development of Insulin Resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.297, p.E898-E906, Jul. 2009.

MILLER, J.P. et al. Strength training increases insulin action in healthy 50- to 65-yr-old men. **J Appl Physiol**, v.77, p.1122-7, 1994.

NAGAI et al. The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator-1 β in the Pathogenesis of Fructose-Induced Insulin Resistance. **Cell Metabolism**, v.9, n.3, p.252-264, Mar. 2009.

NOGUEIRA, D.M. et al. **Métodos de Bioquímica Clínica. Técnica e Interpretação**. São Paulo: Pancast, p.468; 1990.

ORON-HERMAN M. et al. The effects of S-allylmercaptocaptopril, the synthetic product of allicin and captopril, on cardiovascular risk factors associated with the metabolic syndrome. **Atherosclerosis**, v.183 p.238 - 43, 2005.

PLAISANCE, E.P.; GRANDJEAN, P.W.; MAHURIN, A.J. Independent and Combined Effects of Aerobic Exercise and Pharmacological Strategies on Serum Triglyceride Concentrations: A Qualitative Review. **The Physician and Sports medicine**, v.37, n.1, 2009.

PERSGHINET, G. et al. Increased glucose transport-phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulin-resistant subjects. **N Engl J Med**, v.335, p.1357-62, 1996.

REAVEN, G. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, p. 1595-1607, 1988.

REAVEN G. M. Insulin resistance and insulin secretion are determinants of oral glucose tolerance in normal individuals. **Diabetes**, v. 42, n.9, p. 1324-1332, 1993.

REEVES P.G.; NIELSEN F.H.; FAHEY Jr G.C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **J Nutr**, v.123,p.1939-51, 1993.

RODEN et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. **J Clin Invest**, v.97, n.12, p.2859–2865, 1996.

ROGLANS, R. et al. Impairment of hepatic stat-3 activation and reduction of PPAR_α activity in fructose-fed rats. **Hepatology**, v.45, p.778-88, 2007.

ROPELLE, E. R. et al. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. **J Physiol**, 577.3, p. 997-1007, 2006.

SALTIEL, R.; KAHN, C. R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, p.799-806, 2001.

SARIS, W. H. et al. How much physical activity is enough to prevent unhealthy weight gain? Outcome of the IASO 1st Stock Conference and consensus statement. **Obes. Rev.**, v. 4, p. 101-114, 2003.

SHARABI, Y. et al. Effect of PPAR-gamma agonist on adiponectin levels in the metabolic syndrome: lessons from the high fructose fed rat model. **Am J Hypertens**, v.20, p.206-10, 2007.

SHIEKEN, R.M. Effects of exercise on lipids. **Ann. NY Acad. Sci**, p.269-274, 1991.

SLEDER, J. et al. Hyperinsulinemia in fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. **Metabolism**, v.29, n.4, p.303-305, Apr. 1980.

SLENTZ, C. A. et al. Effects of the amount of exercise on body weight, body composition, and measures of central obesity: STRIDE-a randomized controlled study. **Arch Intern Med** v. 164, p. 31-39, 2004.

THOMPSON, P. D. et al. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Physical Activity, and Metabolism. **Circulation**, v. 107, p. 3109-3116, 2003.

THOMPSON, P. D. et al. The acute versus the chronic response to exercise. **Med Sci Sports Exer**, v. 33, n. 6 (supl.), p. S438-S445 discussão S452-S453, 2001.

TREMBLAY, A. et al. Effect of a three-day interruption of exercise training on resting metabolic rate and glucose-induced thermogenesis in trained individuals. **Int J Obes**, v.12, p.163-81, 1988.

ZAVARONI, I.; CHEN, Y. I.; REAVEN, G. M. Studies of the mechanism of fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. **Metabolism**, v.31, n.11, p.1077-1083, Nov. 1982.

APÊNDICES

- A seguir, nos apêndices I e II encontram-se os trabalhos desenvolvidos durante o período de estágio no exterior, sob supervisão do Dr. Décio Eizirik e orientação da Dra. Miriam Cnop.
- Encontra-se no apêndice III a versão original, do estudo 1, publicada em inglês.

APÊNDICE I

Ubiquitin fold modifier 1 (UFM1) and its target UFBP1 are involved in ER-stress induced beta cell apoptosis

Katleen Lemaire^{1,*}, Rodrigo F. Moura^{2,*}, Mikaela Granvik¹, Mariana Igoillo-Esteve^{2,5}, Hans E. Hohmeier³, Nico Hendrickx¹, Christopher B. Newgard³, Etienne Waelkens⁴, Miriam Cnop^{2,5} and Frans Schuit¹

¹ Gene Expression Unit, Dept. Molecular Cell Biology, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium. ² Laboratory of Experimental Medicine, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium ³ Sarah W. Stedman Nutrition and Metabolism Center and Departments of Pharmacology and Cancer Biology and Medicine, Duke University Medical Center, Durham, NC, USA. ⁴ Prometa, Dept. Molecular Cell Biology, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium. ⁵ Division of Endocrinology, Erasmus Hospital, Brussels, Belgium.

* These authors contributed equally to this work

Running title: Role of UFBP1 and UFM1 in ERAD

Address for correspondence: Herestraat 49, mailbox 901, phone +32-16-330257, fax +32-16-345995, e-mail: frans.schuit@med.kuleuven.be; katleen.lemaire@med.kuleuven.be

Abbreviations: BiP, binding protein; CHX, cycloheximide; CPA, cyclopiazonic acid; eIF2 α , eukaryotic initiation factor 2 α ; ER, endoplasmic reticulum; ERAD, ER associated protein degradation; MKR mouse, transgenic mouse with a dominant-negative insulin-like growth factor I receptor; PC, pyruvate carboxylase; PCI, proteasome COP9 eIF3 subunits; T2D, type 2 diabetes; Tg, thapsigargin; Ubl, ubiquitin like protein; Ufbp1, Ufm1 binding protein containing a PCI domain; Ufm1, Ubiquitin-fold modifier 1; UfSP, Ufm1 specific protease

ABSTRACT

UFM1 is the most recently identified ubiquitin-like protein with unknown biological function. Here we show that *Ufm1* is highly expressed in pancreatic islets of Langerhans, compared to a panel of 19 different mouse tissues. Via affinity purification and mass spectrometry analysis we identified two UFM1 targets: CDK5RAP3 and an unknown protein which we named UFM1-binding protein 1 containing a PCI domain (UFBP1). Both cellular fractionation and immunofluorescence revealed co-localisation of UFM1 and UFBP1 in the endoplasmic reticulum (ER) and the requirement of UFBP1 for ER localisation of UFM1. Further we showed that ER stress induced expression of both *Ufm1* and *Ufbp1* in a beta-cell line and that siRNA mediated *Ufm1* or *Ufbp1* knockdown enhanced apoptosis upon ER stress. Silencing the E3 enzyme Ufl1 resulted in similar outcomes, suggesting that the UFM1-UFBP1 conjugation is important for their function in ER stress-induced apoptosis. We propose that UFBP1, conjugated to UFM1 is a new molecular player in ER associated protein degradation and ER stress-induced beta cell apoptosis.

Ubiquitin is a small protein of 8.5 kDa, which is evolutionary conserved in eukaryotes. The so-called post-translational modification 'ubiquitilation' is the covalent binding of ubiquitin to a substrate protein. The best-known function of ubiquitilation is the targeting of proteins for degradation by the proteasome. However, ubiquitilation can also affect subcellular localization, interactions, stability or activity of the substrate protein (1). Therefore, ubiquitin can participate in a wide variety of cellular processes. Besides ubiquitin, a large family of ubiquitin-like proteins (Ubls) has been identified. These proteins do not necessarily share a high degree of sequence similarity to ubiquitin, but they all contain the typical ubiquitin-like tertiary structure (2).

Ubiquitin-fold modifier 1 or *Ufm1* has recently been identified as a novel protein-conjugating system, displaying a similar tertiary structure to ubiquitin (3). To be activated, *Ufm1* is processed C-terminally by two specific proteases, *UfSP1* and *UfSP2* (4,5). After processing, *Ufm1* is activated via the E1 enzyme, *Uba5*, and further conjugated by the E2 enzyme, *Ufc1*. *Ufl1* has very recently been identified as the E3 enzyme and *c20Orf116* as

a substrate of UFM1 (6). However, the cellular function of UFM1 modification is still unknown.

The pancreatic beta cell is unique in its capacity to synthesize, store and secrete insulin with precise rates to cover the metabolic needs of the organism (7). The fine-tuning of insulin synthesis, storage and secretion is regulated at many levels of gene expression, ranging from transcription, mRNA stability to translation and folding (8). Microautophagic activity also play a role in maintaining cellular hormone stores to optimal levels (9). To fulfill this heavy task of insulin biosynthesis, the beta cell has a highly developed endoplasmic reticulum (ER). Optimal functioning of the ER is essential for proper protein folding and cell survival. Any disturbance in ER folding needs and capacity leads to ER stress and activation of the ER stress response (also called unfolded protein response) (10-13). The aim of this response is to restore ER homeostasis and at least three functionally distinct responses have been identified. First, up-regulation of ER chaperones to increase protein folding activity and to prevent protein aggregation (14). Second, attenuation of global protein translation to reduce the load of newly synthesized proteins and prevent further accumulation of unfolded proteins (15,16). Finally, degradation of proteins misfolded in the ER, which is called ER-associated degradation (ERAD) (17). Three ER stress transducers can be recognized: IRE1, ATF6 and PERK (15,18,19). IRE1 induces *Xbp1* splicing, which in turn, together with ATF6, induces transcription of chaperones (e.g. BiP), genes involved in ERAD and CHOP. In parallel, PERK activation upon ER stress increases eIF2 α phosphorylation, which on the one hand inhibits protein translation and on the other hand activates transcription of chaperones, genes involved in ERAD and CHOP. When this ER stress response fails to restore ER homeostasis, apoptosis is triggered (20).

The link between ER dysfunction and diabetes has been studied extensively. PERK null mice have increased beta cell apoptosis and early onset diabetes (21), eIF2 α ^{S51A} heterozygous mice develop diabetes when fed a high fat diet (22), and CHOP^{-/-} improves beta cell function and promotes cell survival in multiple diabetic mouse models (23). This signal transduction has also been implicated in human diabetes (reviewed in (11)).

In this report, we show that UFM1 and UFBP1, a target of UFM1, are upregulated upon ER stress and that both are involved in ERAD.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Tissue isolation, cell culture and transient transfection Mouse tissues were isolated from male C57Bl/6J mice, between 12 and 15 weeks old. Islets were isolated by injection of collagenase P (Roche) in the pancreatic duct followed by 3 min digestion at 37°C. Islets were hand-picked in HEPES Krebs buffer (20 mM HEPES, pH 7.4; 119 mM NaCl; 4.75 mM KCl; 2.54 mM CaCl₂; 1.2 mM MgSO₄; 1.18 mM KH₂PO₄; 5 mM NaHCO₃) containing 5 mM glucose, and used directly for RNA or protein isolation. All procedures involving mouse tissues were conducted according to protocols and guidelines approved by the K.U. Leuven animal welfare committee. The mouse insulin-producing MIN6 cell line (p. 20-30) was kindly donated by Dr. E. Yamato (Osaka University, Japan) (24) and cultured in DMEM (Invitrogen) (25 mM glucose) equilibrated with 5% CO₂ and 95% air at 37°C. The medium was supplemented with 15% decomplemented fetal calf serum (FCS, Invitrogen), 70 µM β-mercaptoethanol, 4 mM glutamax, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin. The rat insulin-producing INS1-832/13 cell line (p. 50-70) (25) was cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% decomplemented FCS, 1 mM sodium pyruvate, 50 µM β-mercaptoethanol, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. The rat insulin-producing INS-1E cell line (p. 55-75) (a kind gift from Dr. C. Wollheim, Centre Medical Universitaire, Geneva, Switzerland) was cultured in RPMI 1640 (with GlutaMAX-I) containing 5% FCS, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 50 µM 2-mercaptoethanol (26). The mouse glucagon-producing αTC1-6 cell line (27) was cultured in DMEM/F12 medium supplemented with 10% decomplemented FCS, 25 mM glucose, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin. Treatment of INS1 cells with oleate and palmitate (sodium salt, Sigma), cyclopiazonic acid (CPA, 25 µM, Sigma), thapsigargin (1 µM, Sigma), brefeldin A (1 µg/ml, Sigma), cycloheximide (5 µg/ml) or H₂O₂ (30 µM) were performed as described before (28). For the free fatty acid (FFA) treatment, medium was used containing 1% FCS and 1% charcoal-absorbed BSA. FFAs were dissolved in 90% ethanol and diluted 1:100 to a final concentration of 0.5 mM, corresponding to a FFA/BSA ratio of 3.4 (28,29). To suppress Ufm1 expression in 832/13 cells, 25 nM of a Ufm1-specific siRNA was transfected, using Dharmafect 1 (Dharmacon) or Lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. Control cells were treated with an siRNA with no known sequence homology (siControl), as previously described (30). For

overexpression experiments in MIN6 cells, AMAXA technology was used. Briefly, 10^7 cells were electroporated with 5 μ g pDNA, using the T20 program, and recovered for 1 day in RPMI medium. For overexpression in INS1-832/13 cells, 800K cells in a 6-well were transfected with Fugene HD (Roche, Switzerland), using a 2 μ g/8 μ l pDNA/fugene HD ratio.

RNA isolation and quantitative RT-PCR. Total RNA from mouse tissues was extracted using Trizol reagent according to the manufacturer's protocol (Invitrogen), followed by a cleanup procedure with RNeasy columns (Qiagen). RNA from mouse islets as well as mouse pituitary and adrenal gland was extracted using the Absolutely RNA microprep (Stratagene). For MIN6 and INS1-832/13 cells, we used the PureLink micro-to-midi RNA kit (Invitrogen). The total RNA quantity and quality was determined using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies) and the 2100 Bioanalyzer (Agilent, Germany), respectively. Total RNA profiles of all tested samples were similar with sharp 18S and 28S rRNA peaks on a flat baseline. Poly(A)⁺-RNA was isolated from INS-1E cells as described (31). For microarray, total cellular mRNA (2 μ g, except for islets, adrenal gland and pituitary where 1 μ g was used) was reverse transcribed into cDNA (SuperScript Choice System, Invitrogen, using oligo-dT primers and a T7 RNA polymerase promoter site). In all cases the cDNA was *in vitro* transcribed and biotin-labeled for further microarray analysis using a commercially available kit (Affymetrix IVT labeling kit, CA). The concentration of labelled cRNA was measured using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. Labeled cRNA was fragmented in a fragmentation buffer during 35 min at 94°C. The quality of labeled and fragmented cRNA was analyzed using the Agilent bioanalyzer 2100. Fragmented cRNA was hybridized to the mouse 430 2.0 (Affymetrix) array during 16 h at 45°C. Washing and staining of the arrays was performed in a fluidics station (Affymetrix) and afterwards scanned with the Affymetrix 3000 GeneScanner. All image files were analysed using GCOS with the MAS 5 algorithm. The fluorescence intensity of each individual chip was scaled to a target intensity of 150 using the global scaling method. All quality controls of the arrays were according to manufacturer's criteria.

For quantitative RT-PCR, 1 μ g total RNA was reversed transcribed with the RevertAid H Minus First strand cDNA synthesis kit (Fermentas) or using GeneAmp RNA PCR (Roche). Targets were amplified from 5 ng cDNA in a rotor-gene 3000 (Corbett Research) with absolute QPCR mix (ABgene) or on a LightCycler (Roche) with SYBR Green PCR

master mix (Qiagen) using the following oligonucleotide sequences: forward Mm_ *Ufm1*, 5'-GGTGTGTGTCAGGCGGTTC-3'; reverse Mm_ *Ufm1*, 5'-CATTCCCAGCAGTCTGTGCAG-3'; probe Mm_ *Ufm1*, 5'-(6-FAM)ACGTTGACGTCGGACCCGCGGC(TAMRA)-3'; forward Rn_ *Ufm1*, 5'-GGTTTGAGTACCAGGCGGTTC-3'; reverse Rn_ *Ufm1*, 5'-CGTTTCCAGCAGTCTGTGCAG-3'; probe Rn_ *Ufm1*, 5'-(6-FAM)ACGCTCACGTCGGACCCGCGGC(TAMRA)-3'; forward beta-actin, 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCCA-3'; reverse beta-actin, 5'-TCTCCGGAGTCCATCACAATG-3'; probe beta-actin 5'-(6-FAM)TGTCCTGTATGCCTCTGGTCGTAC(BHQ1)-3'; forward Rn_ *Ufbp1*, 5'-GGAAGAAGTGGATGAGAACGAGG-3'; reverse Rn_ *Ufbp1*, 5'-CCTGTTGGGTGAACCTTCTGC-3'; probe Rn_ *Ufbp1* 5'-(6-FAM)AGCTGCTGTTCCAGCCCAGGAGGAAGAAG(TAMRA)-3'; forward Rn_ *Ufl1*, 5'-CAAGGACTTACTTACAAGAAGAGGTTTC-3'; reverse Rn_ *Ufl1*, 5'-GGTACACACTGTCTTCAGC-3'; probe Rn_ *Ufl1*, 5'-(6-FAM)CAGATGACACACAGACTGCTCTGACCAAGC(TAMRA)-3'. Primers for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), *Chop*, *BiP* and spliced *XBP1* have been reported before (31,32).

Plasmid construction and siRNA Mouse *Ufm1* was amplified by PCR using primers 5'-GTGCATATGTCGAAGGTGTCCTT-3' and 5'-GAGGGATCCTTAGCAGCTTCCAACCTCG-3' for cloning in pET16 (*NdeI/BamHI*), 5'-CGTAAGCTTCCATGTCGAAGGTGTCCTT-3' and 5'-GCGAATTCTATTAGCAGCTTCCAACCTCG-3' for cloning in pcDNA3, eGFP(C1) and pmRFP(C1) (Invitrogen) (*HindIII/EcoRI*), 5'-CCGAATTCCATGTCGAAGGTGTCCTT-3' and 5'-GAGGGATCCTTAGCAGCTTCCAACCTCG-3' for cloning in pEXPR-IBA105 (Westburg) (*EcoRI/BamHI*), 5'-CGGGATCCATGTCGAAGGTGTCCTTTAA-3' and 5'-GAGGGATCCTTATCCAACCTCGGTCTCTAGG-3' for cloning in pGEX-2TK (*BamHI*). *Ufbp1* was amplified via PCR using primers 5'-TGATCTAGAATGGTGGGGCCCTGGGTGTATC-3' and 5'-GACCTCGAGGGCTGAAGCCTGGGCAGGGAG-3' for cloning in pEXPR-IBA103 (Westburg) (*XbaI/XhoI*). The PCI domain of *Ufbp1* was removed by cloning of the *XbaI/EcoRI* fragment of plasmid pEXPR-IBA103_ *Ufbp1*_STrEP in the (*XhoI/EcoRI*), resulting in the plasmid pEXPR-IBA103_ *Ufbp1*¹⁻²¹⁹_STrEP. An eGFP tag was cloned in

this construct via *XhoI/AflI* cloning, or removed by *XhoI/AflI* digestion and Klenow fill in reaction. *Ufbp1* without a signal peptide (*Ufbp1*²⁹⁻³¹⁴) was generated via PCR using primers 5'-TGATCTAGAATGGCAGCAGCTGACGGAGAACC-3' and 5'-GACCTCGAGGGCTGAAGCCTGGGCAGGGAG-3' for cloning in the pEXPR-IBA103 vector (*XbaI/XhoI*). The STrEP-tag of this construct was replaced by eGFP via *XhoI/AflI* cloning, or removed via *XhoI/AflI* digestion and Klenow fill in reaction. Mouse *1810074P20Rik* was amplified via PCR using primers 5'-TGAAAGCTTCAATGGCGGACGCCTGGGAGG-3' and 5'-GTAGAATTCTTATGCTCCTCTGTGACAGATGATTTCC-3', and cloned in pcDNA3 (*HindIII/EcoRI*), mouse *Cdk5Rap3* using primers 5'-TGAAAGCTTCAATGCAGGACCATCAGCACG-3' and 5'-GTAGAATTCTCACAGGACGGCCACTGTATCTC3', and cloned in pcDNA3 (*HindIII/EcoRI*). *Cdk5Rap3* (*HindIII/Klenow/EcoRI*) from this construct was cloned in pGEX-2TK (*SmaI/EcoRI*). Mouse *BiP* was amplified using primers 5'-TGAAAGCTTCAATGATGAAGTTCCTGTGG-3' and 5'-GACCTGCAGACAACCTCATCTTTTCTGATGTATCC-3', and cloned in pcDNA3 (*HindIII/PstI*). The plasmid pCI-NeoHA-CD3delta was a kind gift of Dr. A. Weissman (33).

