

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

LAYLA MENDONÇA LIRIO

**EFEITOS DA INGESTÃO CRÔNICA DE FRUTOSE NO
DESENVOLVIMENTO DE ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM
RATOS NORMOTENSOS E ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS**

VITÓRIA

2016

LAYLA MENDONÇA LIRIO

**EFEITOS DA INGESTÃO CRÔNICA DE FRUTOSE NO
DESENVOLVIMENTO DE ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM
RATOS NORMOTENSOS E ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, como quesito para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Perim Baldo

Dissertação aprovada em ____/____/____.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Camille de Moura Balarini (UFPB)

Profa. Dra. Alessandra Simão Padilha (UFES)

Prof. Dr. Marcelo Perim Baldo (UFES - Orientador)

VITÓRIA

2016

Ficha catalográfica

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores e colegas do curso que contribuem para nosso desenvolvimento acadêmico, dividindo conhecimento.

Aos colegas de laboratório, que dividem as dificuldades e resultados, que se propõe em contribuir a todo momento.

À minha família e amigos, que respeitaram e entenderam a ausência, oscilações de humor e necessidade de ajuda características daqueles que estão em um curso de mestrado.

À banca avaliadora, que se colocou disponível para avaliar e contribuir com o trabalho apresentado.

E em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Perim Baldo, pela paciência, dedicação, disponibilidade, compreensão. Costumo dizer que acho que fui a aluna com mais sorte a ingressar no programa de pós-graduação, e vejo isso sendo provado a cada etapa que passamos durante a construção do projeto, pesquisa e dissertação.

Sinto-me, sinceramente, grata!

RESUMO

A crescente epidemia de síndrome metabólica tem sido relacionada com o aumento do uso de frutose pelos indivíduos, resultante do crescente uso deste açúcar para a produção de alimentos industrializados. Recentemente, o uso de frutose como um ingrediente aumentou em bebidas adoçadas, tais como refrigerantes e sucos. Nossa hipótese, portanto, é de que a ingestão de frutose, em ratos hipertensos teria um pior prognóstico no desenvolvimento de doença metabólica e doença hepática gordurosa não-alcoólica. Métodos: ratos Wistar e espontaneamente hipertensos com idade de 6 semanas foram tratados com água ou frutose (10%) durante 6 semanas. A glicose no sangue foi medida a cada duas semanas, e a resistência à insulina e teste de sensibilidade de glicose foram avaliados ao final do tratamento. A pressão arterial sistólica foi medida por pletismografia, a massa magra e massa de gordura abdominal foram aferidas, o fígado foi analisado para determinar a deposição de gordura e fibrose intersticial. Resultados: glicose em jejum apresentou-se aumentada em animais que foram submetidos a uma ingestão de alto teor de frutose, independente da pressão arterial. Além disso, a resistência à insulina foi observada em ambos os grupos normotensos e hipertensos após a ingestão de frutose, que também causou um aumento de 2,5 vezes nos níveis de triglicérides em ambos os grupos, no entanto, o ganho de massa magra não se alterou. Descobrimos que a ingestão de frutose aumentou significativamente a deposição de massa de gordura abdominal em ratos normotensos, mas não em ratos hipertensos. Porém, só aumentou a deposição de gordura e fibrose no fígado de ratos hipertensos. Conclusões: Demonstramos que nos grupos estudados, a ingestão de frutose aumentou triglicérides em ambos os grupos

tratados com frutose, deposição de gordura abdominal em animais normotensos e resistência à insulina nos animais hipertensos. No entanto, os ratos hipertensos também desenvolvem a deposição de gordura intersticial e fibrose no fígado. Desta forma, a hipertensão essencial leva a um pior prognóstico no desenvolvimento da síndrome metabólica e desordens hepáticas em animais hipertensos, quando comparados aos animais normotensos.

Palavras-chave: Frutose; Distúrbio metabólico; Gordura visceral; Hipertensão; Doença hepática gordurosa.

ABSTRACT

The growing epidemic of metabolic syndrome has been related to the increased use of fructose by individuals, increasing its use for the production of processed foods. Recently, the use of fructose as an ingredient has increased in sweetened beverages, such as sodas and juices. We thus hypothesized that fructose intake by hypertensive rats would have a worse prognosis in developing metabolic disorder and non-alcoholic fatty liver disease. Methods. Male Wistar and spontaneously hypertensive aged 6 weeks were given water or fructose (10%) for 6 weeks. Blood glucose was measured every two weeks, and insulin and glucose sensitivity test were assessed at the end of the treatment. Systolic blood pressure was measure by plethysmography. Lean mass and abdominal fat mass was collected. Liver was analyzed to determine interstitial fat deposition and fibrosis. Results. Fasting glucose increased in animals that underwent a high fructose intake, independent of blood pressure. Also, insulin resistance was observed in both groups normotensive and hypertensive rats after fructose intake. Fructose intake caused a 2.5-fold increase in triglycerides levels in both groups. The lean mass gain did not change with fructose intake. However, we found that fructose intake significantly increased abdominal fat mass deposition in normotensive rats but not in hypertensive rats. Nevertheless, chronic fructose intake only increased fat deposition and fibrosis in the liver of hypertensive rats. Conclusions. We demonstrated that, normotensive and hypertensive rats, fructose intake increased triglycerides, abdominal fat deposition, and insulin resistance. However, hypertensive rats underwent fructose intake also develop interstitial fat deposition and fibrosis in liver.

Thus, essential hypertension is worsens outcomes in the development of metabolic syndrome and liver disorders in hypertensive animals when compared to normotensive animals.

Keywords: Fructose; Metabolic disorder; Visceral fat; Hypertension; Fatliver disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias metabólicas da frutose e inter-relação com o metabolismo lipídico e glicídico [27] – Pág. 21

Figura 2. Gaiola metabólica utilizada para quantificar consumo de ração, ingestão de líquido e excreção urinária. – Pág. 32

Figura 3. Pressão arterial de ratos normotensos e hipertensos ao longo de seis semanas de tratamento. – Pág. 37

Figura 4. Glicemia em Jejum de ratos normotensos e hipertensos ao longo de seis semanas de tratamento. Pág. 38

Figura 5. Curso temporal dos níveis séricos de glicose, após injeção de glicose (2 mg/kg, ip). – Pág. 39

Figura 6. Curso temporal dos níveis séricos de glicose, após injeção de insulina (1 U/kg, ip). – Pág. 40

Figura 7. Ingestão de água e alimento dos animais submetidos ao estudo. (A) Consumo diário de ração dos grupos normotenso e hipertenso controle e normotenso e hipertenso frutose. (B) Consumo diário de água ou solução de frutose dos animais normotensos e hipertensos dos grupos controle e frutose. (C) Consumo energético de animais normotensos e hipertensos dos grupos controle e frutose. – Pág. 42

Figura 8. Evolução do peso corporal dos animais normotensos e hipertensos dos grupos controle e frutose. – Pág. 44

Figura 9. (A) Excreção de sódio urinário em 24 horas (B) Excreção de potássio urinário. # $P < 0,05$ ratos hipertensos vs. ratos normotensos. – Pág. 45

Figura 10. Pressão arterial de ratos normotensos e hipertensos, dos grupos controle e frutose, ao longo de seis semanas de tratamento. Pág. 46

Figura 11. Glicemia em Jejum de ratos normotensos e hipertensos ao longo de seis semanas de tratamento. – Pág. 47

Figura 12. (A) Curso temporal dos níveis séricos de glicose, após injeção de glicose (2 mg/kg, ip). (B) Área abaixo da curva, dos níveis séricos de glicose, após injeção de glicose (2 mg/kg, ip). – Pág. 48

Figura 13. (A) Curso temporal dos níveis séricos de glicose, após injeção de insulina (1 U/kg, ip). (B) Área abaixo da curva, dos níveis séricos de glicose, após injeção de insulina (1 U/kg, ip). – Pág. 49

Figura 14. Massa magra de animais normotensos e hipertensos submetidos ao estudo. (A) Músculo Gastrocnêmio de animais normotensos e hipertensos dos grupos controle e frutose. (B) Músculo Peitoral de animais normotensos e hipertensos dos grupos controle e frutose. – Pág. 51

Figura 15. Deposição de gordura abdominal total de animais normotensos e hipertensos submetidos ao estudo. – Pág. 52

Figura 16. Deposição de gordura abdominal de animais normotensos e hipertensos submetidos ao estudo. (A) Deposição de gordura epididimal de animais normotensos e hipertensos dos grupos controle e frutose. (B) Deposição de gordura mesentérica de animais normotensos e hipertensos dos grupos controle e frutose. (C) Deposição de gordura retroperitoneal de animais normotensos e hipertensos dos grupos controle e frutose. – Pág. 53, 54