ONTARGETplus *Ufm1* siRNA (Dharmacon) against the rat *Ufm1* sequence 5'-GUUUGCAGAAGAGUUUAA-3' or 5'-GCUACAAGUGCGAUUAUUAUU-3', a pool of four siRNA oligonucleotides (5'-CCUUUGUGGUAGAAGAAGA-3', 5'-GGGCAAGUUCAUCUACAUA-3', 5'-GGGUGAAGCUGCUGUUGCA-3', 5'-GCGAGUGACCUGGGAAGAA-3') targeting rat *Ufbp1* (Dharmacon) or (5'-AGUAAACAUUGUCGACUUAUU-3', 5'-GAACAUGGGUUGACGUUUCUU-3', 5'-UGUUGUGGUCAGCGAGAAAUU-3', 5'-AAGACAGUGUGUACCGAUUAUU-3') targeting rat *Ufl1* were used. A non-targeting siRNA or pool was used as negative control (Dharmacon or Qiagen).

Antibodies Polyclonal UFM1 and UFBP1 specific antibodies were raised against the recombinant His-tagged UFM1 and the UFBP1 peptide C-RKRLESQREA EWKKE (synthesised by EZbiolab), respectively. The UFBP1 peptide was conjugated with maleimide-activated mCKLH following the manufacturer's protocol (Pierce). Rabbits were immunized with antigen (His_UMF1 or UFBP1 peptide_KLH) in Freund's complete adjuvant and boosted after 14 days using Freund's incomplete adjuvant. Serum was

affinity purified using CNBr-activated sepharose 4 fast flow beads (Amersham) linked with recombinant His-UFM1 or UFBP1 peptide conjugated to BSA. GST antibody was from Santa Cruz, BiP, β -actin and GAPDH antibody from Abcam, HSPA8 antibody from Gentaur, LAMP2 and HA antibody from Sigma and GDH antibody was a kind gift from M. Franssen (K.U. Leuven, Belgium). BiP and UFBP1 antibodies were conjugated to HRP using the 'lightning-link HRP conjugating' kit (Innova Biosciences) for detection after immunoprecipitation.

Protein isolation and subcellular fractionation For total protein extraction, tissues were immediately washed with PBS after dissection and lysed in S1 buffer (50 mM Tris, pH 8; 0.4 % NP-40; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; proteinase inhibitor cocktail tablet (Roche); 1 mM PMSF; 2 mM N-ethylmaleimide), using a pestle for homogenization. Protein concentrations were measured via Dc protein assay (Bio-Rad). For subcellular fractionation, MIN6 cells were homogenised in freshly prepared HMB buffer (250 mM sucrose; 5 mM MOPS, pH 7.2; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 2 mM N-ethylmaleimide; proteinase inhibitor cocktail tablet) with a metal douncer (20 strokes). The homogenate was centrifuged at 770 x g for 10 min. The pellet (N) was resuspended in 1 ml HM buffer. The supernatant was centrifuged for an additional 10 min at 2330 x g. The pellet (M) was again resuspended in 1 ml HMB buffer, and the supernatant centrifuged at 13000 x g for 20 min. The resulting pellet (L) was resuspended in 1 ml HM buffer and the supernatant centrifuged at 100000 x g for 60 min. After resolving the pellet (P) in 1 ml HM buffer and bringing the supernatant (S) volume to 1 ml, all the protein fractions were precipitated with 7 % TCA and 0.015 % deoxycholate. The pellets were resolved in SDS sample buffer. Protein extracts were separated by 4-12% SDS-PAGE (Invitrogen).

GST protein isolation, in vitro transcription/translation and GST pull down assay. GST protein isolation. *E. coli* pLYS cells were used to produce GST and GST-Ufm1 recombinant protein. 1 mM IPTG was used to induce protein expression at 30°C for 2 hours. Bacterial cells were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.5; 0.45 M NaCl; 0.1% Triton-X-100; 1 mM DTT; 0.1% β -mercaptoethanol) and disrupted by sonication (6x 10"). After centrifugation (12000 x g, 20 min), the protein extracts were immobilized on glutathione-agarose beads (Sigma) for 1 hour at 4°C. The beads were then washed with washing buffer (50 mM Tris, pH 7.5; 0.15 M NaCl; 0.1% Triton-X-100; 1 mM DTT; 0.1% β -mercaptoethanol). The GST fusion proteins were eluted from the beads with reduced

glutathione (Acros) in 100 mM Tris, pH 7.5, and after concentration, dialysed overnight in PBS + 500 mM NaCl. *In vitro transcription/translation.* The TnT T7 transcription/translation kit (Promega), using rabbit reticulocyte lysates, was used to prepare *in vitro* ³⁵S-methionine labeled target proteins, following the manufacturer's protocol. *GST pull-down assay.* 100 µl glutathione-agarose beads were blocked in Tris-buffer (50 mM Tris, pH 7.5; 100 mM NaCl) + 1 mg/ml BSA and 0.5% Triton-X-100 for 15 min at 4°C. After washing and resuspending the beads with binding buffer (50 mM Tris, pH 7.5; 100 mM NaCl, 0.1% NP40; 1 mM DTT), they were incubated with 550 pmol GST protein or GST-Ufm1 protein for 30 min at 4°C. The beads were then washed 2 times with binding buffer and resuspended in 50 µl binding buffer. MIN6 cell-lysates and ³⁵S-labelled proteins (40 µl) were pre-cleared on GST coupled beads for 30 min at 4°C. 40 µl coupled beads were incubated with 10 µl pre-cleared MIN6 lysates (25 x 10³ cells) and 1/3 pre-cleared ³⁵S-labelled protein in ubiquitilation buffer (50 mM Tris, pH 7.5; 100 mM NaCl, 0.1% NP40; 1 mM DTT; 2 mM ATP; 5 mM MgCl₂) (final volume, 200 µl) for 30 min at 40°C. The beads were then washed 3 times with binding buffer. Bound proteins were released from the beads by boiling in SDS sample buffer and separated on a 4-12% Tris-Glycine gel in MES buffer. The gel was dried and analyzed via phosphorimaging.

Apoptosis The percentage of viable, apoptotic, and necrotic cells was determined following staining of INS-1E cells with the DNA binding dyes propidium iodide and Hoechst 33342, as described (28). For caspase 3 cleavage measurements, cells were washed with cold PBS and lysed with Laemmli buffer. Lysates were then resolved by 15% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Cleaved caspase-3 (Asp175, Cell Signaling, 1/1000) and α -tubulin (Sigma, (1/5000) were used as primary antibodies. Horseradish-peroxidase-labeled rabbit and mouse antibodies (Thermo Scientific) were used as secondary antibodies. Immunoreactive bands were revealed using the SuperSignal® West Femto chemiluminescent substrate (Thermo Scientific), detected using a LAS-3000 charge-coupled device camera and quantified with the Aida Analysis software (Fujifilm).

Insulin release Cells were treated with duplexes as described and grown to confluency. Insulin secretion was assayed as previously described (25). Briefly, cells were washed with HEPES balanced salt solution (HBSS) (114 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.16 mM MgSO₄, 20mM HEPES, 2.5 mM CaCl₂, 25.5 mM NaHCO₃ and 0.2% BSA, pH7.2) with 3 mM glucose followed by a 2 hour pre-incubation in the same buffer. For

glucose-stimulated insulin secretion, cells were incubated in HBSS for an additional 2 hours in the presence of 3 mM, 15 mM glucose or 15 mM glucose + 30 mM KCl as indicated followed by collection of buffer for insulin radioimmunoassay (Coat-A-Count kit, DPC).

STrEP-tag affinity purification and mass spectrometry. STrEP-tag affinity purification. 150×10^6 MIN6 cells were transfected with pcDNA3/Ufm1 for 72 hours. After total protein extraction in S1 buffer, lysates were incubated with STrEP-Tactin beads (Westburg), following the manufacturer's protocol. The affinity purified proteins were separated on a 4-12% Tris/Glycine gel (Invitrogen) and stained with coomassie. The proteins that were present in the UFM1 purified samples and not in the control were picked for further analysis via mass spectrometry. *Mass spectrometry.* Gel bands were picked in water, transferred to 100 μ l fixation solution (50% methanol; 5% acetic acid) and rinsed three times with water and three times with ACN (LC-MS quality, chromasolv, Sigma). The gels were hydrated in 100 mM NH_4HCO_3 , followed by dehydration in 100% ACN, each 10 min. This step was repeated twice prior to dehydrating the gel pieces in a speedvac. Gel pieces were rehydrated in digestion buffer (50 mM NH_4HCO_3 ; 5 mM CaCl_2), containing 1 ng/ μ l modified trypsin (Promega) and incubated overnight at 37°C. The resulting peptides were extracted from gel in four steps: once with 50 mM NH_4HCO_3 , twice with 50% ACN; 5% formic acid and once with 95% ACN; 5% formic acid, each 30 min. Supernatants were dried in a speedvac. Upon concentrating and desalting the tryptic fragments using Millipore C-18 ZipTips, the samples were mixed in a 1/1 v/v ratio with alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid matrix (saturated solution in 50% ACN; 2.5% TFA in HPLC water), spotted onto the MALDI target plate and allowed to air dry. MS/MS analysis was performed on a 4800 MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems). The instrument was calibrated with the Applied Biosystems Calibration Mixture 1. Measurements were taken in the positive ion mode between 900 and 9000 m/z. Sequences were automatically acquired by scanning first in MS mode and selecting the 15 most intense ions for MS/MS using an exclusion list of peaks arising from tryptic autodigestion. Data interpretation was carried out with the GPS Explorer software (V3.5) and database searching with the Mascot program (version 2.0.00). MS/MS searches were conducted with the following settings: MS/MS tolerance for precursor and fragment ions between 0.2 and 1 Da depending on the sample, methionine oxidation as variable modification and carbamidomethylation of cysteine as fixed modification. Trypsin was selected as enzyme

and a maximum of one missed cleavage was allowed. Using these parameters the probability-based MOWSE score greater than the given cut-off value for MS/MS fragmentation data were taken as significant ($p < 0.05$).

Pulse/chase and immunoprecipitation Cells were pre-incubated for 1 hour in starving medium (RPMI 1640 without cystine and methionine (Sigma)) and then labeled with 200 μCi ^{35}S -methionine/cysteine (Perkin Elmer Easytag express protein labeling mix, specific activity 1175 Ci/mmol) for 1 hour at 37°C, followed by a 0, 30, 60 and 90 min chase at 37°C. The cell lysates were immunoprecipitated using HA antiserum (Sigma) and bound to protein A-TSK sepharose (Affiland). After elution, proteins were separated by SDS-PAGE and quantified for autoradiographic signals using ImageQuant software. For co-immunoprecipitation, cell lysates were incubated with BiP, UFBP1 or UFM1 antibody and bound to protein A-TSK sepharose (Affiland). After elution, proteins were separated by SDS-PAGE and detected via immunostaining.

Laser scanning confocal microscopy Transfected INS1-832/13 cells were incubated with 1 μM ER-tracker blue-white DPX (Invitrogen), to stain the ER. Images were obtained with a Zeiss LSM510 laser scanning confocal microscope, using a 63x oil objective.

RESULTS

Ufm1 is preferentially expressed in pancreatic islets of Langerhans. Microarray mRNA expression analysis in the mouse was a basis for this study. As is illustrated in Figure 1A, the transcript encoding *Ufm1* (Ubiquitin-fold modifier 1) was most abundant in protein-secreting cells, especially pancreatic acini, islets of Langerhans and the salivary gland. These data were validated via quantitative real-time PCR, using *Ufm1*-specific primers and probe (Figure S1). Furthermore, *Ufm1* mRNA levels in islets were higher in fed mice, as compared to mice that were fasted for 20 hours (Figure 1B). A similar tissue distribution was observed at the protein level, using a UFM1-specific antibody (Figure 1C). From this expression profile we hypothesized that UFM1 plays an important role in protein secreting cells like beta cells in the islets of Langerhans.

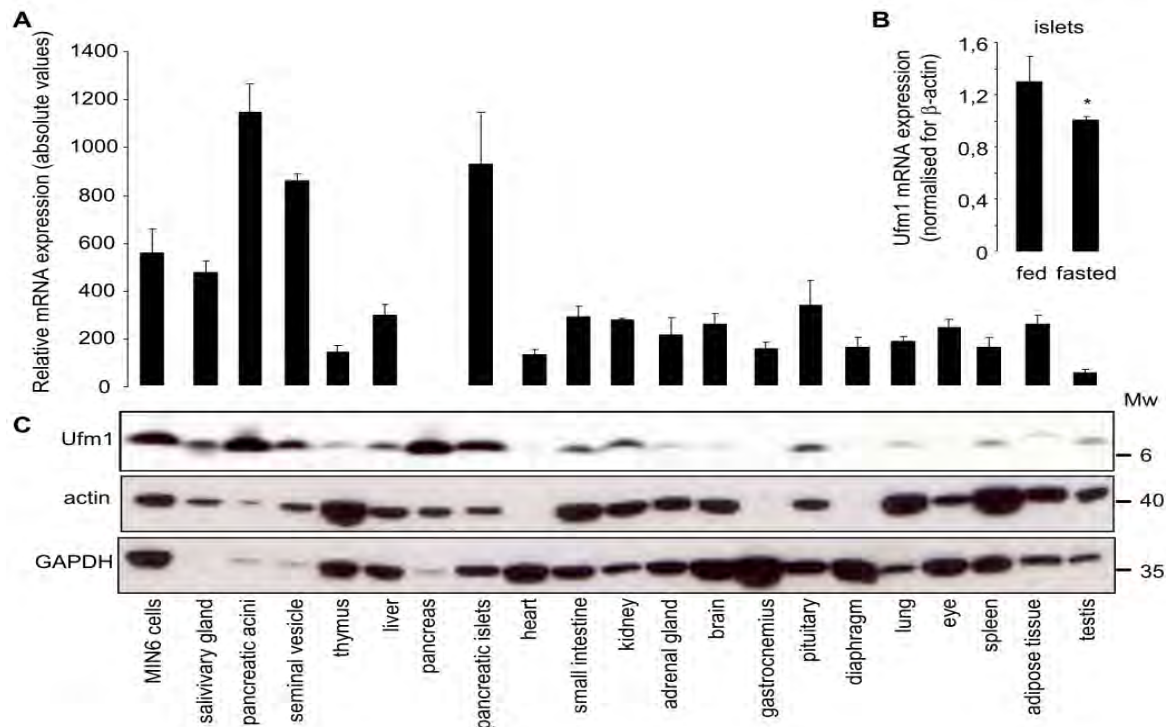


Figure 1. Expression profile of *Ufm1* in different mouse tissues. **A** *Ufm1* mRNA expression in 19 different mouse tissues and MIN6 cells, measured via microarray (probe set 1449263_at), $n \geq 3$, **B** *Ufm1* mRNA expression in islets from mice which were fasted for 20 hours or fed a normal diet, $n \geq 3$, * $p=0.02$, **C** UFM1 protein expression in the same mouse tissues. Immunodetection was done with a UFM1 specific antibody. An equal amount of protein was loaded on gel. Both GAPDH and actin were used as control, since no protein is equally expressed in all tissues. Representative immunoblot is shown.

Isolation of Ufm1 target proteins. It is generally accepted that UbIs cause post-translational modifications of target proteins; furthermore, for a number of targets altered function was found when UbIs were covalently linked. To identify the target(s) of UFM1, we performed a UFM1 affinity purification. Since our *Ufm1* specific antibody was not suitable for immunoprecipitation, we engineered a STrEP-tag at the N-terminus of UFM1. Clonal insulin-producing MIN6 cells were transfected with this STrEP-*Ufm1* construct, or with a STrEP construct as control. We observed that by treating cells with cycloheximide, UFM1 conjugation was increased (Figure S5A). The reason for this, however, needs further investigation. Because of this observation we exposed the cells for 2 hours to 10 mg/l cycloheximide. Total cell extracts were prepared from these transfected cells and used for STrEP-tag affinity purification. The eluates were analyzed via SDS-PAGE and coomassie staining (Figure S2). Proteins that were present in the UFM1 purification and

not in the control were eluted from gel and analyzed via mass spectrometry. In total, 9 protein fragments were analyzed and identified (Table 1).

Table 1. List of the identified proteins by mass spectrometry after Ufm1_STrEptag affinity purification.

gel fragment	size on gel (kDa)	protein name	Swiss Prot Accession nr	Mw (kDa)	nr of peptides seq/unique		sequence coverage %	function
1	13	UFM1, Ubiquitin fold modifier 1	P61961	9	2	2	31.8	ER stress-induced apoptosis (this paper)
2	20	UFC1, Ufm1-conjugating enzyme 1	Q9CR09	20	3	2	10.8	E2 enzyme of UFM1 (Komatsu et al, 2004)
3	36	UFC1, Ufm1-conjugating enzyme 1	Q9CR09	20	2	1	6	E2 enzyme of UFM1 (Komatsu et al, 2004)
4	42	UFBP1, Ufm1 binding protein containing a PCI domain	Q80WW9	36	4	3	13.3	ERAD/ER stress-induced apoptosis, target of UFM1 (Tatsumi et al, 2009; this paper)
5	55	UBA5, Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5	Q8VE47	45	2	2	4.7	E1 enzyme of Ufm1 (Komatsu et al, 2004)
6	62	UBA5, Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5	Q8VE47	45	2	2	5.2	E1 enzyme of UFM1 (Komatsu et al, 2004)
		CDK5RAP3, CDK5 regulatory subunit-associated protein 3	Q99LM2	57	4	3	6.4	tumor suppressor (Wang et al, 2007); substrate of Ufm1 (this paper)
7	75	HSPA5/BiP, 78 kDa glucose-regulated protein precursor	P20029	72	3	3	4.7	ER stress, chaperone (Ma, Hendershot, 2004)
		HSPA8, Heat shock 70 kDa protein 8	P63017	71	5	5	8	chaperone (Zimmerman, 1998)
8	100	Ufl1, UFM1 ligation protein	Q8CCJ3	100	7	7	9.7	E3 enzyme of UFM1 (Tatsumi, 2009, this paper)
9	130	PCX, Pyruvate carboxylase	Q05920	130	12	11	12.3	anaplerosis/cataplerosis (Fransson et al, 2006)

Both a 20 and 36 kDa fragment were identified as UFC1, the conjugating enzyme of UFM1 (3). Furthermore, we identified UBA5, the activating enzyme of UFM1 in the 45 kDa and 60 kDa protein fragments. These two proteins were known to interact with UFM1, while the binding of the other identified proteins with UFM1 was previously

unknown. The identity of the other protein fragments was: two unknown proteins, 2600009E05Rik (40 kDa) and 1810074P20Rik (100 kDa); CDK5RAP3/LZAP (60 kDa) and two heat shock proteins, HSPA8 (34) and HSPA5 (BiP), both about 70 kDa. Finally, pyruvate carboxylase (130 kDa) (35) was detected, perhaps not surprisingly, since it is biotinylated and highly expressed in beta cells (36). Very recently, Tatsumi et al. also identified the 2 unknown proteins as binding partners of UFM1 and showed that 2600009E05Rik (c20Orf116 in human) is a substrate of UFM1 and 1810074P20Rik (KIAA0776, UFL1 in human) is probably the E3 enzyme of UFM1 (6).