Figura 17. Efeito do consumo crônico de frutose na indução de doença hepática gordurosa não - alcoólica. Imagens histológicas representativas de

tecido de fígado coradas com Vermelho de Óleo O, de ratos normotensos e hipertensos submetidos a dieta rica em frutose foram. – Pág. 58, 59

Figura 18. Efeito do consumo crônico de frutose na indução de doença hepática gordurosa não - alcoólica. Imagens histológicas representativas de tecido de fígado coradas com com Picrosirius red (painel inferior) de ratos normotensos e hipertensos submetidos a dieta rica em frutose foram. – Pág. 60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Grupos experimentais, amostra utilizada por grupo e descrição do tratamento que será realizado em cada grupo. – Pág. 30

TABELA 2. Parâmetros plasmáticos de animais normotensos e hipertensos, após seis semanas de tratamento com dieta rica em frutose. – Pág. 56

TABELA 3. Peso dos órgãos de ratos normotensos e hipertensos após seis semanas de tratamento com alta ingestão de frutose. – Pág. 57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES	16
1.2 HIPERTENSÃO: EPIDEMIOLOGIA E MECANISMOS	17
1.3 RELAÇÃO DO CONSUMO DE FRUTOSE COM A HIPERTENSÃO E A OBESIDADE	19
1.3.1 <i>Metabolismo da Frutose</i>	19
1.3.2 <i>Consumo de frutose e a relação com a síndrome metabólica e obesidade</i>	22
1.3.3 <i>Consumo de frutose e sua relação com a doença hepática gordurosa não-alcoólica</i>	26
1.4 JUSTIFICATIVA	28
2. OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO E DELINEAMENTO DO ESTUDO	30
3.2 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE ÁGUA E RAÇÃO E DO VOLUME URINÁRIO	31
3.3 MEDIDAS NÃO INVASIVAS DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA	32
3.4 GLICEMIA EM JEJUM, TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE E TESTE DE SENSIBILIDADE A INSULINA	33
3.5 COLETA DE SANGUE E VISCERAS	34
3.6 EXAMES BIOQUÍMICOS	34

3.7 HISTOLOGIA	35
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	36
4. RESULTADOS	37
4.1. PRESSÃO ARTERIAL E RESISTÊNCIA INSULÍNICA EM RATOS HIPERTENSOS E NORMOTENSOS	37
4.1.1 <i>Medida não-invasiva da pressão arterial sistólica</i>	37
4.1.2 <i>Avaliação da glicemia após 12-14 horas de jejum</i>	38
4.1.3 <i>Testes de tolerância à glicose e de sensibilidade à insulina</i>	39
4.2 EFEITOS DA ALTA INGESTÃO DE FRUTOSE SOBRE A INGESTÃO DE ÁGUA E ALIMENTOS E PESO CORPORAL DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS	41
4.2.1 <i>Consumo alimentar e energético</i>	41
4.2.2 <i>Análise temporal do ganho de peso em animais normotensos e hipertensos submetidos à dieta crônica com frutose</i>	43
4.2.3 <i>Excreção urinária de Na⁺ e K⁺</i>	45
4.3 EFEITOS DA ALTA INGESTÃO DE FRUTOSE SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL, GLICEMIA EM JEJUM, TOLERÂNCIA A GLICOSE E RESISTÊNCIA À INSULINA DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS	46
4.3.1 <i>Efeitos da dieta crônica com frutose sobre a PAS de animais normotensos e hipertensos</i>	46
4.3.2 <i>Efeitos da dieta crônica com frutose na deposição de gordura visceral em animais normotensos e hipertensos</i>	47

4.4 EFEITOS DA ALTA INGESTÃO DE FRUTOSE SOBRE 50
PARÂMETROS PLASMÁTICOS DE ANIMAIS NORMOTENSOS E
HIPERTENSO

*4.4.1 Avaliação da massa magra em animais normotensos e 50
hipertensos submetidos à dieta crônica com frutose*

*4.4.2 Efeitos da dieta crônica com frutose na deposição de gordura 52
visceral em animais normotensos e hipertensos*

4.5 EFEITOS DA ALTA INGESTÃO DE FRUTOSE SOBRE 55
PARÂMETROS PLASMÁTICOS DE ANIMAIS NORMOTENSOS E
HIPERTENSOS

4.6 EFEITOS DA ALTA INGESTÃO DE FRUTOSE SOBRE PESO DOS 57
ÓRGÃOS DE ANIMAIS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

4.7 EFEITO DO CONSUMO CRÔNICO DE FRUTOSE NA INDUÇÃO 58
DE DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO – ALCOÓLICA EM
ANIMAIS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

*4.7.1 Efeito da frutose na deposição de gordura no fígado de ratos 58
normotensos e hipertensos*

*4.7.2 Efeito da frutose na indução de fibrose intersticial no fígado de 60
animais normotensos e hipertensos*

5 DISCUSSÃO 61

5.1 DIFERENÇAS ENTRE WISTAR E SHR 61

**5.2 EFEITOS DA FRUTOSE SOBRE GLICEMIA, INTOLERÂNCIA À 62
GLICOSE E SENSIBILIDADE A INSULINA**

**5.3 OS EFEITOS DA DIETA RICA EM FRUTOSE SOBRE A PRESSÃO 64
ARTERIAL**

5.4 EFEITOS DA FRUTOSE SOBRE O GANHO DE PESO CORPORAL E O ACÚMULO DE GORDURA VISCERAL	66
5.5 EFEITOS DA FRUTOSE SOBRE O PERFIL LIPÍDICO	69
5.6 EFEITOS DA FRUTOSE SOBRE A ESTEATOSE.	70
6 CONCLUSÃO	72
7 REFERÊNCIAS	73

1. INTRODUÇÃO

1.1. EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Recentemente a *American Heart Association* divulgou estatísticas sobre a prevalência das doenças cardiovasculares (DCV) [1]; as quais representam a principal causa de mortalidade na América do Norte. Tais estatísticas apontam que pelo menos 80 milhões de pessoas sejam portadoras de pelo menos alguma DCV, e que uma a cada três mortes está relacionada às DCV. Afirma ainda que aproximadamente 2500 americanos morram diariamente em decorrência de alguma DCV. Essas tristes estatísticas são referentes às principais causas de DCV: a hipertensão, que acomete aproximadamente 65 milhões de indivíduos, a doença coronariana (13 milhões), os defeitos congênitos cardiovasculares (1 milhão), e a insuficiência cardíaca congestiva (5 milhões) [2].

Diante dos números apresentados acima, é notório que as DCV são reconhecidamente a principal causa de mortes naturais no mundo. Em países de média e baixa renda, por exemplo, estas doenças são responsáveis por aproximadamente 80% dos casos de óbitos [3]. Os determinantes dessa “epidemia” global de DCV são multifatoriais, que vão além do domínio do setor da saúde. Pode-se listar como fatores de risco para DCV os fatores genéticos, fatores biológicos como a hipertensão arterial, obesidade e diabetes, além de fatores comportamentais como o sedentarismo, hábitos alimentares e tabagismo [4].

Atualmente, mais de 400.000 indivíduos nos Estados Unidos morrem anualmente em decorrência de doença arterial coronariana e 1 milhão sofrem

de eventos cardiovasculares agudos, como infarto agudo do miocárdio e morte súbita [5]. No Brasil, estas doenças são as principais causas de morte entre homens e mulheres. Totalizando cerca de 20% das mortes em indivíduos acima de 30 anos, em 2009 foram registradas 962.931 mortes entre indivíduos nesta faixa etária, segundo o Ministério da Saúde [6].

Apesar de, reconhecidamente, o número de casos de indivíduos acometidos por este tipo de agravo estar diminuindo gradativamente, as taxas encontradas ainda são preocupante, principalmente devido aos fatores de risco relacionados, que são, na maioria dos casos, inerentes aos hábitos da sociedade contemporânea [3-5].

1.2. ASPECTOS RELATIVOS À HIPERTENSÃO ARTERIAL

Fisiologicamente, a pressão arterial é determinada pelo produto do débito cardíaco e da resistência vascular periférica. Nos indivíduos normais e também nos portadores de hipertensão arterial, existe um espectro de variação do débito cardíaco com respostas concomitantes da resistência vascular periférica para um determinado nível de pressão arterial. Os mecanismos que regulam os níveis de pressão arterial atuam tanto em situação de repouso, quanto diante de um estímulo [7, 8]; uma característica dos portadores de hipertensão arterial essencial é a alteração dos sistemas de controle [9].

De maneira geral, o organismo conta com mecanismos reguladores da pressão arterial (neurais, humorais e vasculares), que atuam em curto e em longo prazo, com a função de promover níveis estáveis de pressão arterial

adequados para a continuidade da atividade funcional do sistema cardiovascular [10]. A regulação da pressão arterial é dependente das funções integradas dos sistemas cardiovascular, renal, neural e endócrina [11].