UFM1 binds in vivo and in vitro to UFBP1 and CDK5RAP3. The *in vivo* interaction between the identified targets and UFM1, demonstrated by UFM1 affinity purification in MIN6 cells, was further analyzed *in vitro* by GST pull down. A GST-tag was coupled to the N-terminus of mouse UFM1 with a C-terminal ending glycine residue (GST-UFM1(G)). Purified GST-UFM1(G) and GST protein were coupled to glutathione-agarose beads and incubated with ³⁵S-labeled mouse 2600009E05Rik, CDK5RAP3, BiP and UFL1, which were generated by T7 *in vitro* transcription/translation. 2600009E05Rik and CDK5RAP3 were recovered from the GST-Ufm1(G) coupled beads, but not from the GST coupled beads (Figure 2A). Therefore, we propose to name 2600009E05Rik as UFBP1, or Ufm1 binding protein containing a PCI domain. Although very weak, the interaction between UFM1 and UFBP1 was also confirmed via co-immunoprecipitation with a UFBP1 and UFM1 specific antibody (Figure 2C). Neither BiP nor UFL1 could bind to GST-UFM1(G) or GST coupled beads, indicating that they do not interact directly with UFM1. It is known that heat shock proteins are often picked up during affinity purification as false positives. Co-immunoprecipitation with a BiP or UFM1 specific antibody could also not demonstrate a binding between UFM1 and BiP (Figure 2C). However, an interaction between UFBP1 and BiP was observed after co-immunoprecipitation with a UFBP1 specific antibody (Figure 2C). To analyze why UFL1 did not bind in our *in vitro* screen, we used the same GST pull down strategy, using CDK5RAP3-GST as bait. Figure 2B shows an interaction between CDK5RAP3 and UFL1, but not with UFBP1. These results show that UFM1 directly binds to UFBP1 and CDK5RAP3, and that UFL1 binds to CDK5RAP3 (Figure 2D).

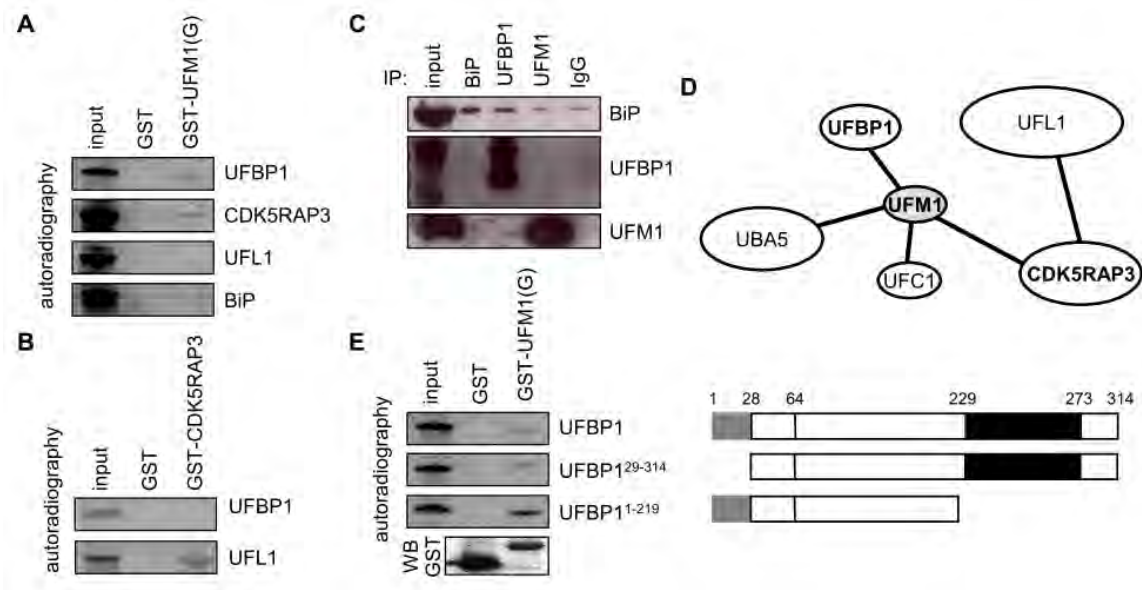


Figure 2. UFM1 interacts with UFBP1 and CDK5RAP3. **A** GST-UFM1(G) pull down with *in vitro* T7 transcribed/translated ³⁵S-labelled UFBP1, CDK5RAP3, UFL1 and BiP. Lane 1 shows the starting labeled proteins used for the pull down experiment. A GST-antibody was used for immunoblotting (WB), **B** GST-CDK5RAP3 pull down with *in vitro* T7 transcribed/translated ³⁵S-labelled UFBP1 and UFL1, **C** co-immunoprecipitation with BiP, UFL1 and UFM1 specific antibodies, **D** Schematic overview of the protein interactions of UFM1 demonstrated in mouse in this manuscript, **E** GST-UFM1(G) pull down with *in vitro* T7 transcribed/translated ³⁵S-labelled UFBP1, UFBP1²⁹⁻³¹⁴ and UFBP1¹⁻²¹⁹ (left panel), and a schematic overview of the used UFBP1 constructs (right panel).

UFBP1 is, like UFM1, evolutionary conserved. The protein is present in plants, invertebrates and vertebrates (Figure S3). Detailed computational analysis of the UFBP1 protein (314 aa) sequence and structure revealed the presence of a signal peptide for the ER (aa 1-28), a transmembrane helix (aa 5-22), a nuclear localization signal (aa 65-69) and a PCI domain (aa 229-273) (37). PCI domains are present in several regulatory Proteasome subunits, COP9 subunits, eIF3 translation initiation factor subunits, and in certain other multi-protein complexes (38). To investigate the role of these two domains in the binding with UFM1, we performed a GST-pull down experiment. We first constructed a *Ufbp1* construct without the signal peptide, UFBP1²⁹⁻³¹⁴, or without the PCI domain, UFBP1¹⁻²¹⁹ (Figure 2E). ³⁵S-labelled UFBP1²⁹⁻³¹⁴ and UFBP1¹⁻²¹⁹ were generated by T7 *in vitro* transcription/translation. Figure 2E shows that both truncated proteins could still bind to UFM1 *in vitro*, showing that neither the signal peptide nor the PCI domain is involved directly in the binding of UFM1 to UFBP1.

Ufm1 translocates to the ER for binding to Ufbp1. Different eGFP and mRFP fusion constructs were made and transfected into INS1-832/13 cells, to analyze the cellular

localization of UFM1 and UFBP1 via fluorescence microscopy. After overexpression, UFM1 was equally localized in the cytoplasm and the nucleus (Figure 3A). Overexpression of full length UFBP1-eGFP showed an ER-specific expression of UFBP1. Deletion of the PCI domain of UFBP1 had almost no effect on the localization of the protein, while deletion of the signal peptide resulted in an exclusive nuclear localization. When we overexpressed mRFP-UFM1 and UFBP1-eGFP together, UFBP1 remained localized in the ER, but UFM1 was no longer equally distributed over cytoplasm and nucleus (Figure 3B,D, S4C). Instead, it was more localized in the ER, indicating that overexpression of UFBP1 influences the localization of UFM1. A similar localization pattern was observed in cells where mRFP-UFM1 and UFBP1¹⁻²¹⁹-eGFP were co-expressed (Figure 3D, S4B,C). Overexpression of UFM1 together with UFBP1²⁹⁻³¹⁴, which is truncated for the signal peptide, however, resulted primarily in a nuclear localization of UFM1 (Figure 3D, S4B,C). The same results were obtained after overexpression of these constructs in human HeLa cells (Figure 3C, S4A), indicating that UFM1 and UFBP1 localization is similar in mouse and human. To ensure that overexpression did not cause a mislocalization of the proteins, we also detected the cellular localization of endogenous UFM1 and UFBP1 via cellular fractionation. We separated MIN6 lysates in 5 different fractions: a nuclear pellet (770 x *g*), a heavy mitochondrial fraction (2330 x *g*), a light mitochondrial, peroxisomal and lysosomal fraction (13,000 x *g*), a cell membrane fraction (100,000 x *g*) and the cytosolic and large protein complexes supernatant (100,000 x *g*). Glutamate dehydrogenase (GDH) was taken as a control for mitochondrial localization, LAMP2 for lysosomal localization, BiP for ER localization and HSPA8 for cytosolic localization. From the western blot performed with these cellular fractions (Figure 3E), it was clear that UFBP1 is present in the same fraction as BiP, indicative for an ER localization. UFM1 partially co-localized with UFBP1 in the ER, but also a significant amount of UFM1 protein was detected in the cytosolic fraction, which contains both cytosolic proteins and large protein complexes. Next we overexpressed UFM1, UFBP1 or UFM1^{G83A} in MIN6 cells. Processing of UFM1 to its mature form is significantly reduced in the UFM1^{G83A} mutant. Overexpressed UFM1 has the same localization as endogenous UFM1, namely cytoplasmic and ER (Figure 3F). In contrast, when UFBP1 or both UFM1 and UFBP1 are overexpressed, UFM1 is mainly expressed in the ER (Figure 3F), similar to what we observed via immunocytochemistry. UFM1^{G83A} is

wrongly localized when not processed, but shows a normal localization after processing (Figure 3F, upper and lower band respectively).

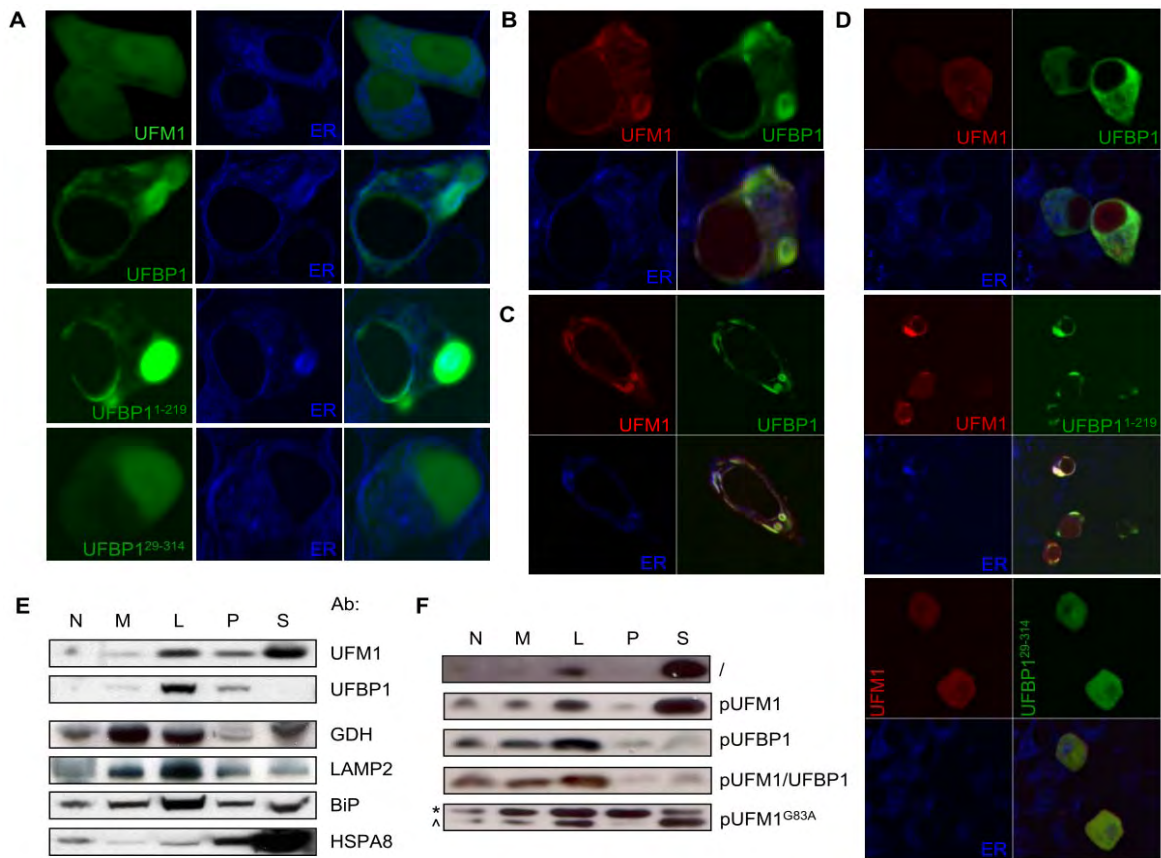


Figure 3. UFBP1 and UFM1 are co-localized in the ER. **A** INS1-832/13 cells transfected with different eGFP constructs as indicated on the picture. INS1-832/13 cells (**B**) and HeLa cell (**C**) co-transfected with mRFP-UFM1 and UFBP1-eGFP, **D** Overview of INS1-832/13 cells co-transfected with mRFP-UFM1 and UFBP1-eGFP, UFBP1²⁹⁻³¹⁴-eGFP or UFBP1¹⁻²¹⁴-eGFP, as depicted. Cells were also stained with an ER-tracker (blue). Pictures were taken with a 63x objective on a Zeiss confocal microscope, **E** UFM1 and UFBP1 expression in different MIN6 cellular fractions. N=nuclear and whole cell fraction, M=heavy mitochondrial fraction, L=light mitochondrial, peroxysomal and lysosomal fraction, P=microsomal and cellular membrane fraction, S=cytoplasmic fraction. GDH, mitochondrial marker; LAMP2, lysosomal marker; BiP, ER marker and HSPA8, cytosolic marker. **F** UFM1 expression after cellular fractionation of MIN6 cells overexpressing UFM1, UFBP1, both UFM1 and UFBP1 or UFM1^{G83A}, as depicted (*, unprocessed; ^, processed).

These data indicate that UFBP1 and UFM1 are partially co-localized in the ER and that UFBP1 plays an important role in the compartmentalization of UFM1 in the cell.

UFM1 and UFBP1 are not involved in glucose stimulated insulin secretion. Based on the expression profile of *Ufm1* and its cellular localization, we hypothesized that *Ufm1* could play a role in the secretory pathway of protein secreting cells. To address this, we investigated the role of UFM1 and UFBP1 on insulin secretion in the rat glucose-responsive insulinoma cell line INS1-832/13. The effect of *Ufm1* specific RNAi mediated

silencing on glucose-stimulated insulin release was examined 48 hours after transfection of 832/13 cells with a *Ufm1*- or *Ufbp1*-specific siRNA duplex or a control duplex (siControl) with no known sequence homology. Treatment with the *Ufm1* or *Ufbp1* siRNA duplex caused respectively a ~60 % or 80 % decrease in *Ufm1* or *Ufbp1* mRNA levels compared to siControl-treated cells (figure 4C); no further knock-down was observed after 72 hours of incubation (data not shown). Insulin release in these silenced cells was not affected compared to the control cells (Figure S5B), indicating that neither UFM1 nor UFBP1 are required for glucose regulated insulin secretion.

ER stress-induced apoptosis is increased after Ufm1, Ufbp1 and Ufl1 knockdown. Since UFM1 and UFBP1 are co-localized in the ER and a possible effect of ER stress on *Ufm1* expression was suggested (39,40), we analyzed the role of UFM1 and UFBP1 during ER stress. A 14-hour exposure of INS-1E cells to cyclopiazonic acid (CPA), a potent ER Ca^{2+} ATPase pump inhibitor and pharmacological inducer of ER stress, markedly induced *Ufm1* and *Ufbp1* mRNA expression (Figure 4A,B). This induction was confirmed at the protein level (Figure 4D). The chemical ER stressors thapsigargin (another inhibitor of the ER Ca^{2+} ATPase pump) and brefeldin A (an inhibitor of ER-to-Golgi transport) also induced *Ufm1* and *Ufbp1* mRNA (Figure 4A,B), suggesting that ER stress mediates the upregulation. Free fatty acids (FFAs) are physiologically more relevant ER stress inducers in beta cells (31,41,42). Exposure of INS-1E cells to the FFAs oleate or palmitate for 14 hours did not increase *Ufm1* expression (Figure 4A), but *Ufbp1* was clearly induced (Figure 4B). Also the expression of *Ufl1*, the E3 enzyme of UFM1, was increased after ER stress, similar to *Ufm1* and *Ufbp1* expression (Figure 4C).

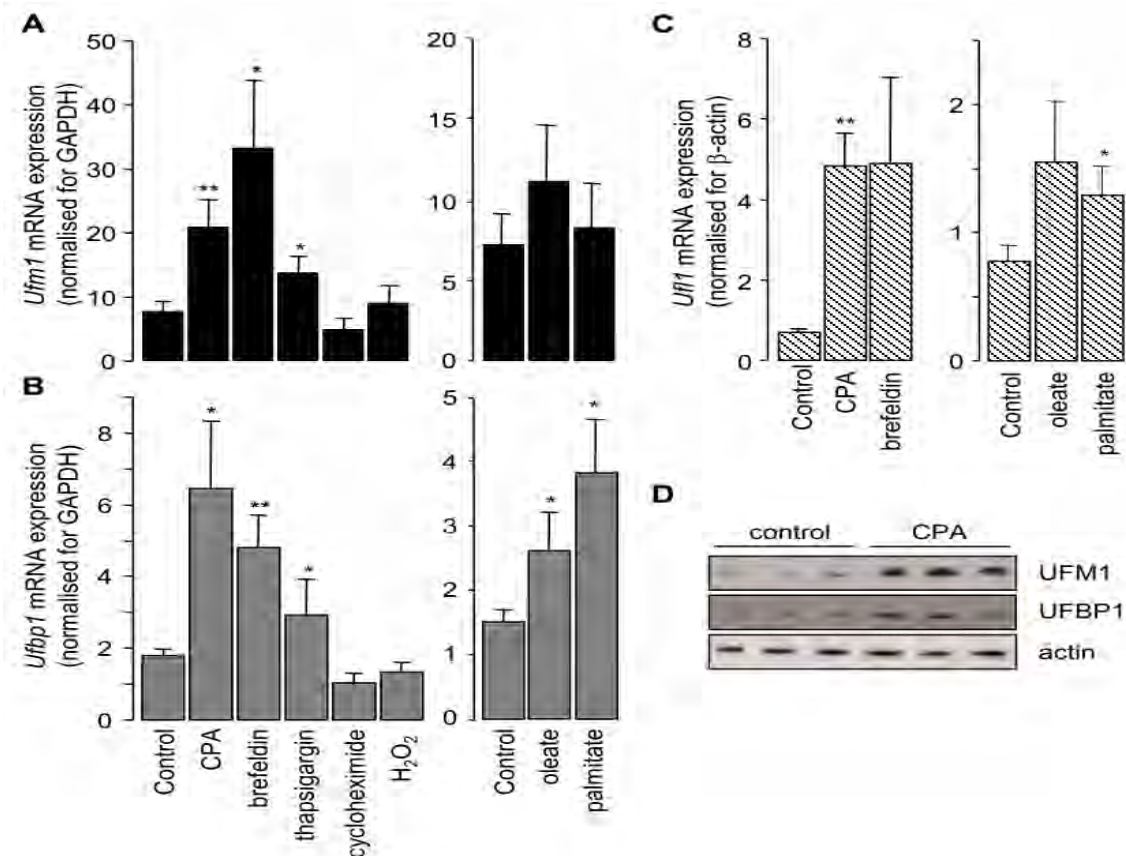


Figure 4. *Ufm1* and *Ufbp1* expression is induced upon ER stress. A mRNA expression level of *Ufm1* (A), *Ufbp1*(B) or *Ufl1* (C) after exposure of INS-1E cells to 25 μ M CPA, 1 μ M thapsigargin, 1 μ g/ml brefeldin A, 5 μ g/ml cycloheximide, 30 μ M H₂O₂, 0.5 mM oleate and 0.5 mM palmitate for 14 hours, measured via qPCR and normalized for GAPDH (*Ufm1* and *Ufbp1*) or actin (*Ufl1*). Data are means $\pm$ SEM, n=4-6, *, p $\leq$ 0.05; **, p $\leq$ 0.01, paired student t-test, D UFM1 and UFBP1 protein expression is induced in cells exposed for 14 hours to CPA. Actin is shown as a control for protein loading.

Since apoptosis is triggered when the ER stress response fails to restore ER homeostasis, we analyzed the effect of a reduced *Ufm1*, *Ufbp1* or *Ufl1* expression on beta cell survival. We analysed also the effect of *Ufl1* knockdown on apoptosis, to be able to investigate the importance of the conjugation between UFM1 and UFBP1, since a reduced *Ufl1* expression results in a significant reduction of UFM1-UFBP1 conjugation (6). The knockdown efficiency during the whole experiment is shown in Figure S6. *Ufm1* silencing had no effect on basal apoptosis, but significantly increased apoptosis upon ER stress induced by palmitate, CPA and brefeldin A compared to siControl cells (Figure 5A). *Ufbp1* silencing increased oleate-, palmitate- and brefeldin A-induced apoptosis (Figure 5B) and *Ufl1* silencing increased CPA- and brefeldin A- induced apoptosis by 30-40% compared to siControl treated cells (Figure 5C). *Ufm1* and *Ufbp1* silencing had no affect

on apoptosis induced by non-ER stressors such as cycloheximide- or H₂O₂ (Figure 5A, B), indicating that these proteins specifically act on ER stress-induced apoptosis. The sensitization of beta cells to ER stress-induced apoptosis was confirmed using a second method, namely caspase 3 cleavage. The knockdown of *Ufm1* and *Ufbp1* lead to enhanced caspase activation by CPA and brefeldin A (Figure 5D). Although *Ufbp1* and *Ufm1* silencing sensitized beta cells to ER stress, the expression of *BiP*, *Chop* or spliced *Xbp1* was not altered (figure S7).

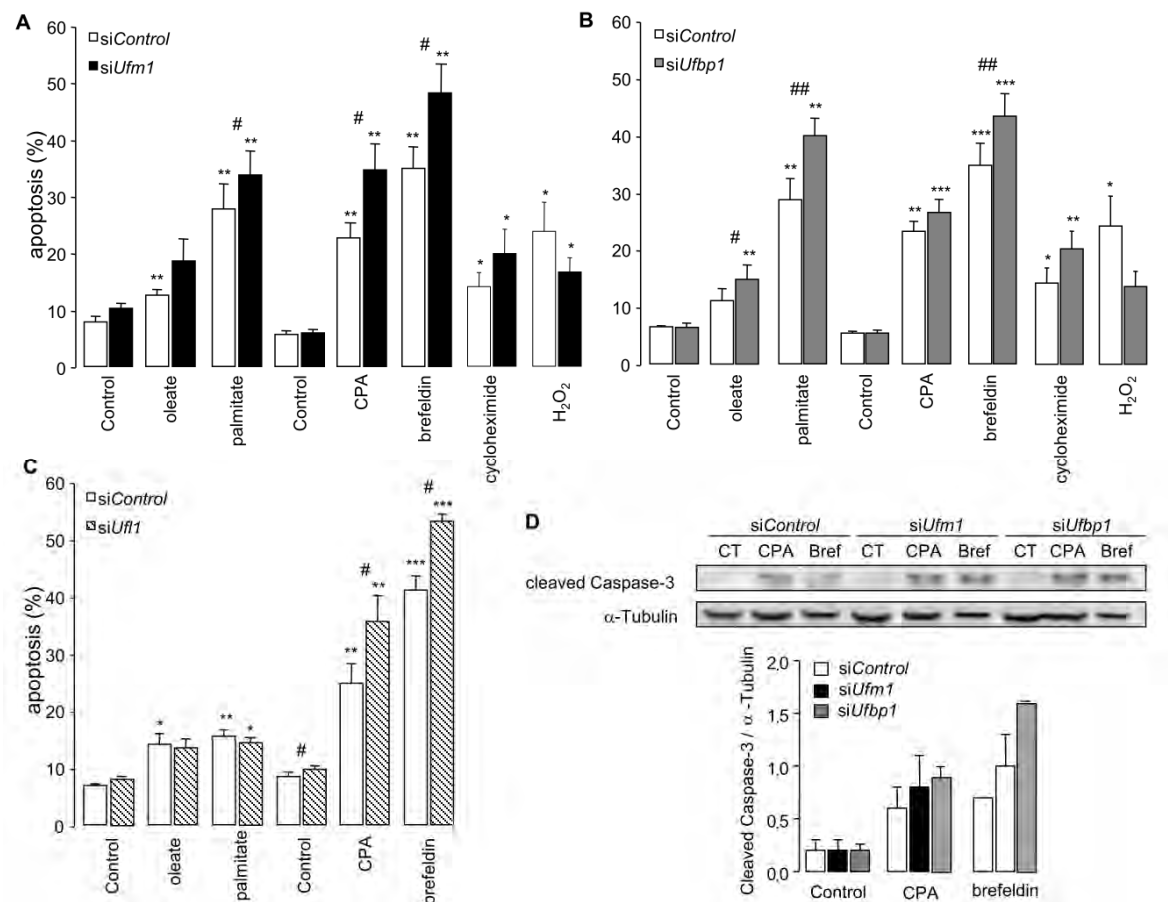


Figure 5. UFM1 and UFBP1 are involved in ER stress induced apoptosis. INS-1E cells were treated with the ER stressors oleate, palmitate, cyclopiazonic acid (CPA) and brefeldin A or the ER stress-independent apoptosis inducers cycloheximide and H₂O₂, and silenced for *Ufm1* (A), *Ufbp1* (B) or *Ufl1* (C). Apoptosis was evaluated by Hoechst/PI staining. Data are means $\pm$ SEM of 3-7 independent experiments. Paired student *t* test: *, *p*≤0.05; **, *p*≤0.01; ***, *p*≤0.001 compared to control treatment; #, *p*≤0.05; ##, *p*≤0.01 silenced cells compared to siControl cells, D Caspase 3 activation in *Ufm1* and *Ufbp1* silenced cells after treatment with the ER stressors CPA and brefeldin A. The densitometric quantification of the immunoblots is shown in the lower panel. Cleaved Caspase-3 signal was normalized for α -tubulin expression. The results are means $\pm$ SEM of 2-3 independent experiments. In the assays, the respective controls contain the vehicles ethanol and DMSO.

Since a defective ERAD can result in increased apoptosis, we explored the involvement of UFM1 and UFBP1 in ERAD. Therefore we analyzed if a decrease in UFM1, UFBP1 or UFL1 protein level could affect the rate of protein degradation of the classical ERAD substrate CD3 δ (43). CD3 δ is a T-cell receptor subunit that when not assembled with other receptor subunits is retained in an apparently native conformation in the ER, where it is ubiquitinated and undergoes proteasome-dependent degradation (44). We transfected INS1-832/13 cells with siRNA against *Ufm1*, *Ufbp1*, *Ufl1* or a non-target siRNA, 24 hours before transfection with CD3 δ -HA. mRNA expression was analysed via qPCR (Figure 6A). Via pulse/chase experiments, the degradation of CD3 δ was followed in time. As shown in Figure 6B, CD3 δ is slower degraded in cells silenced for *Ufbp1* than in control cells, while in *Ufm1* and *Ufl1* silenced cells, ERAD activity is comparable to the control cells.

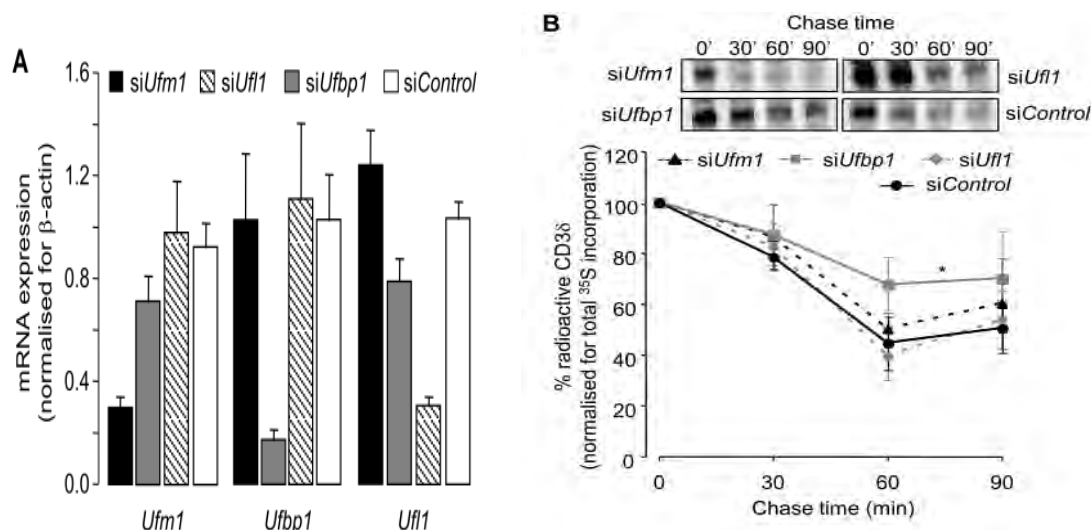


Figure 6. UFBP1 plays a role in ERAD. ERAD activity was analyzed by measuring CD3 degradation in INS1-832/12 cells transfected with siRNA against *Ufm1*, *Ufbp1* and *Ufl1* and 24 hours later with a CD3 δ -HA expression construct, **A** Silencing of *Ufm1* and *Ufbp1* was analyzed via qPCR, **B** The transfected were starved for 1 hour and labeled with 35 S-Met-Cys for 1 hour. After 0, 30, 60 and 90 min chase, cells were lysed and CD3 δ -HA was immunoprecipitated with an HA antibody. After SDS-PAGE (upper panel), CD3 δ was quantified (lower panel) and normalized for total 35 S incorporation. Data are means $\pm$ SEM, n=6, *, p<0.01 with the Z-test on pooled ratios of all time points (siUfbp1 vs siControl).

These data indicate that *Ufm1* and *Ufbp1* expression is upregulated upon ER stress and that UFM1 and UFBP1 play a role in beta cell apoptosis via their conjugation ant that UFBP1 is involved in ERAD.

DISCUSSION

In this study we provide evidence for a role of UFM1 and UFBP1, a target of UFM1, in ERAD in the pancreatic beta cell. Further we also identified a second target of UFM1, namely CDK5RAP3/LZAP.

Eight UFM1 interacting proteins were isolated and identified via affinity purification and mass spectrometry (UFC1, UFBP1, UBA5, CDK5RAP3, HSPA8, BiP, UFL1 and PC). For two of these, UFBP1 and CDK5RAP3, the interaction could be confirmed *in vitro* by GST pull down. Two expected UFM1 interacting proteins were identified, UBA5 and UFC1, since these are the known activating and conjugating enzymes of human UFM1 (3). Surprisingly, each protein was identified in two isolated protein fragments, with different molecular weights. This could be explained by the fact that during denaturation of the protein extracts, the interaction between UFM1 and UBA5 or UFC1 was partially sustained. We also picked up pyruvate carboxylase, but since the STrEP-tag affinity purification is based on streptavidin-biotin binding and pyruvate carboxylase is biotinylated in the cell, this is probably a false positive. Heat shock proteins are also often picked up by affinity purification, mainly as false positives, but since BiP is known to play an important role in the unfolded protein response of protein secreting cells in general (45) and in the beta cell in particular (22,46), it is conceivable that this BiP is a true positive. Against this idea is that GST pull down experiments and co-immunoprecipitations did not confirm the conjugation between UFM1 and BiP, which of course not necessarily means that BiP is not implicated in UFM1 function. However, we did find an interaction between UFBP1 and BiP after co-immunoprecipitation.

In a large scale mapping of human protein-protein interactions by immunoprecipitation and mass spectrometry, Ewing et al. provided evidence for an interaction of CDK5RAP3 with UFM1, UFC1, UFL1 and UFBP1 (47). Since we found an interaction of mouse UFM1 with the same proteins, this suggests that a similar complex exists both in mouse and human. Although we could not confirm the interaction between UFM1 and UFL1 via GST pull downs *in vitro*, these data, together with our finding that UFL1 binds *in vitro* to CDK5RAP3 in a GST pull down, suggest that UFL1 is part of the complex, but that it has no direct interaction with UFM1. Tatsumi et al. suggested that UFL1 is an E3 ligase for UFM1, although it has no structural characteristics of the typical E3 enzymes (6). They found an interaction between UFM1-UFL1, UFL1-UFC1 and UFM1-c20Orf116, using immunoprecipitations. Since under these conditions, also all

other proteins (e.g. CDK5RAP3) are present, it is possible that the interaction between UFM1 and UFL1 is indirect, as shown in our experiments. Another possibility is that under our GST-pull down conditions, the required environment for interaction was not created, although we do see an interaction between UFL1 and CDK5RAP3 under these conditions.

Importantly, in a recent study, Lu et al. identified UFM1 as a potential factor associated with the development of type 2 diabetes (48). UFM1 expression was 1.94 (protein) and 1.53 (mRNA) times higher in MKR mice (Type 2 diabetes model) than in wild type mice. MKR islets also contain more molecular chaperones (GRP78 and GRP94) and proteins involved in ERAD (49). In light of our present data, this increased UFM1 expression may be the result of ER stress in beta cells *in vivo*, and might be part of a protective response.

The proposed direct conjugation between UFBP1 and UFM1 is supported by their co-localization in the ER. Detailed analysis of the protein sequence of UFBP1 revealed the presence of a signal peptide, a nuclear localization signal and a PCI domain (37). Based on the presence of this signal peptide, UFBP1 is predicted to play a role in the secretory pathway (Target P1.1 prediction, (50)). Deletion of the signal peptide did not prevent the binding between UFM1 and UFBP1 *in vitro* but it prevented the ER localization of both UFBP1 and UFM1. Both proteins were mainly localized in the nucleus when the signal peptide was deleted, which could be explained by the presence of a nuclear localization signal in UFBP1. The function of this nuclear localization signal seemed to be overruled by the signal peptide, since the full length protein is localized in the ER.

UFBP1 also contains a PCI domain, an alpha-helical domain of about 200 residues, which is generally localized at the C-terminus of the protein (38). The COP9 signalosome is a conserved eight-subunit complex, which can physically associate with the 26S proteasome, and may function as an alternate lid for the proteasome (51). A PCI domain can serve as a structural scaffold for multi-protein complexes or proteasome regulators. However, deletion of the PCI domain resulted in a stronger interaction between UFM1 and UFBP1, compared to the interaction with the full length UFBP1. Furthermore, UFBP1¹⁻²¹⁹ co-localized even stronger with UFM1 to the ER than UFBP1 did. Therefore, the PCI domain seems to have a limiting role on the interaction and co-localization of UFM1 and UFBP1. These data refute the proposed role of K267, located within the PCI-domain, as the main lysine residue for UFM1-conjugation (6). We also analyzed several conserved lysine residues (K121/K122, K192/K194 and K159) outside the signal peptide and PCI-

domain, but none of these lysine residues seemed to play a role on their own for UFM1 conjugation (results not shown).

Since UFBP1 was predicted to function in the secretory pathway and UFM1 is mainly expressed in secreting cells, we analyzed the effect of *Ufm1* and *Ufbp1* silencing on the glucose stimulated insulin release. However, no clear effect of decreased UFM1 and UFBP1 protein levels on insulin release was observed.

We showed that *Ufm1*, *Ufbp1* and *Ufl1* expression in INS1 cells was increased upon ER stress, induced by chemical ER stressors and by the FFAs palmitate and oleate, fitting with other data (39,40). Silencing of *Ufbp1* resulted in a diminished ERAD. The diminished ERAD had no effect on apoptosis in non-stressed cells, but it enhanced apoptosis in ER-stressed cells. Apoptosis induced by non-ER stressors was not influenced by the knockdown of UFM1 or UFBP1. The discrepancy between the ERAD and apoptosis data in *Ufm1* and *Ufl1* silenced cells is probably due to the fact that during apoptosis experiments, we looked at an accumulative effect of silencing in ER stressed cells. In contrast, we analyzed ERAD in non-ER stressed cells during 1 hour pulse/90 min chase. The fact that *Ufl1* knockdown also enhanced apoptosis, similar to *Ufm1* and *Ufbp1* silenced cells, suggests that it is the conjugation between UFM1 and UFBP1 that is required, rather than the expression of the proteins itself.

CDK5RAP3/LZAP is a putative tumor suppressor, as it was shown to activate the tumor suppressor p53 and to inhibit growth of tumor cell lines *in vitro* (52). Furthermore, CDK5RAP3 promotes apoptosis in response to genotoxic agents (53) and is an inhibitor of NF- κ B (54). Further experiments are necessary to clarify the role of UFM1 and CDK5RAP3 in the cell.

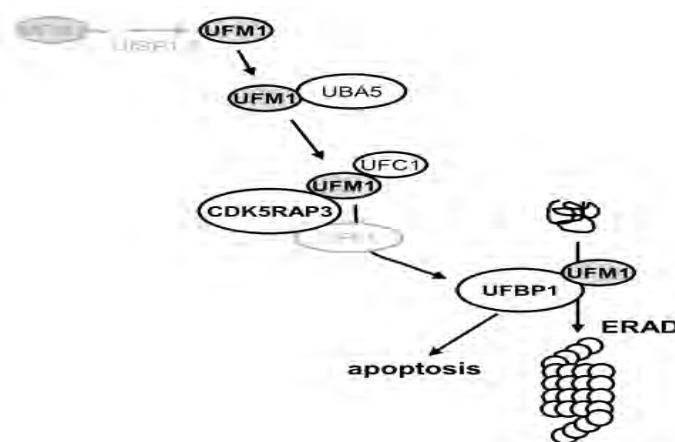


Figure 7. Schematic overview of the interactions of UFM1 and its cellular function. UFM1 is processed by two proteases, UfSP1 and UfSP2 (4). The subsequent interaction with UBA5 (E1)

and UFC1 (E2) (this work, (3) leads to interaction with UFBP1 (this work, (55) and CDK5RAP3 (this work) via UFL1 (E3) (55). We showed that UFL1 interacts indirectly to UFM1 via CDK5RAP3. UFBP1, conjugated to UFM1 in the ER, is involved in ERAD of proteins and in cell survival/apoptosis upon ER stress.

In summary (Figure 7) our study provides evidence for an interaction of activated UFM1 with UFBP1 and CDK5RAP3. Furthermore, after conjugation with UFM1, the ER-resident UFBP1 assists in ERAD and protects ER stressed cells from apoptosis.

FOOTNOTES

We thank Karin Schildermans for mass spectrometry work, Leentje Van Lommel for microarray experiments, Benoit Devogelaere for microscopy work, the Cell Imaging Core of the K.U. Leuven and Mark Fransen for help with the cellular fractionation. This work was supported by a post-doctoral fellowship and a grant from F.W.O.-Vlaanderen to K.L., by research grants IAP6/14, GOA 2004/11 and F.W.O. G.0529.05 to F.S., and by grants from the Juvenile Diabetes Research Foundation (to F.S., H.H. and C.B.N.) and the European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD) – Lilly European Diabetes Research Programme (to M.C.) and by the Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS) - Fonds de la Recherche Scientifique Médicale (FRSM) (M.C.). R.F.M. is the recipient of a fellowship from CAPES (Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel).