A hipertensão essencial (HAS) é uma condição clínica derivada de diversos fatores, caracterizada por níveis elevados e sustentados da pressão arterial. A HAS é caracterizada pela sustentação da pressão arterial acima de 140/90 mmHg em indivíduos sem comorbidades, ou 130/90 mmHg em indivíduos portadores de diabetes ou doença renal crônica. A HAS é altamente prevalente, estando presente em mais de 30% da população [12, 13]. Além disso, a hipertensão arterial é um dos fatores de risco mais comuns para DCV. A HAS acelera o processo da aterosclerose e pode ser um fator determinante para o surgimento precoce de síndrome coronariana, estando presente em aproximadamente 20% da população ocidental [6, 12].

O aumento da prevalência da hipertensão arterial é um assunto de interesse mundial discutido há várias décadas, sendo o objetivo principal em diversos estudos. O INTERSALT, por exemplo, foi um estudo transversal que relacionou a ingestão de sal estimada pela excreção urinária de sódio em 24 horas, associando com a prevalência de hipertensão arterial. Esse estudo foi realizado no final da década de 1980 em 52 centros de 32 países, pesquisando populações remotas como tribos indígenas e populações de outros centros. Foram levadas em consideração as variáveis consumo de sal, atividade física, índice de massa corporal e ingestão de álcool. O INTERSALT mostrou que a elevação da pressão arterial associada à idade tem intensidades diferentes entre as diferentes populações, mas está presente em todas elas [14, 15].

Um outro estudo, o *National Health Nutrition Examination Survey* (NHANES), divulgou dados que são utilizados como a principal fonte de vigilância epidemiológica dos Estados Unidos. Os estudos conduzidos entre 2003 – 2004, que avaliaram, além de outras variáveis, a prevalência da HA no período entre 1999 – 2004, observaram que 28,7% dos indivíduos avaliados eram hipertensos, sendo que destes, 68,9% sabiam da condição, 58,4% submetiam-se a tratamento, e apenas 31% alcançavam o controle efetivo dos níveis pressóricos [16, 17].

Em nível nacional, segundo a Sociedade Brasileira de Hipertensão, estima-se que 30% da população adulta é portadora de HAS (hipertensão arterial sistêmica) [18]. Estudos como o Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA), cujo objetivo principal é determinar quais são os fatores que mais influenciam no desenvolvimento de doenças crônicas na população brasileira [19]. E o Projeto “Monica” que determinou o perfil de distribuição das principais doenças crônicas na população brasileira, como hipertensão, diabetes, obesidade, doença renal, entre outras [20], apontaram que com o envelhecimento e hábitos da população, as doenças crônicas passaram a contribuir de forma crescente para outras morbidades e para a mortalidade.

1.3. RELAÇÃO DO CONSUMO DE FRUTOSE COM A HIPERTENSÃO ARTERIAL E A OBESIDADE

Segundo Pimenta e col. (2007), durante as últimas décadas, a Organização Mundial da Saúde determinou que a obesidade, definida como o índice de

massa corporal igual ou maior que 30 kg/m², não é apenas a desordem nutricional mais prevalente no mundo desenvolvido, e sim um grave problema de saúde pública mundial [9]. Isto por que os indivíduos obesos estão propensos ao desenvolvimento de uma série de condições, tais como, DCV, HAS, diabetes mellitus e outras complicações decorrentes de desordens metabólicas [11].

A obesidade associada à resistência insulínica é um importante fator de risco para diabetes tipo 2 e também para as DCV. Nos últimos anos vem sendo demonstrado que a obesidade é capaz de alterar uma série de funções endócrinas, inflamatórias e neurais. Embora seja evidente que uma dessas vias possa assumir papel predominante, é provável que a fisiopatologia da resistência à insulina seja resultado da interação dinâmica destas alterações [11, 13].

1.3.1. Metabolismo da Frutose

A frutose trata-se de um monossacarídeo, composto por seis átomos de carbono, apresentando grupamentos hidroxila e um grupamento carbonila. A frutose, quando hidrolisada, forma uma cetona denominada ceto-hexose. A glicose, por sua vez, dará origem a um aldeído chamado aldohexose [21] (Figura 1). Na década de 1970, por meio de cromatografia de troca iônica, foi possível realizar a separação da glicose e da frutose, o que aumentou drasticamente a produção de frutose pura, reduzindo seu custo [22]. Desde então, devido ao baixo custo para a indústria e devido a outras características

como maior solubilidade em soluções aquosas e por ser mais doce que a sacarose, a frutose passou a ser utilizada como adoçante em diversas bebidas e outros produtos industrializados [23, 24].