REFERENCES

1. Welchman, R. L., Gordon, C., and Mayer, R. J. (2005) *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 599-609
2. Hochstrasser, M. (2000) *Nat Cell Biol* **2**, E153-157
3. Komatsu, M., Chiba, T., Tatsumi, K., Iemura, S., Tanida, I., Okazaki, N., Ueno, T., Kominami, E., Natsume, T., and Tanaka, K. (2004) *Embo J* **23**, 1977-1986
4. Kang, S. H., Kim, G. R., Seong, M., Baek, S. H., Seol, J. H., Bang, O. S., Ovaa, H., Tatsumi, K., Komatsu, M., Tanaka, K., and Chung, C. H. (2007) *J Biol Chem* **282**, 5256-5262
5. Ha, B. H., Ahn, H. C., Kang, S. H., Tanaka, K., Chung, C. H., and Kim, E. E. (2008) *J Biol Chem* **283**, 14893-14900
6. Tatsumi, K., Sou, Y. S., Tada, N., Nakamura, E., Iemura, S., Natsume, T., Kang, S. H., Chung, C. H., Kasahara, M., Kominami, E., Yamamoto, M., Tanaka, K., and Komatsu, M. (2010) *J Biol Chem* **285**, 5417-5427
7. Muoio, D. M., and Newgard, C. B. (2008) *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 193-205
8. Hinke, S. A., Hellemans, K., and Schuit, F. C. (2004) *J Physiol* **558**, 369-380
9. Marsh, B. J., Soden, C., Alarcon, C., Wicksteed, B. L., Yaekura, K., Costin, A. J., Morgan, G. P., and Rhodes, C. J. (2007) *Mol Endocrinol* **21**, 2255-2269
10. Cnop, M., Igoillo-Esteve, M., Cunha, D. A., Ladriere, L., and Eizirik, D. L. (2008) *Biochem Soc Trans* **36**, 909-915
11. Eizirik, D. L., Cardozo, A. K., and Cnop, M. (2008) *Endocr Rev* **29**, 42-61
12. Scheuner, D., and Kaufman, R. J. (2008) *Endocr Rev* **29**, 317-333
13. Ron, D., and Walter, P. (2007) *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 519-529
14. Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., and Ron, D. (2000) *Nat Cell Biol* **2**, 326-332
15. Harding, H. P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999) *Nature* **397**, 271-274
16. Shi, Y., Vattam, K. M., Sood, R., An, J., Liang, J., Stramm, L., and Wek, R. C. (1998) *Mol Cell Biol* **18**, 7499-7509
17. McCracken, A. A., and Brodsky, J. L. (1996) *J Cell Biol* **132**, 291-298
18. Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001) *Cell* **107**, 881-891

19. Tirasophon, W., Welihinda, A. A., and Kaufman, R. J. (1998) *Genes Dev* **12**, 1812-1824
20. Oyadomari, S., Araki, E., and Mori, M. (2002) *Apoptosis* **7**, 335-345
21. Harding, H. P., Zeng, H., Zhang, Y., Jungries, R., Chung, P., Plesken, H., Sabatini, D. D., and Ron, D. (2001) *Mol Cell* **7**, 1153-1163
22. Scheuner, D., Vander Mierde, D., Song, B., Flamez, D., Creemers, J. W., Tsukamoto, K., Ribick, M., Schuit, F. C., and Kaufman, R. J. (2005) *Nat Med* **11**, 757-764
23. Song, B., Scheuner, D., Ron, D., Pennathur, S., and Kaufman, R. J. (2008) *J Clin Invest* **118**, 3378-3389
24. Miyazaki, J., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y., and Yamamura, K. (1990) *Endocrinology* **127**, 126-132
25. Hohmeier, H. E., Mulder, H., Chen, G., Henkel-Rieger, R., Prentki, M., and Newgard, C. B. (2000) *Diabetes* **49**, 424-430
26. Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. A., and Wollheim, C. B. (1992) *Endocrinology* **130**, 167-178
27. Powers, A. C., Efrat, S., Mojsov, S., Spector, D., Habener, J. F., and Hanahan, D. (1990) *Diabetes* **39**, 406-414
28. Cunha, D. A., Hekerman, P., Ladriere, L., Bazarra-Castro, A., Ortis, F., Wakeham, M. C., Moore, F., Rasschaert, J., Cardozo, A. K., Bellomo, E., Overbergh, L., Mathieu, C., Lupi, R., Hai, T., Herchuelz, A., Marchetti, P., Rutter, G. A., Eizirik, D. L., and Cnop, M. (2008) *J Cell Sci* **121**, 2308-2318
29. Cnop, M., Hannaert, J. C., Hoorens, A., Eizirik, D. L., and Pipeleers, D. G. (2001) *Diabetes* **50**, 1771-1777
30. Ronnebaum, S. M., Ilkayeva, O., Burgess, S. C., Joseph, J. W., Lu, D., Stevens, R. D., Becker, T. C., Sherry, A. D., Newgard, C. B., and Jensen, M. V. (2006) *J Biol Chem* **281**, 30593-30602
31. Kharroubi, I., Ladriere, L., Cardozo, A. K., Dogusan, Z., Cnop, M., and Eizirik, D. L. (2004) *Endocrinology* **145**, 5087-5096
32. Cnop, M., Ladriere, L., Hekerman, P., Ortis, F., Cardozo, A. K., Dogusan, Z., Flamez, D., Boyce, M., Yuan, J., and Eizirik, D. L. (2007) *J Biol Chem* **282**, 3989-3997

33. Fang, S., Ferrone, M., Yang, C., Jensen, J. P., Tiwari, S., and Weissman, A. M. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14422-14427
34. Zimmermann, R. (1998) *Biol Chem* **379**, 275-282
35. Fransson, U., Rosengren, A. H., Schuit, F. C., Renstrom, E., and Mulder, H. (2006) *Diabetologia*
36. Schuit, F., De Vos, A., Farfari, S., Moens, K., Pipeleers, D., Brun, T., and Prentki, M. (1997) *J Biol Chem* **272**, 18572-18579
37. Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., and Bairoch, A. (2003) *Nucleic Acids Res* **31**, 3784-3788
38. Hofmann, K., and Bucher, P. (1998) *Trends Biochem Sci* **23**, 204-205
39. Azfer, A., Niu, J., Rogers, L. M., Adamski, F. M., and Kolattukudy, P. E. (2006) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H1411-1420
40. Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D. F., Bell, J. C., Hettmann, T., Leiden, J. M., and Ron, D. (2003) *Mol Cell* **11**, 619-633
41. Karaskov, E., Scott, C., Zhang, L., Teodoro, T., Ravazzola, M., and Volchuk, A. (2006) *Endocrinology* **147**, 3398-3407
42. Laybutt, D. R., Preston, A. M., Akerfeldt, M. C., Kench, J. G., Busch, A. K., Biankin, A. V., and Biden, T. J. (2007) *Diabetologia* **50**, 752-763
43. Klausner, R. D., Lippincott-Schwartz, J., and Bonifacino, J. S. (1990) *Annu Rev Cell Biol* **6**, 403-431
44. Yang, M., Omura, S., Bonifacino, J. S., and Weissman, A. M. (1998) *J Exp Med* **187**, 835-846
45. Ma, Y., and Hendershot, L. M. (2004) *J Chem Neuroanat* **28**, 51-65
46. Yoshida, H. (2007) *Febs J* **274**, 630-658
47. Ewing, R. M., Chu, P., Elisma, F., Li, H., Taylor, P., Climie, S., McBroom-Cerajewski, L., Robinson, M. D., O'Connor, L., Li, M., Taylor, R., Dharsee, M., Ho, Y., Heilbut, A., Moore, L., Zhang, S., Ornatsky, O., Bukhman, Y. V., Ethier, M., Sheng, Y., Vasilescu, J., Abu-Farha, M., Lambert, J. P., Duewel, H. S., Stewart, II, Kuehl, B., Hogue, K., Colwill, K., Gladwish, K., Muskat, B., Kinach, R., Adams, S. L., Moran, M. F., Morin, G. B., Topaloglou, T., and Figeys, D. (2007) *Mol Syst Biol* **3**, 89

48. Lu, H., Yang, Y., Allister, E. M., Wijesekara, N., and Wheeler, M. B. (2008) *Mol Cell Proteomics* **7**, 1434-1451
49. Kincaid, M. M., and Cooper, A. A. (2007) *Antioxidants & Redox Signaling* **9**, 2373-2387
50. Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., and von Heijne, G. (2000) *J Mol Biol* **300**, 1005-1016
51. Huang, X., Hetfeld, B. K., Seifert, U., Kahne, T., Kloetzel, P. M., Naumann, M., Bech-Otschir, D., and Dubiel, W. (2005) *Febs J* **272**, 3909-3917
52. Wang, J., He, X., Luo, Y., and Yarbrough, W. G. (2006) *Biochem J* **393**, 489-501
53. Jiang, H., Luo, S., and Li, H. (2005) *J Biol Chem* **280**, 20651-20659
54. Wang, J., An, H., Mayo, M. W., Baldwin, A. S., and Yarbrough, W. G. (2007) *Cancer Cell* **12**, 239-251
55. Tatsumi, K., Sou, Y. S., Tada, N., Nakamura, E., Iemura, S. I., Natsume, T., Kang, S. H., Chung, C. H., Kasahara, M., Kominami, E., Yamamoto, M., Tanaka, K., and Komatsu, M. (2009) *J Biol Chem*

APÊNDICE II

Causes and cures for endoplasmic reticulum stress in lipotoxic β -cell dysfunction

M. Cnop^{1,2}, L. Ladrière¹, M. Igoillo-Esteve¹, R. F. Moura¹ & D. A. Cunha¹

¹Laboratory of Experimental Medicine, Université Libre de Bruxelles (ULB), Brussels, Belgium

²Division of Endocrinology, Erasmus Hospital, Brussels, Belgium

Pancreatic β -cell dysfunction is central to the pathogenesis of type 2 diabetes, and the loss of functional β -cell mass in type 2 diabetes is at least in part secondary to increased β -cell apoptosis. Accumulating evidence suggests that endoplasmic reticulum (ER) stress is present in β -cells in type 2 diabetes. Free fatty acids (FFAs) cause ER stress and are putative mediators of β -cell dysfunction and death. In this review, we discuss the molecular mechanisms underlying ER stress induced by saturated and unsaturated FFAs. Oleate and palmitate trigger ER stress through ER Ca^{2+} depletion and build-up of unfolded proteins in the secretory pathway. Saturated and unsaturated FFAs elicit a differential signal transduction in the three branches of the ER stress response, resulting in different survival/apoptosis outcomes. The protection of β -cells against FFAs through the interference with ER stress signalling has opened novel therapeutic perspectives for type 2 diabetes. Chemical chaperones, salubrin and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogues have been used to protect β -cells from lipotoxic ER stress. Importantly, the pro- and antiapoptotic effects of these compounds are cell and context dependent.

Keywords: diabetes, endoplasmic reticulum stress, free fatty acids, islets, lipotoxicity, oleate, palmitate, pancreatic β -cells, unfolded protein response

Date submitted 26 March 2010; date of final acceptance 5 May 2010

Lipotoxicity and β -Cell Failure in Type 2 Diabetes

The prevalence of type 2 diabetes is increasing substantially as a result of the rising obesity rates [1]. Obesity is nearly invariably associated with insulin resistance, but diabetes develops only in the presence of insulin deficiency in genetically predisposed individuals who fail to compensate for insulin resistance by increasing insulin secretion [2,3]. Pancreatic β -cell dysfunction is therefore central to the pathogenesis of type 2 diabetes. The loss of functional β -cell mass [4,5] may at least in part be secondary to increased β -cell apoptosis [4,6]. The lifespan of human β -cells is probably very long, as estimated by the accumulation of lipofuscin (age pigment) in >98% of the adult β -cell population [7]. The lipofuscin accumulation also indicates that there is little β -cell neogenesis or replication in adult obesity or type 2 diabetes [7], suggesting that β -cell dysfunction and apoptosis, but not defective β -cell regeneration, are key in type 2 diabetes.

Western diets and obesity are associated with elevated levels of free fatty acids (FFAs), and these are putative mediators of β -cell dysfunction and apoptosis in type 2 diabetes [8–10]. High circulating levels of saturated FFAs are predictive of later development of type 2 diabetes [11–13]. FFAs acutely stimulate insulin secretion, but prolonged pancreatic β -cell exposure

to high FFA levels reduces their glucose responsiveness *in vitro* [14–16] and *in vivo* [17–21]. In addition to β -cell dysfunction, FFAs can induce β -cell death. The saturated FFA palmitate and, to a lesser extent, the unsaturated FFA oleate induce apoptosis in clonal and primary rat β -cells and in human islets [22–26]. FFAs may thus contribute to progressive β -cell dysfunction and loss in type 2 diabetes. The mechanisms causing lipotoxic β -cell loss are not well understood. Over the past years, the endoplasmic reticulum (ER) stress response was identified as a molecular mechanism of lipotoxicity that may play a role in human type 2 diabetes [27].

The ER Stress Response

The signal transduction in the ER stress response or the unfolded protein response (UPR) is briefly reviewed here. We refer the reader for more details to previously published reviews on ER stress [27,28] and to the papers in this issue of *Diabetes, Obesity and Metabolism*. The ER is a highly dynamic organelle with a central role in lipid and protein biosynthesis and Ca^{2+} storage. Accumulation of misfolded proteins in the ER lumen, termed ER stress [27,29], leads to the activation of the ER membrane proteins inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), activating transcription factor 6 (ATF6) and PKR-like kinase (PERK). These ER stress transducers are activated by the dissociation of the ER chaperone immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP) from their luminal side to assist in protein folding, and this leads to intracellular signalling as schematically represented in figure 1.

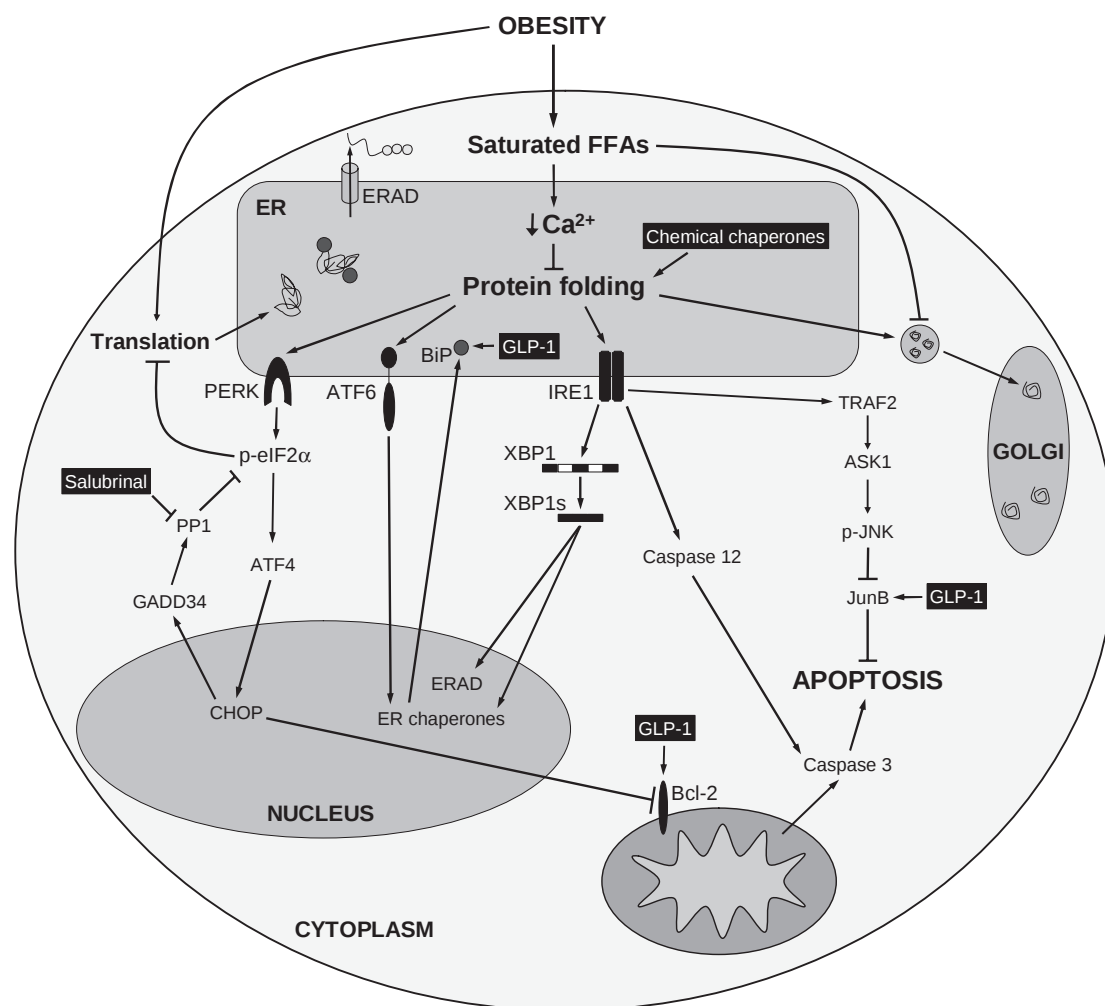


Figure 1. Endoplasmic reticulum (ER) stress signal transduction in pancreatic β -cells induced by saturated free fatty acids (FFAs). The mechanisms by which palmitate elicits ER stress are described in detail in the text. The sites of action of chemical chaperones, salubrinal and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) are indicated (black boxes).

The UPR restores ER homeostasis by decreasing the protein load in the organelle and by increasing the ER folding capacity [30]. When activated, PERK phosphorylates the eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α), attenuating global translation but paradoxically enhancing expression of the transcription factor ATF4. ATF4 induces C/EBP homologous protein (CHOP) and downstream GADD34. The translational inhibition in the ER stress response is transitory, as GADD34 acts as a non-enzymatic co-factor to protein phosphatase 1 (PP1), leading to eIF2 α dephosphorylation [31,32]. ATF6 translocates to the Golgi where it is cleaved to its active form, which induces transcription of ER chaperones such as BiP [33,34]. IRE1 splices X-box binding protein 1 (XBP1) mRNA, leading to translation of the active transcription factor XBP1s that induces ER chaperones and ER-associated protein degradation [35]. In addition, XBP1s promotes phospholipid biosynthesis, leading to ER membrane expansion. IRE1 also contributes to mRNA degradation, which may relieve the functional load placed on the ER [36,37], and recruits tumour necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2)

and ASK1, which activates c-Jun N-terminal kinase (JNK) [38]. In case the response fails to restore ER homeostasis, prolonged activation of the PERK and IRE1 branches triggers proapoptotic pathways. These include CHOP and JNK activation, inhibition of Bcl-2 and activation of caspase 12 [27] and death protein 5 (DP5) [39].

Pancreatic β -cells have a heavy engagement in insulin synthesis (>50% of total protein synthesis) and express high levels of the ER stress transducers IRE1 and PERK. These signal transducers regulate protein synthesis physiologically and balance it with ER folding capacity. Acute exposure to high glucose concentrations causes mild UPR signalling. Signalling in the PERK branch is kept in check by activation of PP1 that dephosphorylates eIF2 α , while in the IRE1 branch the formation of a ternary complex of IRE1, RACK1 and PP2A attenuates IRE1 phosphorylation and activation [40]. Restraining the UPR allows proinsulin biosynthesis to continue, but these mechanisms are overridden in the case of chronic or severe ER stress. Under severe ER stress, insulin synthesis will stall, and – another downside of the well-developed ER stress

response machinery – β -cells will activate the apoptotic cell death program [27,40].

ER Stress in Type 2 Diabetes

Accumulating evidence suggests that ER stress is present in β -cells in type 2 diabetes. The increased expression of ER stress markers in β -cells in pancreatic sections from type 2 diabetic patients provides direct evidence for the activation of the ER stress response [41]. Increased expression of ATF3, downstream of eIF2 α -ATF4 [42,43], and CHOP [44] was shown in β -cells from type 2 diabetic patients. Expansion of the ER, a hallmark of the ER stress response, was detected in β -cells from type 2 diabetic patients by electron microscopy [6]. Islets from type 2 diabetic organ donors were more susceptible to ER stress induced by metabolic perturbations such as high glucose [6].

ER stress was also proposed as a mechanism linking high fat diet-induced obesity with insulin resistance in mouse liver and fat [45,46]. Increased expression of ER stress markers was detected in fat and liver tissues from obese individuals [47–49]. This cellular stress response may thus be a common mechanism for the two main defects observed in type 2 diabetes, that is insulin resistance and β -cell loss [27]. Saturated FFAs cause liver ER stress *in vivo* in rodents and *in vitro* in hepatocytes [50] and adipocytes [51], but whether these FFAs contribute to induce ER stress in human tissues in type 2 diabetes remains to be examined.

Mechanisms of Lipotoxic ER Stress in β -Cells

Quantitative and Qualitative Differences in ER Stress Signalling Induced by Saturated and Unsaturated FFAs

We showed that FFAs trigger ER stress, and suggested that this cellular response might play a role in lipotoxic β -cell apoptosis [25]. It was subsequently shown that saturated and unsaturated FFAs elicit quantitatively and qualitatively different ER stress signalling. Palmitate is more potent than oleate in triggering ER stress in clonal [24,41,52–55] and primary rodent β -cells [24] and in human islets [24,56]. Detailed time-course studies [24] showed that the PERK branch is strongly activated by palmitate, and much less by oleate or the non-toxic equimolar combination of oleate and palmitate. The IRE1 pathway is also preferentially activated by palmitate. In contrast, all FFAs activate the ATF6 branch to a similar extent [24]. The marked PERK activation and eIF2 α phosphorylation by palmitate is reflected in increased ATF4–CHOP expression [24,52], but it also results in greater inhibition of protein translation [52]. For most FFA experiments, palmitate and oleate have been used, as these are the most common FFAs in man, but a similar differential ER stress signalling is seen with other members of the saturated and unsaturated long chain fatty acids in β [54] and other cells. *In vivo*, β -cells are exposed to both saturated and unsaturated FFAs, with the circulating and cellular FFA composition being a reflection of the dietary FFA content. The ER stress response and proapoptotic signalling elicited by this FFA mixture are expected to be milder, but a predominant intake of saturated

FFAs may cause β -cell dysfunction and apoptosis *in vivo*, as occurs in the extreme *in vitro* condition of cellular exposure to palmitate alone [57]. Interestingly, overexpression of stearoyl coenzyme A (CoA) desaturase attenuates palmitate-induced ER stress in human embryonic kidney (HEK) cells [58]. This enzyme, involved in the conversion of saturated to monounsaturated FFAs, was previously shown to protect clonal β -cells from lipopoptosis [59]. The effect of the desaturase on ER stress in β -cells has not been examined; based on the previously mentioned data, it would be expected to more selectively attenuate PERK signalling.

Triggering of ER Stress by Saturated and Unsaturated FFAs

Saturated and, to a lesser extent, unsaturated FFAs trigger ER stress in β -cells through changes in ER Ca²⁺ handling [24,60]. Using Fura-2 and ER-targeted aequorin assays, depletion in ER Ca²⁺ and slowed ER Ca²⁺ uptake were detected [24]. This mechanism resembles that of the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) pump inhibitors cyclopiazonic acid (CPA) and thapsigargin [61], two commonly used synthetic ER stressors. Expression of an ER-targeted chameleon probe with Ca²⁺-responsive elements in MIN6 cells allowed to directly measure ER Ca²⁺ depletion by palmitate [60]. Because protein folding is a Ca²⁺-dependent process, the Ca²⁺ depletion is thought to cause secondary misfolding. Increased binding of unfolded proteins to BiP is indeed observed in INS-1E cells exposed to palmitate and thapsigargin, and much less so with oleate or the combination of oleate and palmitate (D. A. Cunha and M. Cnop, unpublished observations). In addition to depleting ER Ca²⁺, palmitate (but not oleate) hampers ER-to-Golgi protein trafficking [62], contributing to the ER stress response through the build-up of protein in the ER in a similar manner as the synthetic ER stressor brefeldin A. Both the changes in SERCA pump activity and the altered ER-to-Golgi trafficking may be the result of changes in the triglyceride composition of the ER membrane following saturated FFA exposure. Proteomic studies also identified a role for carboxypeptidase E in the induction of ER stress by palmitate [63]. Palmitate induces a rapid degradation of carboxypeptidase E, an enzyme involved in insulin processing, and this contributes to cause ER stress possibly because of an accumulation of unprocessed proinsulin in the secretory pathway [63]. One last factor amplifying lipotoxic β -cell ER stress may be the increased demand for insulin synthesis in the context of insulin resistance. Increased demand alone is probably not sufficient to trigger ER stress, as suggested by observations that high glucose concentrations do not induce ER stress in primary rat β -cells and human islets [24]. The susceptibility of β -cells to ER stress may be regulated by β -cell-specific genes. For instance, Pdx1 has been shown to bind to the ATF4 and WFS1 promoters, regulate additional genes involved in ER function, and thereby mediate β -cell adaptation to high-fat feeding in mice [64].

Pro- and Antiapoptotic ER Stress Signals

The contribution of ER stress in lipotoxic β -cell apoptosis has been examined by RNA interference (RNAi) strategies.

Using RNAi to modulate signalling in the different branches of the ER stress response, we showed that palmitate induces β -cell apoptosis via induction of the PERK-dependent [65] proapoptotic transcription factor CHOP [24,53]. In contrast, XBP1 RNAi potentiated oleate- but not palmitate-induced apoptosis [53], suggesting that FFAs differentially activate pro- and antiapoptotic signals downstream of IRE1. The knockdown of the ATF6-dependent ER chaperone BiP sensitized β -cells to both FFAs (see below) [53]. The protection of pancreatic β -cells through the interference with ER stress signalling also opened therapeutic perspectives, and the attempts that have been made so far to pharmacologically protect β -cells from lipotoxic ER stress are discussed below.

Pharmacologic Approaches to Protecting β -Cells from ER Stress

The pharmacologic modulation of the β -cell ER stress response may potentially represent a new therapeutic approach in type 2 diabetes.

Chemical Chaperones

Modulation of expression of the ER chaperone BiP has been used to protect β -cells from lipotoxic ER stress. BiP overexpression protected against palmitate [41] (D. A. Cunha et al., unpublished observations) and, conversely, its knockdown sensitized cells to FFAs [53]. Another study, however, reported no role for BiP [66]. In this context, the use of exogenous chemical chaperones might represent an interesting protective strategy. Chemical chaperones are low molecular weight osmolytes that stabilize proteins and improve protein folding (figure 1). The chemical chaperones phenyl butyric acid (PBA) and taurine-conjugated ursodeoxycholic acid (TUDCA) have been used to decrease ER stress and improve insulin sensitivity in mice *in vivo* and in adipocytes and hepatocytes *in vitro* [67]. PBA and trimethylamine *N*-oxide (TMAO) also reduced ER stress and clonal β -cell apoptosis induced by a short-term (6 h) palmitate exposure [68], and PBA improved glucose-stimulated insulin secretion [69]. In our hands, a longer treatment (1–3 days) with PBA and TMAO induced apoptosis in clonal INS-1E cells in a concentration-dependent manner (figure 2A). In combination with palmitate or the synthetic ER stressor CPA, neither PBA

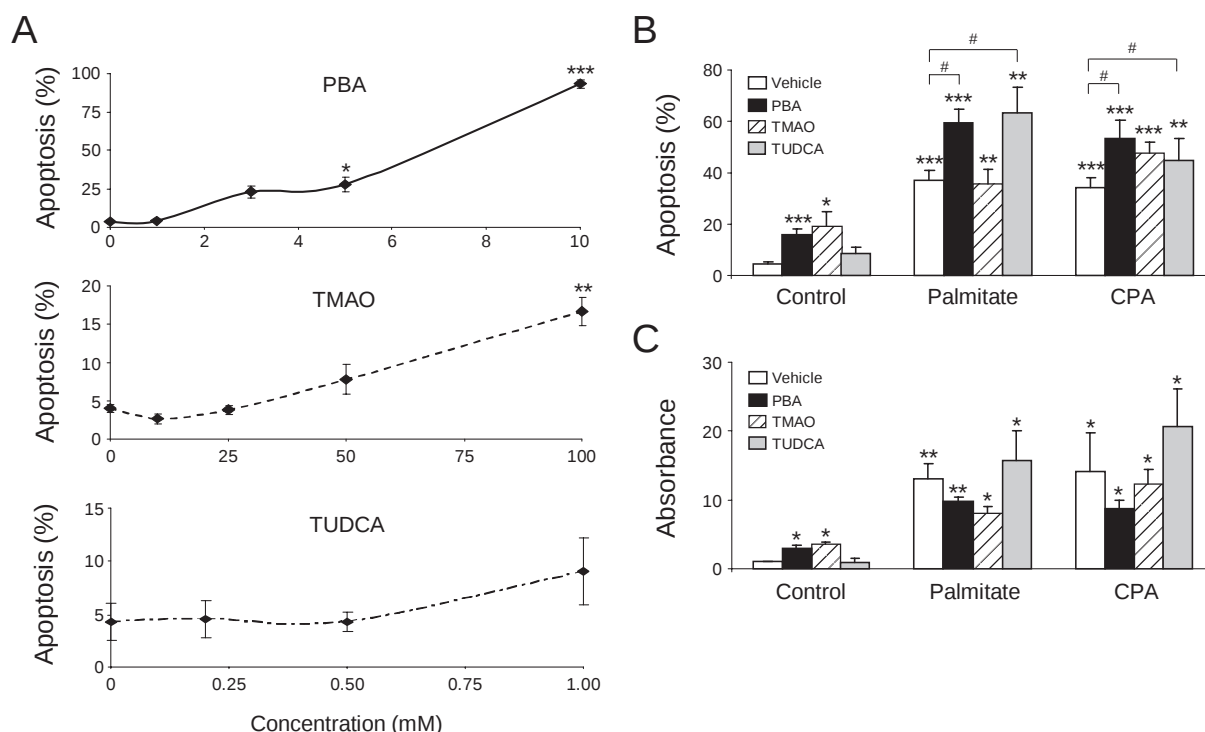


Figure 2. Chemical chaperones do not protect pancreatic β -cells from endoplasmic reticulum (ER) stress-induced apoptosis. (A) INS-1E cells were treated for 72 h with the indicated concentrations of phenyl butyric acid (PBA) (Calbiochem, San Diego, CA, USA; upper panel), trimethylamine *N*-oxide (TMAO) (Fluka, Bucks, Switzerland; middle panel) or taurine-conjugated ursodeoxycholic acid (TUDCA) (Calbiochem; lower panel) in RPMI-1640 medium containing 5% fetal bovine serum (FBS). Apoptosis (expressed as % of total cells) was detected by fluorescence microscopy following staining with Hoechst 33342 (10 μ g/ml) and propidium iodide (5 μ g/ml) [25]. Data are means $\pm$ s.e.m. of two to nine independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 against untreated cells by paired two-sided Student's *t*-test. (B, C) INS-1E cells were pretreated for 24 h with 2.5 mM PBA, 100 mM TMAO, 1 mM TUDCA or vehicle [dimethyl sulphoxide (DMSO)] in RPMI-1640 medium containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 1% FBS. Cells were then exposed for 24 h to 0.5 mM palmitate (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany; in the presence of 1% BSA) [22] or 25 μ M cyclopiazonic acid (CPA; Sigma) [24] in the continued presence or absence of PBA, TMAO or TUDCA. Apoptosis was measured by fluorescence microscopy following staining with Hoechst 33342 and propidium iodide (B) or by detection of DNA strand breaks using the Cell Death Detection ELISaplus kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; absorbance data expressed as fold increase over control) [53] (C). Data are means $\pm$ s.e.m. of 3–13 independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 against untreated cells; # p < 0.05 as indicated by ANOVA followed by paired two-sided Student's *t*-test.

nor TMAO nor TUDCA protected INS-1E cells from ER stress (figure 2B, C). These data suggest that the chemical chaperones, chronically used at pharmacological (mM) concentrations, may be ineffective or even potentially deleterious in β -cells. Hopefully better and more specific chemical chaperones will be developed in the coming years.

Salubrinal

In search for novel therapeutic agents that protect cells from ER stress, salubrinal was identified in a large-scale chemical screening [70]. By virtue of its cytoprotective effects, this selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation (figure 1) was proposed as a novel therapy for diabetes. In rodent β -cells, however, salubrinal-induced eIF2 α phosphorylation unexpectedly potentiated the deleterious effects of FFAs [52]. Furthermore, in the presence of salubrinal the non-toxic equimolar mixture of oleate and palmitate became highly proapoptotic [52], underscoring that signal transduction downstream of eIF2 α phosphorylation mediates lipotoxic β -cell death. eIF2 α phosphorylation also potentiated lipotoxicity in human islets [56]. The sensitization of human β -cells to lipotoxic ER stress occurred via enhanced signalling downstream of eIF2 α and probably involves the mitochondrial pathway of apoptosis [56]. In conclusion, salubrinal is mostly proapoptotic in β -cells, and it seems unlikely that agents that enforce eIF2 α phosphorylation will be used for β -cell protection in type 2 diabetes.

GLP-1 Analogues

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and its analogues are a novel class of diabetes drugs with multiple effects, including stimulation of insulin secretion and prevention of β -cell apoptosis [71–73]. GLP-1 receptor activation by exendin-4 and the adenylate cyclase inhibitor forskolin were shown to improve the survival of β -cells exposed to chemically induced ER stress [74], and this occurred in parallel to increased ATF4–CHOP expression [74]. It should be noted here that the increase in these ER stress markers seen *in vitro* [53,74] is not observed in *in vivo* studies, where exendin-4 therapy decreases rodent islet expression of CHOP and other ER stress markers [74–76], a discrepancy that may be related to temporal changes (i.e. acute vs. chronic effects).

We confirmed previous observations that exendin-4 protects β -cells from FFAs and synthetic ER stressors [74,77], and searched for the mechanisms by which GLP-1 protects β -cells against lipotoxic ER stress. Interestingly, GLP-1 analogues also prevented β -cell death induced by salubrinal, the chemical enhancer of the PERK–eIF2 α pathway that acts downstream of ER stress [52]. We did not, however, confirm a role for enhanced ATF4–CHOP signalling in exendin-induced protection against ER stress, as suggested by Yusta et al. [74]. Instead, exendin-4 and forskolin protected β -cells against ER stress in a context-dependent manner [53]. Thus, lipotoxic β -cell apoptosis was prevented by increasing cellular defence mechanisms through the induction of the ER chaperone BiP and the antiapoptotic protein JunB [53]. The mechanism of protection from lipotoxic ER stress differed from that of protection against CPA, which occurred through inactivation

of caspase 12 and upregulation of Bcl-2 and XIAP to block mitochondrial apoptosis (figure 1). The identification of the proapoptotic ER stress pathways and downstream signalling modulated by GLP-1 may lay out the basis for the development of targeted approaches to alleviate β -cell ER stress in diabetes.

Prospects for Therapy and Conclusions

β -Cell loss due to apoptosis contributes to the development of type 2 diabetes and to the progressive deterioration of metabolic control observed in type 2 diabetic patients. Increasing evidence suggests that adipocyte-derived mediators, such as FFAs, are key contributors to trigger the apoptotic program in β -cells; these deleterious effects of FFAs are in part mediated by the ER stress response. This discovery has broadened our understanding of the effects of obesity and nutrients in the pathogenesis of type 2 diabetes, given that this same cellular stress process contributes to the development of insulin resistance. Therapies that increase β -cell resistance to lipotoxic ER stress could have considerable impact, as they might prevent type 2 diabetes or attenuate the progression of the disease. Based on our present knowledge, ideal ER stress modulator drugs would need to increase translation of BiP and other ER chaperones in β -cells, lower JNK activity and enhance JunB expression, and diminish eIF2 α phosphorylation in the PERK branch, thereby facilitating translational recovery and toning down ATF4–CHOP signalling. The development of such agents may not be an easy task, as the drug would have to specifically modulate the different branches of the UPR, and in parallel respect the physiological regulation of proinsulin biosynthesis, folding and export. While drug discovery targeting ER stress is in its infancy, the prevention of β -cell apoptosis by enhancing β -cell resistance to ER stress holds promise as a potential new therapeutic class of type 2 diabetes.

Acknowledgements

We thank Décio L. Eizirik for helpful discussions and thoughtful comments on the manuscript. The experimental work reviewed herein is supported by the European Union (Project CEED3 in the Framework Program 7 of the European Community), a European Foundation for the Study of Diabetes EFSD/Lilly grant, and the FNRS (Fonds National de la Recherche Scientifique) and FRSM (Fonds de la Recherche Scientifique Médicale), Belgium (to M. C.). R. F. M. is the recipient of a fellowship from CAPES (Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel).

Conflict of Interests

The authors do not declare any conflict of interest relevant to the manuscript.

References

1. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; **414**: 782–787.
2. Florez JC. Newly identified loci highlight beta cell dysfunction as a key cause of type 2 diabetes: where are the insulin resistance genes? *Diabetologia* 2008; **51**: 1100–1110.

3. Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and β -cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2003; **46**: 3–19.
4. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. β -Cell deficit and increased β -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; **52**: 102–110.
5. Rahier J, Guiot Y, Goebbels RM, Sempoux C, Henquin JC. Pancreatic β -cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2008; **10**(Suppl. 4): 32–42.
6. Marchetti P, Bugliani M, Lupi R et al. The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients. *Diabetologia* 2007; **50**: 2486–2494.
7. Cnop M, Hughes SJ, Igoillo-Estève M et al. The long lifespan and low turnover of human islet beta cells estimated by mathematical modelling of lipofuscin accumulation. *Diabetologia* 2010; **53**: 321–330.
8. Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jörns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic β -cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 2005; **54**(Suppl. 2): S97–S107.
9. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006; **444**: 840–846.
10. Prentki M, Nolan CJ. Islet β cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2006; **116**: 1802–1812.
11. Pankow JS, Duncan BB, Schmidt MI et al. Fasting plasma free fatty acids and risk of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes Care* 2004; **27**: 77–82.
12. Paolisso G, Tataranni PA, Foley JE, Bogardus C, Howard BV, Ravussin E. A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia* 1995; **38**: 1213–1217.
13. Wang L, Folsom AR, Zheng ZJ, Pankow JS, Eckfeldt JH. Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Am J Clin Nutr* 2003; **78**: 91–98.
14. Bollheimer LC, Skelly RH, Chester MW, McGarry JD, Rhodes CJ. Chronic exposure to free fatty acid reduces pancreatic β -cell insulin content by increasing basal insulin secretion that is not compensated for by a corresponding increase in proinsulin biosynthesis translation. *J Clin Invest* 1998; **101**: 1094–1101.
15. Zhou YP, Grill V. Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits B-cell functions in human pancreatic islets of Langerhans. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; **80**: 1584–1590.
16. Zhou YP, Grill VE. Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J Clin Invest* 1994; **93**: 870–876.
17. Carpentier A, Mittelman SD, Bergman RN, Giacca A, Lewis GF. Prolonged elevation of plasma free fatty acids impairs pancreatic β -cell function in obese nondiabetic humans but not in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 2000; **49**: 399–408.
18. Carpentier A, Mittelman SD, Lamarche B, Bergman RN, Giacca A, Lewis GF. Acute enhancement of insulin secretion by FFA in humans is lost with prolonged FFA elevation. *Am J Physiol* 1999; **276**: E1055–E1066.
19. Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A et al. A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; **52**: 2461–2474.
20. Paolisso G, Gambardella A, Amato L et al. Opposite effects of short- and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects. *Diabetologia* 1995; **38**: 1295–1299.
21. Sako Y, Grill VE. A 48-hour lipid infusion in the rat time-dependently inhibits glucose-induced insulin secretion and β -cell oxidation through a process likely coupled to fatty acid oxidation. *Endocrinology* 1990; **127**: 1580–1589.
22. Cnop M, Hannaert JC, Hoorens A, Eizirik DL, Pipeleers DG. Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes* 2001; **50**: 1771–1777.
23. Cnop M, Hannaert JC, Pipeleers DG. Troglitazone does not protect rat pancreatic β -cells against free fatty acid-induced cytotoxicity. *Biochem Pharmacol* 2002; **63**: 1281–1285.
24. Cunha DA, Hekerman P, Ladrière L et al. Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic β -cells. *J Cell Sci* 2008; **121**: 2308–2318.
25. Kharroubi I, Ladrière L, Cardozo AK, Dogusan Z, Cnop M, Eizirik DL. Free fatty acids and cytokines induce pancreatic β -cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor- κ B and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology* 2004; **145**: 5087–5096.
26. Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on β -cell turnover and function. *Diabetes* 2001; **50**: 69–76.
27. Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev* 2008; **29**: 42–61.
28. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 519–529.
29. Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev* 2006; **86**: 1133–1149.
30. Harding HP, Novoa I, Zhang Y et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 2000; **6**: 1099–1108.
31. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 2004; **18**: 3066–3077.
32. Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α . *J Cell Biol* 2001; **153**: 1011–1022.
33. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 1999; **10**: 3787–3799.
34. Yamamoto K, Sato T, Matsui T et al. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 α and XBP1. *Dev Cell* 2007; **13**: 365–376.
35. Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 7448–7459.
36. Hollien J, Weissman JS. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* 2006; **313**: 104–107.
37. Pirot P, Naamane N, Libert F et al. Global profiling of genes modified by endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta cells reveals the early degradation of insulin mRNAs. *Diabetologia* 2007; **50**: 1006–1014.
38. Urano F, Wang X, Bertolotti A et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 2000; **287**: 664–666.
39. Gurzov EN, Ortis F, Cunha DA et al. Signaling by IL-1 α +IFN- β and ER stress converge on DP5/Hrk activation: a novel mechanism for pancreatic β -cell apoptosis. *Cell Death Differ* 2009; **16**: 1539–1550.
40. Eizirik DL, Cnop M. ER stress in pancreatic β cells: the thin red line between adaptation and failure. *Sci Signal* 2010; **3**: pe7.
41. Laybutt DR, Preston AM, Akerfeldt MC et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007; **50**: 752–763.
42. Hartman MG, Lu D, Kim ML et al. Role for activating transcription factor 3 in stress-induced β -cell apoptosis. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 5721–5732.