A dieta da população geral vem mudando e o consumo de produtos industrializados aumentando; com isso, há o aumento do consumo de frutose. Estudos demonstram que essa mudança nos hábitos alimentares ocasionou alterações no metabolismo lipídico elevando os níveis lipídios totais e triglicerídeos na circulação [24 - 26].

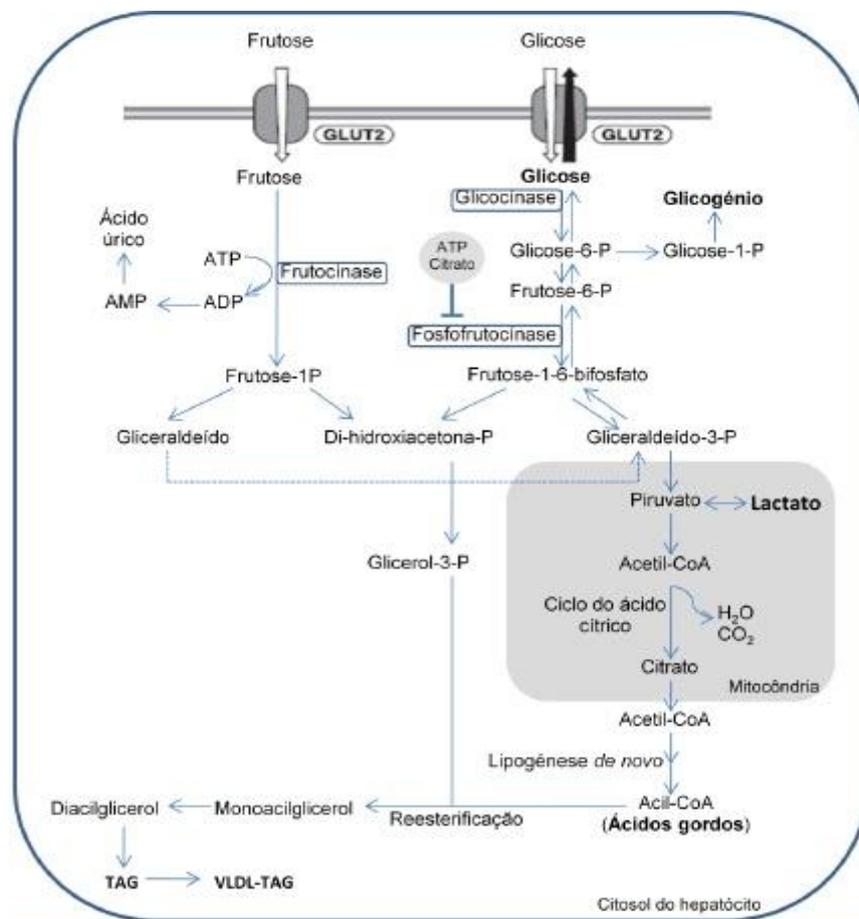


Figura 1. Vias metabólicas da frutose e inter-relação com o metabolismo lipídico e glicídico. Representação da entrada da glicose no fígado [Extraído de Dai e McNeill, 1995].

A frutose é absorvida pelo organismo por duas vias distintas, a primeira chamada de difusão facilitada, sendo mediada pela proteína GLUT5, que tem alta afinidade pela frutose. O papel primário desta proteína é o de transportar a frutose para o meio intracelular e sua ação independe dos níveis de glicose ou de insulina. A segunda via, é o co-transporte dependente de glicose. Nesta via, ocorre a abertura de pequenas junções, que movida pelo movimento do fluido luminal pelas vias paracelulares, aumentando em 29% a absorção da frutose quando associada a soluções com glicose [25-26].

Após sua absorção, a frutose é metabolizada no fígado. Sua entrada nos hepatócitos é mediada pela proteína GLUT2, não havendo necessidade de estímulo pela insulina [26]. No hepatócito, a frutose é fosforilada em uma reação mediada pela frutoquinase e cetoquinase, tornando-se frutose1-fosfato. A frutose1-fosfato por sua vez é clivada, por meio da aldolase B, em diidroxiacetona e gliceraldeído-fosfato. Esses dois compostos poderão seguir três vias distintas: primeiro, participar da via glicolítica, fornecendo piruvato e liberando energia; segundo, serem reduzidas até glicerol, necessário para a síntese de lipídeos; ou serem condensadas até formarem a frutose-1-6-difosfato e dar origem a glicose ou glicogênio. Sendo assim, a frutose após ser metabolizada dá origem ao piruvato, lipídeos e glicogênio [26-28] (Figura 1).