43. Jiang HY, Wek SA, McGrath BC et al. Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 1365–1377.
44. Huang CJ, Lin CY, Haataja L et al. High expression rates of human islet amyloid polypeptide induce endoplasmic reticulum stress mediated β -cell apoptosis, a characteristic of humans with type 2 but not type 1 diabetes. *Diabetes* 2007; **56**: 2016–2027.
45. Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem* 2005; **280**: 847–851.
46. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004; **306**: 457–461.
47. Boden G, Duan X, Homko C et al. Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes* 2008; **57**: 2438–2444.
48. Gregor MF, Yang L, Fabbrini E et al. Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes* 2009; **58**: 693–700.
49. Sharma NK, Das SK, Mondal AK et al. Endoplasmic reticulum stress markers are associated with obesity in nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; **93**: 4532–4541.
50. Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology* 2006; **147**: 943–951.
51. Guo W, Wong S, Xie W, Lei T, Luo Z. Palmitate modulates intracellular signaling, induces endoplasmic reticulum stress, and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; **293**: E576–E586.
52. Cnop M, Ladrère L, Hekerman P et al. Selective inhibition of eukaryotic translation initiation factor 2 α dephosphorylation potentiates fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress and causes pancreatic β -cell dysfunction and apoptosis. *J Biol Chem* 2007; **282**: 3989–3997.
53. Cunha DA, Ladrère L, Ortis F et al. Glucagon-like peptide-1 agonists protect pancreatic β -cells from lipotoxic endoplasmic reticulum stress through upregulation of BiP and JunB. *Diabetes* 2009; **58**: 2851–2862.
54. Diakogiannaki E, Welters HJ, Morgan NG. Differential regulation of the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic β -cells exposed to long-chain saturated and monounsaturated fatty acids. *J Endocrinol* 2008; **197**: 553–563.
55. Karaskov E, Scott C, Zhang L, Teodoro T, Ravazzola M, Volchuk A. Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic β -cell apoptosis. *Endocrinology* 2006; **147**: 3398–3407.
56. Ladrère L, Igoillo-Esteve M, Cunha DA et al. Enhanced signaling downstream of ribonucleic acid-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase potentiates lipotoxic endoplasmic reticulum stress in human islets. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; **95**: 1442–1449.
57. Cnop M. Fatty acids and glucolipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Biochem Soc Trans* 2008; **36**: 348–352.
58. Peter A, Weigert C, Staiger H et al. Individual stearyl-coa desaturase 1 expression modulates endoplasmic reticulum stress and inflammation in human myotubes and is associated with skeletal muscle lipid storage and insulin sensitivity in vivo. *Diabetes* 2009; **58**: 1757–1765.
59. Busch AK, Gurisik E, Cordery DV et al. Increased fatty acid desaturation and enhanced expression of stearyl coenzyme A desaturase protects pancreatic β -cells from lipoapoptosis. *Diabetes* 2005; **54**: 2917–2924.
60. Gwiazda KS, Yang TL, Lin Y, Johnson JD. Effects of palmitate on ER and cytosolic Ca^{2+} homeostasis in β -cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; **296**: E690–E701.
61. Luciani DS, Gwiazda KS, Yang TL et al. Roles of IP $_3$ R and RyR Ca^{2+} channels in endoplasmic reticulum stress and β -cell death. *Diabetes* 2009; **58**: 422–432.
62. Preston AM, Gurisik E, Bartley C, Laybutt DR, Biden TJ. Reduced endoplasmic reticulum-to-Golgi protein trafficking contributes to ER stress in lipotoxic mouse beta cells by promoting protein overload. *Diabetologia* 2009; **52**: 2369–2373.
63. Jeffrey KD, Alejandro EU, Luciani DS et al. Carboxypeptidase E mediates palmitate-induced β -cell ER stress and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 8452–8457.
64. Sachdeva MM, Claiborn KC, Khoo C et al. Pdx1 (MODY4) regulates pancreatic β cell susceptibility to ER stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 19090–19095.
65. Pirot P, Ortis F, Cnop M et al. Transcriptional regulation of the endoplasmic reticulum stress gene chop in pancreatic insulin-producing cells. *Diabetes* 2007; **56**: 1069–1077.
66. Lai E, Bikopoulos G, Wheeler MB, Rozakis-Adcock M, Volchuk A. Differential activation of ER stress and apoptosis in response to chronically elevated free fatty acids in pancreatic β -cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; **294**: E540–E550.
67. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 2006; **313**: 1137–1140.
68. Akerfeldt MC, Howes J, Chan JY et al. Cytokine-induced β -cell death is independent of endoplasmic reticulum stress signaling. *Diabetes* 2008; **57**: 3034–3044.
69. Choi SE, Lee YJ, Jang HJ et al. A chemical chaperone 4-PBA ameliorates palmitate-induced inhibition of glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). *Arch Biochem Biophys* 2008; **475**: 109–114.
70. Boyce M, Bryant KF, Jousse C et al. A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 2005; **307**: 935–939.
71. Chia CW, Egan JM. Incretin-based therapies in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; **93**: 3703–3716.
72. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* 2007; **87**: 1409–1439.
73. Salehi M, Aulinger BA, D'Alessio DA. Targeting β -cell mass in type 2 diabetes: promise and limitations of new drugs based on incretins. *Endocr Rev* 2008; **29**: 367–379.
74. Yusta B, Baggio LL, Estall JL et al. GLP-1 receptor activation improves β cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab* 2006; **4**: 391–406.
75. Kwon DY, Kim YS, Ahn IS et al. Exendin-4 potentiates insulinotropic action partly via increasing β -cell proliferation and neogenesis and decreasing apoptosis in association with the attenuation of endoplasmic reticulum stress in islets of diabetic rats. *J Pharmacol Sci* 2009; **111**: 361–371.
76. Tsunekawa S, Yamamoto N, Tsukamoto K et al. Protection of pancreatic β -cells by exendin-4 may involve the reduction of endoplasmic reticulum stress; in vivo and in vitro studies. *J Endocrinol* 2007; **193**: 65–74.
77. Buteau J, El-Asaad W, Rhodes CJ, Rosenberg L, Joly E, Prentki M. Glucagon-like peptide-1 prevents β cell glucolipotoxicity. *Diabetologia* 2004; **47**: 806–815.

APÊNDICE III

Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols

Rodrigo Ferreira de Moura¹, Carla Ribeiro¹, Juliana Aparecida de Oliveira², Eliane Stevanato² and Maria Alice Rostom de Mello^{1*}

¹Physical Education Department, São Paulo State University (UNESP), Avenida 24-A, 1515 Bela Vista, 13506-900 Rio Claro, SP, Brazil

²Physical Education Department, University of Taubaté (UNITAU), Rua Terras de Cambra 27, 04383-145 São Paulo, SP, Brazil

(Received 7 January 2008 – Revised 17 July 2008 – Accepted 18 July 2008 – First published online 14 November 2008)

In search of an adequate model for the human metabolic syndrome, the metabolic characteristics of Wistar rats were analysed after being submitted to different protocols of high fructose ingestion. First, two adult rat groups (aged 90 d) were studied: a control group (C1; *n* 6) received regular rodent chow (Labina, Purina) and a fructose group (F1; *n* 6) was fed on regular rodent chow. Fructose was administered as a 10 % solution in drinking water. Second, two adult rat groups (aged 90 d) were evaluated: a control group (C2; *n* 6) was fed on a balanced diet (AIN-93G) and a fructose group (F2; *n* 6) was fed on a purified 60 % fructose diet. Finally, two young rat groups (aged 28 d) were analysed: a control group (C3; *n* 6) was fed on the AIN-93G diet and a fructose group (F3; *n* 6) was fed on a 60 % fructose diet. After 4–8 weeks, the animals were evaluated. Glucose tolerance, peripheral insulin sensitivity, blood lipid profile and body fat were analysed. In the fructose groups F2 and F3 glucose tolerance and insulin sensitivity were lower, while triacylglycerolaemia was higher than the respective controls C2 and C3 ($P < 0.05$). Blood total cholesterol, HDL and LDL as well as body fat showed change only in the second protocol. In conclusion, high fructose intake is more effective at producing the signs of the metabolic syndrome in adult than in young Wistar rats. Additionally, diet seems to be a more effective way of fructose administration than drinking water.

Fructose: Metabolic syndrome: Insulin sensitivity: Body fat

Clinically, the metabolic syndrome involves a cluster of disturbances in which glucose intolerance represents an important symptom. Metabolic syndrome diagnosis implies in positive results to at least three metabolic alterations including insulin resistance, hypertension, obesity, endothelial dysfunction and blood lipid profile alterations^(1,2). These multiple risk factors accelerate the incidence of CVD in a cooperative way^(1–4).

Obesity prevalence has quadrupled in the past 25 years in the USA; 16 % of children and 30 % of adults are now affected and many of these obese individuals suffer from the metabolic syndrome⁽⁵⁾. Projections estimate that, in the year 2010, there will exist 50–75 million individuals with manifestation of this syndrome in this country alone⁽⁶⁾.

The increased fructose consumption in contemporaneous Western society has been associated with the high prevalence of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)⁽⁷⁾, obesity, type 2 diabetes and metabolic syndrome so far^(8,9). In fact, laboratory animals fed on fructose-rich diets show glucose intolerance, insulin resistance, hyperinsulinaemia and dyslipidaemia⁽¹⁰⁾. A high flux of fructose to the liver perturbs glucose metabolism and glucose uptake pathways, and leads to a significantly enhanced rate of lipogenesis and TAG synthesis, driven by the

high flux of glycerol and acyl portions of TAG molecules from fructose catabolism^(11–13). These metabolic disturbances maybe underlie the induction of insulin resistance, commonly observed with high fructose feeding in both human subjects and animal models⁽¹⁴⁾. Since fructose-fed rats reveal signs of the metabolic syndrome, they are used as an experimental model of the human condition⁽¹⁵⁾.

The metabolic alterations observed in fructose-fed rats are quite divergent among the studies, probably due to study design. Differences between studies include: the strain of rat used, such as Wistar^(16,17) and Sprague–Dawley^(18,19); the amount and route of fructose administration – diet (60 %)^(16,19), oral administration (8 g/kg)⁽¹⁷⁾ or drinking water (10 %)⁽¹⁹⁾; the age of the animals at the beginning of the experiment – young^(16,17) or adults⁽¹⁹⁾. Also, the period of fructose administration applied has been non-standard: from 4⁽¹⁷⁾, 6⁽¹⁸⁾ or 8 weeks⁽¹⁹⁾ or during several months⁽¹⁸⁾. Natural variation of the control diet is another potential problem of animal studies. It can be a particular problem with non-purified diets, but the use of synthetic diets is largely described in the literature⁽²⁰⁾. Therefore, different experimental designs for fructose administration in rats induce variable degrees of physiological responses.

Abbreviations: C1, experiment 1 control group; C2, experiment 2 control group; C3, experiment 3 control group; F1, experiment 1 fructose group; F2, experiment 2 fructose group; F3, experiment 3 fructose group; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease.

*Corresponding author: Dr Maria Alice Rostom de Mello, fax +55 19 3526 4320, email mellomar@rc.unesp.br

In the search of an adequate experimental model to simulate the human metabolic syndrome, the present study was designed to analyse the metabolic characteristics of Wistar rats submitted to high fructose ingestion by different protocols.

Methods

Animal care and experimental design

Male Wistar rats were obtained from the São Paulo State University (UNESP Central Bioterium, Botucatu Campus, SP, Brazil). The rats were kept in a room with the temperature set to $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and with a photoperiod of 12 h–12 h at the Physical Education Department Biodynamic laboratory of UNESP (Rio Claro campus, São Paulo, Brazil). Free access to water and food was provided. All experiments were performed in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Council of Europe no. 123, Strasbourg 1985).

The animals were separated at random and the studies were carried out in three separated series of experiments. In the first, two groups of adult rats were studied: the control group (C1; n 6) received regular rodent chow (57.3 % carbohydrate, 41.2 % as starch, Labina; Purina, São Paulo, Brazil) and the fructose group (F1; n 6) was fed on a regular rodent chow and 10 % of drinking water was composed of fructose solution. Both groups started the experiment aged 90 d and the follow-up was done for 8 weeks.

In the second experiment, two groups of adult rats were also evaluated: the control group (C2; n 6) was fed on a purified balanced diet (AIN-93G)⁽²¹⁾ and a fructose group (F2; n 6) was fed on a purified 60 % fructose diet (Table 1). Both groups started the experiment at age 90 d and the follow-up was done for 4 weeks.

Two groups of young rats were analysed in the third experiment: the control group (C3; n 6) was fed on a balanced AIN-93G diet and the fructose group (F3; n 6) was fed on a 60 % fructose diet. Both groups started the experiment at age 28 d and the follow-up was done for 8 weeks.

All animals were weighed and measured (nose to anus length) once per week. At the end of the experimental period, the Lee index was calculated⁽²²⁾ (by dividing the cubic root of the final body weight (g) by the final body length (cm) and multiplying by 1000). This index for rats is equivalent to the human BMI.

Table 1. Composition of the balanced and fructose-rich diets

Ingredient (g/kg)	AIN-93G	Fructose diet
Casein	202	202
Maize starch	397	–
Dextrinised maize starch	130.5	–
Sucrose	100	27.5
Fructose	–	600
L-Cysteine	3	3
Soyabeans	70	70
Mineral mix (AIN-93G)*	35	35
Vitamin mix (AIN-93)*	10	10
Fibre	50	50
Choline chlorhydrate	2.5	2.5

* See Reeves *et al.*⁽²¹⁾.

The vessels containing the diets and the bottle of water were refilled each 2 d. Once per week, the differences between the full vessels or full bottles and the content 24 h later were considered as the amount consumed and were registered. The average amount of fructose ingested was calculated as 60 % of diet (experiments 2 and 3) or 10 % of the water ingested during the whole period (experiment 1).

Oral glucose tolerance test

At the end of each experiment, the rats were fasted for 15 h. Glucose was administered into the stomach of the rats through a gastric catheter at the final dose of 2.0 g/kg body weight. Blood samples for serum glucose determination were obtained from a cut at the tip tail at 0, 30, 60 and 120 min. Serum glucose determination was made by the glucose oxidase method (Laborlab Kit; Guarulhos, SP, Brazil)⁽²³⁾. The glycaemic response during the oral glucose tolerance test was evaluated by the total area under the serum glucose curve using the trapezoidal method⁽²⁴⁾.

Subcutaneous insulin tolerance test

At the end of all experimental series, subcutaneous insulin tolerance tests were performed for peripheral insulin sensitivity evaluation. The insulin tolerance tests consisted of a bolus injection of regular insulin at the dorsal region (30 mU/g body weight). Blood samples were obtained from a cut at the tip tail at 0, 30, 60 and 120 min for serum glucose determination by the glucose oxidase method (Laborlab Kit)⁽²³⁾. A constant for serum glucose disappearance (Kitt) was calculated from the formula $0.693/t_{1/2}$. The serum glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the least square analysis of serum glucose concentration from 0–30 min after insulin injection, when serum glucose concentration decreased linearly⁽²⁵⁾.

Blood chemistry and body fat

Because of multiple aspects involving insulin sensitivity evaluation, the fasting insulin concentration was also assessed.

All animals were killed by decapitation and trunk blood was collected for serum TAG, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and glucose determinations by colorimetric procedures⁽²⁶⁾. Retroperitoneal, mesenteric (visceral) and subcutaneous posterior fat depots were excised and weighed according to Cinti⁽²⁷⁾. Liver total lipid concentration⁽²⁶⁾ was also determined.

Statistics

In each experiment, the values of weight and body length throughout the period of dietary intake were analysed by two-way ANOVA. All the other results were analysed statistically by the unpaired Student's *t* test. A level of 5 % was taken for statistical significance.

Results

The weight and body-length values in the first experiment are shown in Fig. 1. No difference was revealed.

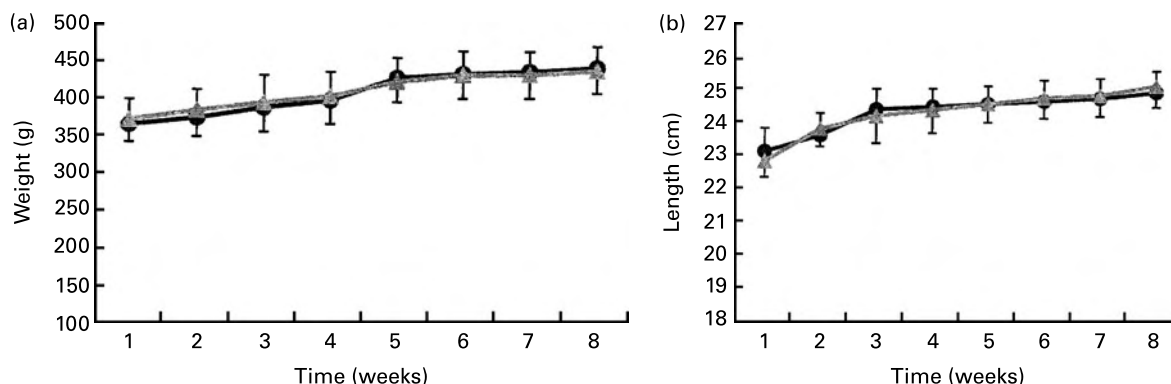


Fig. 1. Weight (a) and length (b) of fructose-fed ($\triangle$) and control ($\bullet$) animals in the first experiment ($P > 0.05$).

Data from the first series are displayed in Table 2. No metabolic difference was observed between control (C1) and fructose-fed (F1) rats in any of the parameters evaluated. The average amount of fructose ingested corresponded to 1.74 g/100 g body weight per d.

No differences were observed in weight or body-length values in the second experiment (Fig. 2).

The data of the second experiment are shown in Table 3. The fructose group (F2) presented higher values for the area under the serum glucose curve during glucose tolerance tests when compared with the control group (C2). Rats of the F2 group developed insulin resistance when compared with the C2 group, indicated by a lower constant for serum glucose disappearance (Kitt) value and a higher fasting insulin concentration. No difference was observed in the basal serum glucose values between the two groups. Serum total cholesterol, HDL, LDL and TAG were higher in the F2 group than in the C2 group. In this experiment higher retroperitoneal, mesenteric and subcutaneous fat depot weights were observed in the F2 group in comparison with the C2 group. The concentration of liver total lipids was also higher in the F2 group compared with the C2 group. No

difference was found between the groups in the results related to the Lee index. The average amount of fructose ingested in this second experiment was 2.70 g/100 g body weight per d.

No difference was observed in weight or body-length values in the third experiment (Fig. 3).

Table 4 shows data from the third series of experiments. The area under the serum glucose curve during glucose tolerance tests and TAG concentration were higher for the F3 group when compared with the C3 group. No differences were observed between the groups in insulin resistance, serum total cholesterol, basal glucose, HDL, LDL, retroperitoneal, mesenteric and subcutaneous fat depot weights and the Lee index. In this third experiment, the average amount of fructose ingested was 3.75 g/100 g body weight per d.

Discussion

There has been clinical and epidemiological evidence suggesting a progressive association of metabolic syndrome development and high fructose consumption⁽²⁸⁾. Indeed, a marked increase in obesity and metabolic syndrome

Table 2. Effects of 8 weeks of fructose feeding as 10% solution in drinking water in adult male Wistar rats (experiment 1)*
(Mean values and standard deviations of six animals per group)

Group...	Control (C1)		Fructose (F1)	
Parameter	Mean	SD	Mean	SD
Area under serum glucose curve during GTT (mm $\times$ 120 min)	1084.0	187.3	1124.9	99.6
Kitt (%/min)	0.60	0.27	0.61	0.48
Fasting insulin (μ U/ml)	4.09	0.54	4.16	0.63
Serum glucose (mm)	5.7	0.6	5.4	0.7
Serum total cholesterol (mm)	2.19	0.48	2.38	0.44
Serum HDL-cholesterol (mm)	1.64	0.26	1.82	0.16
Serum LDL-cholesterol (mm)	0.49	0.23	0.63	0.37
Serum TAG (mm)	1.90	0.64	1.82	0.67
Retroperitoneal fat depot weight (mg/100 g bw)	533.7	233.2	572.5	155.0
Mesenteric fat depot weight (mg/100 g bw)	651.5	139.9	697.8	167.6
Subcutaneous posterior fat depot weight (mg/100 g bw)	514.4	171.5	521.2	94.1
Liver total lipids (mg/100 mg)	5.35	0.94	5.23	0.57
Lee index	318.6	10.8	316.6	10.0

GTT, glucose tolerance test; Kitt, constant for serum glucose disappearance; bw, body weight.

* See Methods for details of the diets.

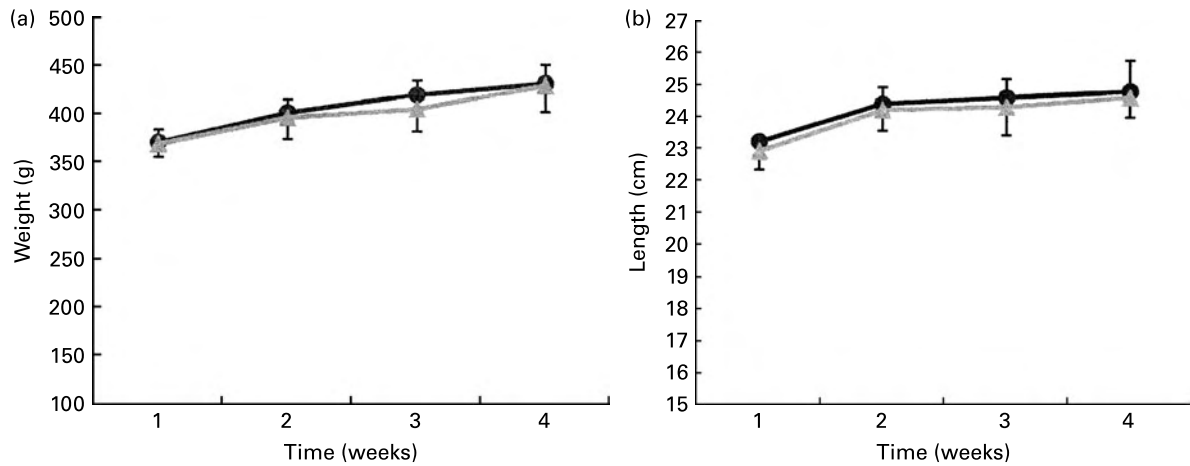


Fig. 2. Weight (a) and length (b) of fructose-fed ($\triangle$) and control ($\bullet$) animals in the second experiment ($P > 0.05$).

prevalence has been linked to a 30 % overall increase in fructose ingestion in the last 20 years within the USA. It has been associated with the introduction of high-fructose maize syrup as a sweetener in soft drinks and other foods⁽⁵⁾. In the present study, we examined the effect of three different protocols of fructose administration on the metabolic characteristics of Wistar rats.

In the first protocol, fructose (10 %) was administered to adult (90 d) male Wistar rats in drinking water during 8 weeks. No metabolic differences were observed between the control and fructose-fed rats. Using the same procedure, Sanchez-Lozada *et al.*⁽¹⁹⁾ reported that fructose administration was able to induce systemic hypertension, hyperuricaemia and hypertriglycerolaemia in adult male Sprague–Dawley rats. Roglans *et al.*⁽²⁹⁾ reported hypertriglycerolaemia and hepatic steatosis in Sprague–Dawley rats (the authors neither mention the age nor the weight of the animals at the beginning of the experiment) that had received fructose (10 %) in drinking water for 2 weeks. Additionally, while adult Sprague–Dawley rats fed fructose

through drinking water developed features of the metabolic syndrome, adult Wistar rats presented a serum biochemical profile considered to be healthier for the cardiovascular system. Thus, the reported differences may be associated with the rat lineage used. In fact, Wistar rats seem to be less affected by the deleterious effects of fructose when administered in drinking water than Sprague–Dawley ones.

Sanchez-Lozada *et al.*⁽¹⁹⁾ compared the metabolic effects of fructose (10 %) in drinking water and a high-fructose (60 %) diet in Sprague–Dawley rats. Both procedures induced hyperuricaemia and hypertriglycerolaemia. However, the 60 % fructose diet resulted in a higher fructose energy intake, which was directly associated with worsening metabolic syndrome parameters. Other studies have also reported hyperinsulinaemia, hypertriglycerolaemia and glucose intolerance in Sprague–Dawley rats fed on 60 % fructose diets from 4 to 7 weeks^(11,12,17,18,30–32). Thus, in the second experiment series, a fructose diet was administered to adult male Wistar rats (age 90 d) for 4 weeks.

Table 3. Effects of 4 weeks of feeding a 60 % fructose diet in adult male Wistar rats (experiment 2)†

(Mean values and standard deviations of six animals per group)

Group...	Control (C2)		Fructose (F2)	
	Mean	SD	Mean	SD
Area under serum glucose curve during GTT (mm × 120 min)	862.5	80.4	951.4*	106.8
Kitt (%/min)	0.73	0.16	0.47*	0.16
Fasting insulin (μU/ml)	4.04	0.93	4.91*	1.42
Serum glucose (mm)	6.83	0.93	6.33	1.3
Serum total cholesterol (mm)	2.54	0.16	5.82*	1.92
Serum HDL-cholesterol (mm)	0.78	0.17	1.08*	0.16
Serum LDL-cholesterol (mm)	0.51	0.19	0.74*	0.20
Serum TAG (mm)	1.28	0.44	2.55*	0.84
Retroperitoneal fat depot weight (mg/100 g bw)	598.2	173.9	873.9*	347.9
Mesenteric fat depot weight (mg/100 g bw)	659.9	191.2	999.9*	263.8
Subcutaneous posterior fat depot weight (mg/100 g bw)	429.5	197.9	640.4*	203.6
Liver total lipids (mg/100 mg)	5.4	0.3	9.70*	4.0
Lee index	294.3	6.3	296.8	7.8

GTT, glucose tolerance test; Kitt, constant for serum glucose disappearance; bw, body weight.

* Mean value was significantly different from that of the control group ($P < 0.05$; unpaired *t* test).

† For details of the diets, see Methods.

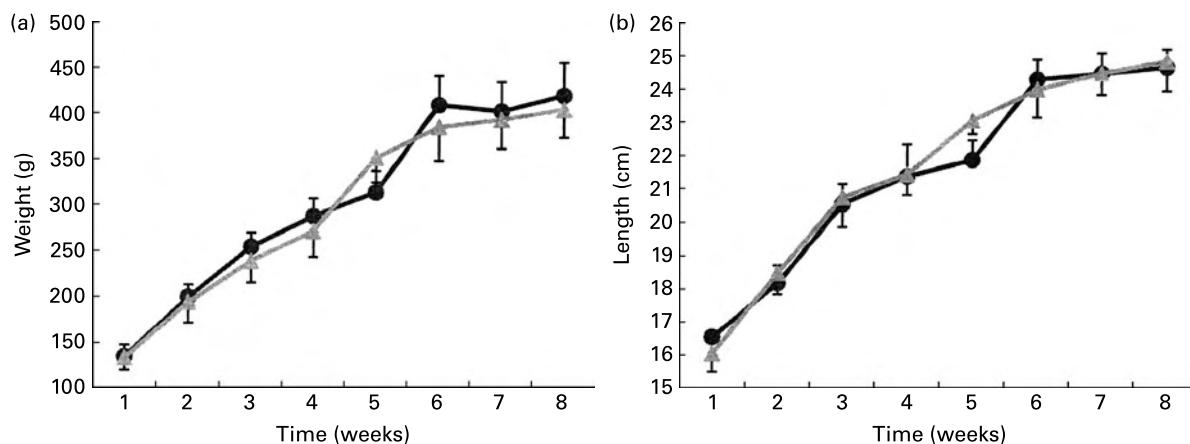


Fig. 3. Weight (a) and length (b) of fructose-fed (—▲—) and control (—●—) animals in the third experiment ($P > 0.05$).

Using the fructose-rich diet protocol, we also succeeded in inducing signs of the metabolic syndrome in fructose-fed Wistar rats, such as glucose intolerance, insulin resistance and high serum TAG, total cholesterol and LDL as well as a high concentration of total liver lipids.

The elevated liver lipid accumulation is the sign of NAFLD that may contribute to the development of non-alcoholic steatohepatitis⁽³³⁾ in individuals who do not consume significant amounts of ethanol⁽³⁴⁾. This result reinforces the assumption that not only high-fat dietary consumption plays a role in NAFLD, but also high fructose ingestion. In this way, Ouyang *et al.*⁽³⁵⁾ showed that fructose ingestion in patients with NAFLD was 2- to 3-fold higher than in control groups.

It has been reported that adult Sprague–Dawley rats given fructose solution with standard diets gained more weight and had significantly more fat tissue weight than control rats given only a standard diet⁽³⁶⁾. Alterations in body fat were also observed in the fructose-fed rats of the second experiment, which showed retroperitoneal, mesenteric and subcutaneous fat depot weight increase.

Lau *et al.*⁽³⁷⁾, in a prospective study with non-diabetic patients, found no association between the glycaemic

index or glycaemic load of the diet with the probability of developing insulin resistance. Barbosa *et al.*⁽¹⁷⁾ compared the effects of glucose and fructose supplementation (8 g/kg) in Wistar rats during 3 weeks. The authors reported insulin resistance and hypertriglycerolaemia in response to both treatments, but the glycaemia was higher in the fructose group. The fructose glycaemic index is about 3-fold lower than glucose and therefore the alterations observed may not be related to this index or even to glycaemic load (glycaemic index multiplied by amount in grams). In addition, the second experiment, which revealed more damage to the rats, presented just an intermediate value of daily fructose ingested in comparison with the first and third experiments.

The third experiment series was designed to analyse the metabolic alterations caused in young (28 d) Wistar rats by administration of a high-fructose diet for 8 weeks. The young animals fed on the high-fructose diet showed hypertriglycerolaemia and glucose intolerance in the absence of alterations in insulin sensitivity, serum total cholesterol, LDL and HDL concentration as well as mesenteric, retroperitoneal and subcutaneous fat depot weights when compared with the control group. In contrast, insulin sensitivity

Table 4. Effects of 8 weeks of feeding a 60 % fructose diet in young male Wistar rats (experiment 3)†
(Mean values and standard deviations of six animals per group)

Group...	Control (C3)		Fructose (F3)	
	Mean	SD	Mean	SD
Area under serum glucose curve during GTT (mm × 120 min)	1128.1	92.6	1246.8*	69.1
Kitt (%/min)	0.62	0.23	0.65	0.37
Fasting insulin (μU/ml)	4.18	0.55	4.07	0.61
Serum glucose (mm)	7.12	0.83	6.75	0.89
Serum total cholesterol (mm)	2.47	0.58	3.01	0.50
Serum HDL-cholesterol (mm)	0.98	0.27	1.09	0.3
Serum LDL-cholesterol (mm)	0.79	0.33	0.83	0.43
Serum TAG (mm)	0.68	0.19	1.09*	0.25
Retroperitoneal fat depot weight (mg/100 g bw)	713.7	290.4	764.8	228.1
Mesenteric fat depot weight (mg/100 g bw)	762.6	237.7	782.0	143.5
Subcutaneous posterior fat depot weight (mg/100 g bw)	772.0	356.6	696.4	249.5
Liver total lipids (mg/100 mg)	6.48	1.34	6.80	2.55
Lee index	298.8	7.6	307.9	10.7

GTT, glucose tolerance test; Kitt, constant for serum glucose disappearance; bw, body weight.

* Mean value was significantly different from that of the control group ($P < 0.05$; unpaired *t* test).

† For details of the diets, see Methods.

impairment has been described in 5-week-old Wistar–Hannover rats, after 28 d of high-fructose diet ingestion associated with hypertriacylglycerolaemia and unchanged body-weight gain, basal serum glucose and serum total cholesterol⁽³⁸⁾.

Interestingly, the third experiment showed that the average amount of daily fructose ingestion was almost 40 % higher than in the second experiment, but did not induce a complete metabolic syndrome picture in these animals. A reasonable hypothesis could be the influence of protective mechanisms linked to youth in Wistar rats. However, further investigation will be necessary.

It is important to note that the AIN-93G provided in both series of experiments is recommended for the growth phase and is composed of 75 % more fat and 42.9 % more casein than an adult maintenance diet. However, the C2 rats presented fat depot values very similar to the C1 rats that ingested the regular rodent chow.

The dietary ingestion of fructose in humans is basically associated with soft drinks (whose sugars are composed of 45 % of glucose and 55 % of fructose), which account for just 8 % of total energy intake⁽³⁹⁾. However, Montonen *et al.*⁽⁴⁰⁾ in a cohort-designed study reported that the risk of type 2 diabetes occurrence is 1.67 higher with this dietary profile. The emerging evidence from recent epidemiological and biochemical studies clearly suggests that the high fructose dietary intake has rapidly become an important causative factor in the development of the metabolic syndrome⁽⁸⁾.

Nevertheless, the present study was not designed to investigate fructose dose-response characteristics, as there are different metabolic responses to high-fructose diets even within rodents⁽¹⁷⁾. The importance of the present study resides in identifying the most adequate protocol to induce the metabolic syndrome in Wistar rats. According to the present findings, feeding adult rats (90 d) on a purified high-fructose (60 %) diet for 4 weeks seems to be an appropriate protocol for this purpose.

Concerning the limitations of the study, the lack of baseline values for the biochemical variables implies that already existent differences could have been missed. However, the randomisation process to compose the groups diminishes this possibility.

The absence of energy expenditure or physical activity measures does not exclude the possibility that the differences in the fat depots are related to lower physical or metabolic activity. Nonetheless, based on the randomisation assumption it would imply that the fructose diet plays a role in spontaneous physical activity. Additional studies may answer this question.

In conclusion, the results in the three series of experiments reveal that high fructose intake is more effective to produce signs of the metabolic syndrome in adult than in young Wistar rats, despite a shorter feeding period. Also, diet seems to provide a better effective route for fructose administration than drinking water.

Acknowledgements

The authors thank Clarice Y. Sibuya, Eduardo Custódio and José Roberto R. Silva for technical assistance. This research was supported by Brazilian foundations FAPESP (process:

07/54098-0 and 05/57741-6) and CNPQ (process: 30027/2004-6). R. F. M. was responsible for the statistical analysis and wrote the manuscript. C. R. was responsible for the biochemical analysis and was co-author of the manuscript. J. A. O. conducted study 1. E. S. was responsible for designing and planning study 1. M. A. R. M. designed, planned and oversaw studies 2 and 3. All the authors read and agreed with the final format. The study authors have no conflict of interests.

References

1. Reaven GM (1988) Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **37**, 1595–1607.
2. Zecchin HG, Carnevali JBC & Saad MJA (2004) Mecanismos moleculares da resistência à insulina na síndrome metabólica (Molecular mechanisms of insulin resistance in the metabolic syndrome). *Rev Soc Cardiol Est São Paulo* **14**, 574–589.
3. Fujioka S, Matsuzawa Y, Tokunaga K & Tarui S (1987) Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism* **36**, 54–59.
4. Kaplan NM (1989) The deadly quartet: upperbody obesity, glucose intolerance, hyperglycemia and hypertension. *Arch Intern Med* **149**, 1514–1520.
5. Nakagawa T, Tuttle KR, Short RA & Johnson RJ (2005) Hypothesis: fructose induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. *Nat Clin Pract Nephrol* **1**, 80–86.
6. Samad F, Uysal KT, Wiesbrock SM, Pandey M, Hotamisligil GS & Loskutoff DJ (1999) Tumor necrosis factor α is a key component in the obesity-linked elevation of plasminogen activator inhibitor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6902–6907.
7. Cave M, Deaciuc I, Mendez C, Song Z, Joshi-Barve S, Barve S & McClain C (2007) Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J Nutr Biochem* **18**, 184–195.
8. Gross LE, Li L, Ford ES & Liu S (2004) Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. *Am J Clin Nutr* **79**, 774–779.
9. Astrup A & Finer N (2000) Redefining type 2 diabetes: 'diabetes' or 'obesity dependent diabetes mellitus'? *Obes Rev* **1**, 57–59.
10. Hwang I-S, Ho H, Hoffman BB & Reaven GM (1987) Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* **10**, 512–516.
11. Katakam PV, Ujhelyi MR, Hoenig ME & Miller AW (1998) Endothelial dysfunction precedes hypertension in diet-induced insulin resistance. *Am J Physiol* **275**, 788–792.
12. Kelley GL, Allan G & Azhar S (2004) High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation. *Endocrinology* **145**, 548–555.
13. Hallfrisch J (1990) Metabolic effects of dietary fructose. *FASEB J* **4**, 2652–2660.
14. Basciano H, Federico L & Adeli K (2005) Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)* **2**, 5–18.
15. Okada Y, Yoshino T, Takeuchi A, Endoh M, Ohta H, Jinno Y, Yokoyama T, Izawa T & Kobayashi E (2000) Effects of the K⁺ channel opener KRN4884 on the cardiovascular metabolic syndrome model in rats. *J Cardiol Pharmacol* **35**, 287–293.
16. Joyeux-Faure M, Rossini E, Ribaut C & Faure P (2006) Fructose-fed rat hearts are protected against ischemia-reperfusion injury. *Exp Biol Med* **231**, 456–462.

17. Barbosa CR, Albuquerque EMV, Faria EC, Oliveira HCF & Castilho LN (2007) Opposite lipemic response of Wistar rats and C57BL/6 mice to dietary glucose or fructose supplementation. *Braz J Med Biol Res* **40**, 323–331.
18. Lee YC, Ko YH, Hsu YP & Ho LT (2006) Plasma leptin response to oral glucose tolerance and fasting/re-feeding tests in rats with fructose-induced metabolic derangements. *Life Sci* **78**, 1155–1162.
19. Sánchez-Lozada LG, Tapia E, Jiménez A, *et al.* (2007) Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**, 423–429.
20. Daly ME, Vale C, Walke M, George K, Albert MM & Mathers JC (1997) Dietary carbohydrates and insulin sensitivity: a review of the evidence and clinical implications. *Am J Clin Nutr* **66**, 1072–1085.
21. Reeves PG, Nielsen HN & Fahey GC (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**, 1939–1951.
22. Bernardis LL & Peterson BD (1968) Correlation between Lee index and carcass fat content in weaning and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol* **40**, 527–528.
23. Latorraca MC, Carneiro EM, Boschero AC & Mello MAR (1998) Protein deficiency during pregnancy and lactation impairs glucose-induced insulin secretion but increases the sensitivity to insulin in rats. *Br J Nutr* **80**, 291–297.
24. Mathews JNS, Altman DG, Campbell MJ & Royston P (1990) Analysis of serial measurements in medical research. *BMJ* **27**, 230–235.
25. Lundbaek K (1962) Intravenous glucose tolerance test as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. *BMJ* **2**, 1507–1513.
26. Nogueira DM, Strufaldi B, Hirata MH, Abdalla DSP & Hirata RDC (1990) Sangue – parte I: glicídios (Blood – part I: glycidies). In *Métodos de Bioquímica Clínica (Methods of Clinical Biochemistry)*, pp. 153–168 [Pancast editor]. São Paulo: Pancast.
27. Cinti S (2005) The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **73**, 9–15.
28. Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K & Havel PJ (2002) Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr* **76**, 911–922.
29. Roglans N, Vilà L, Farré M, Alegret M, Sánchez RM, Vázquez-Carrera M & Laguna JC (2007) Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPAR α activity in fructose-fed rats. *Hepatology* **45**, 778–788.
30. Oron-Herman M, Rosenthal T, Mirelman D, Miron T, Rabinkov A, Wilchek M & Sela B (2005) The effects of S-allylmercaptocaptopril, the synthetic product of allicin and captopril, on cardiovascular risk factors associated with the metabolic syndrome. *Atherosclerosis* **183**, 238–243.
31. Sharabi Y, Oron-Herman M, Kamari Y, Avni I, Peleg E, Shabtay Z, Grossman E & Shamiss A (2007) Effect of PPAR- γ agonist on adiponectin levels in the metabolic syndrome: lessons from the high fructose fed rat model. *Am J Hypertens* **20**, 206–210.
32. Wang X, Hattori Y, Satoh H, Iwata C, Banba N, Monden T, Konsuke U, Kamikawa Y & Kasai K (2007) Tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and restores adiponectin levels in rats. *Eur J Pharmacol* **555**, 48–53.
33. Pitt HA (2007) Hepato-pancreato-biliary fat: the good, the bad and the ugly. *HPB (Oxford)* **9**, 92–97.
34. Zivkovi AC, Germann JB & Sanyal AJ (2007) Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr* **86**, 285–300.
35. Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Diehl AM, Johnson RJ & Abdelmalek MF (2008) Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* **48**, 993–999.
36. Kanarek RB & Orthen-Gambill N (1982) Differential effects of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate-induced obesity in rats. *J Nutr* **112**, 1546–1554.
37. Lau C, Faerch K, Glümer C, Tetens I, Pedersen O, Carstensen B, Jorgensen T & Borch-Johnsen K (2005) Dietary glycemic index, glycemic load, fiber, simple sugars, and insulin resistance. *Diabetes Care* **28**, 1397–1403.
38. Bezerra RMN, Ueno M, Silva MS, Tavares DQ, Carvalho CRO, Saad MJA & Gontijo JAR (2001) A high-fructose diet induces insulin resistance but not blood pressure changes in normotensive rats. *Braz J Med Biol Res* **34**, 1155–1160.
39. Park YK & Yetley EA (1993) Intakes and food sources of fructose in the United States. *Am J Clin Nutr* **58**, 737S–747S.
40. Montonen J, Järvinen R, Knekt P, Heliövaara M & Reunanen (2007) A consumption of sweetened beverages and intakes of fructose and glucose predict type 2 diabetes occurrence. *J Nutr* **137**, 1447–1454.