1.3.2. Consumo de frutose e a relação com a síndrome metabólica e obesidade

A primeira definição de síndrome metabólica surgiu em 1998 e foi proposta pela Organização Mundial da Saúde [29], onde a resistência à insulina era critério obrigatório para o diagnóstico desta síndrome. Além do critério

obrigatório, duas outras condições deveriam estar presentes, dentre a obesidade, a dislipidemia, a microalbuminúria e a hipertensão arterial [30]. Posteriormente, em 1999, o EGIR (Grupo Europeu Para o Estudo da Resistência Insulínica) propôs uma modificação à definição da OMS [31]. A resistência insulínica continuava sendo critério obrigatório, mas passava a ser definida por um valor de insulina em jejum superior ao percentil 75 entre indivíduos não diabéticos. A nova definição também deveria considerar outros dois critérios, dentre a obesidade, HA e dislipidemia. Porém, o critério de obesidade foi simplificado para o perímetro da cintura e a microalbuminúria foi excluída para diagnóstico [31, 32].

No ano de 2001, o *National Cholesterol Education Program: Adult Treatment Panel III* (ATPIII) propôs uma nova definição que foi atualizada em 2005 pelo *American Heart Association* e pelo *National Heart Lung and Blood Institute*. De acordo com a atualização, a síndrome metabólica passou a ser diagnosticada pela presença de 3 ou mais dentre 5 critérios, não sendo a resistência a insulina fator obrigatório e apresentando a obesidade central como critério importante [31-33].

A alta prevalência de síndrome metabólica tem implicações importantes para a saúde pública uma vez que aumenta o risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2, doenças coronarianas e aumento de mortalidade atribuída a estas doenças [34]. Evidências sugerem que a resistência à insulina acelera o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, incluindo a aterosclerose e hipertensão [35, 36].

Aproximadamente 25% da população geral é portadora de resistência à insulina, e até 80% desses indivíduos também possuem hipertensão essencial [37]. Em uma meta-análise, contando com 951 pacientes, Mottillo et al. (2010) encontrou associação entre a síndrome metabólica e o aumento de 2 vezes no risco de doença cardiovascular, mortalidade cardiovascular, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, além de um aumento de 1,5 vezes no risco de morte por todas as causas.

A ingestão excessiva de frutose tem sido cada vez mais frequente ao longo das últimas décadas, e mesmo que existam evidências de que pequenas quantidades não influenciam o metabolismo de lipídios e carboidratos, quantidades mais elevadas estão sendo associadas às alterações metabólicas caracterizadas por resistência à insulina, hipertensão, hiperlipidemia, acúmulo de gordura visceral e obesidade, assim aumentando o risco para as doenças cardiovasculares [38-42]. Recentemente foi demonstrado que o consumo de bebidas adoçadas com açúcar contendo 10%, 17,5%, ou 25% de xarope de milho, que possui grande concentração de frutose, produziu incremento sérico proporcional de lipoproteínas e ácido úrico em apenas 2 semanas [43].

Tem sido demonstrado que o aumento do número de casos de síndrome metabólica, hoje correspondendo a aproximadamente 23% da população mundial, de acordo com a NHANES [44], pode estar relacionado com o aumento da utilização de frutose e sacarose pelas indústrias alimentícias e o concomitante aumento do seu consumo pela população.

Estudos experimentais têm mostrado que a ingestão de frutose em excesso também está relacionada à HAS e disfunção cardíaca em modelos animais [39-

42, 42]. Porém, os mecanismos envolvidos nos efeitos de uma dieta rica em frutose ainda não foram totalmente esclarecidos [45]. Estudos experimentais têm demonstrado que o consumo elevado de frutose tem sido associado com o desenvolvimento de “síndrome metabólica” em roedores, a qual é caracterizada pela resistência à insulina, hipertensão, hiperlipidemia, acúmulo de gordura visceral e obesidade [39-42].

Estudos clínicos evidenciaram que o consumo excessivo de frutose por um período superior a uma semana aumenta as taxas de triglicerídeos em indivíduos com resistência à insulina e diabetes tipo II [46]. Como a maioria dos estudos utiliza uma quantidade de frutose elevada, os efeitos de sua ingestão em valores reais de consumo de fato ainda são discordantes [47]. Contudo, uma meta-análise que reuniu resultados de diversos estudos que avaliaram os efeitos deletérios da frutose sobre o organismo, chegou à conclusão que uma ingestão de frutose superior a 50g/dia, está relacionada com o aumento dos níveis de triglicerídeos após as refeições e uma ingestão superior a 100g/dia se relaciona com a elevação das taxas de triglicerídeos em jejum [48]. Além disso, um outro estudo apontou que o consumo excessivo de frutose está relacionado com um menor tamanho das partículas LDL em crianças com sobrepeso e obesas [49].

Pesquisas em animais [33, 50-53] apontam claramente a ligação entre consumo excessivo de frutose e o desenvolvimento da síndrome metabólica, além do aumento dos níveis de triglicerídeos [33], redução dos níveis de HDL [50], elevação da pressão arterial [51], e resistência à insulina [33, 50, 51]. Em animais, a frutose ainda pode induzir outras condições associadas à síndrome

metabólica como acúmulo de gordura abdominal [52] e a doença hepática alcoólica não gordurosa [52, 53].

1.3.3. Consumo de frutose e sua relação com a doença hepática gordurosa não-alcoólica

A Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica (DHGNA) é um termo utilizado para definir o acúmulo de gordura nas células do fígado em situações que não há consumo de álcool em excesso. É uma doença comum nas populações ocidentais, com prevalência de aproximadamente 20% [54].

Nos últimos vinte anos, diversos estudos [54-56] relataram que a grande parte dos indivíduos com DHGNA apresentam algumas, se não todas, as alterações que características da síndrome metabólica. Como consequência do aumento do número de casos desta síndrome, é estimado que 15 a 24% da população adulta ocidental apresentem algum grau de DHGNA [55]. A DHGNA é uma condição que geralmente não apresenta sintomas, podendo desta forma atingir um estágio avançado antes de ser notada ou diagnosticada. Grande parte dos portadores da doença é diagnosticada apenas após apresentar hepatomegalia ou, com mais frequência, alterações nos níveis séricos de enzimas hepáticas [54, 56].

A DHGNA está fortemente associada à obesidade, resistência à insulina, hipertensão e dislipidemia, e é considerada como a manifestação do fígado à síndrome metabólica. A rápida disseminação da obesidade em adultos e crianças, juntamente com a percepção de que os resultados de doença

hepática relacionada com a obesidade são inteiramente preocupantes, levou a um rápido desenvolvimento de estudos clínicos e revisões sobre DHGNA [57].

Enquanto a grande maioria dos indivíduos com obesidade, resistência à insulina e síndrome metabólica desenvolverão esteatose, apenas uma pequena parte não irá desenvolver esta condição. Os principais determinantes ambientais para o desenvolvimento da DHGNA são fatores relacionados à dieta [58]. Estudos recentes têm mostrado que as dietas com alta ingestão de gordura saturada, refrigerantes e carne, e baixa ingestão de micronutrientes essenciais estão associadas com um risco aumentado de desenvolver a doença em questão [59-61].

A frutose tem a capacidade de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio, que quando associadas a outras reservas hepáticas de pró-oxidantes podem contribuir para a evolução da esteatose para sua forma mais grave [62]. Estudos com humanos sugerem que indivíduos com DHGNA, principalmente os que apresentam danos mais graves no fígado (esteato-hepatite não alcoólica) consomem mais carboidratos, em especial a frutose, em sua dieta em comparação com indivíduos saudáveis [63].

A investigação do padrão dietético de indivíduos portadores de DHGNA demonstrou que esses indivíduos consomem quantidades elevadas de carboidrato e de bebidas industrializadas, adoçadas comumente com frutose [55, 64]. Grande parte dos pacientes apresentou ingestão de carboidratos duas vezes maior do que a recomendada, > 600 mg/dia, e este padrão alimentar apresentava relação direta com a evolução da esteatose hepática [55, 64]. Outro estudo realizado com crianças e adolescentes portadoras de DHGNA,

também com o intuito de traçar o padrão dietético dos portadores da doença, mostrou baixa ingestão de vitaminas C e E, além da relação entre níveis séricos elevados de ácido úrico e consumo de frutose na dieta, ingerida pelo consumo dos produtos industrializados adoçados com xarope de milho que é rico em frutose, como salgadinhos, cereais matinais e biscoitos [63, 65].

1.4. JUSTIFICATIVA

A relação de causa/efeito entre a hipertensão e a doença hepática, em muitos indivíduos, parece ser a síndrome metabólica. É comprovado que o alto consumo de frutose por um longo período causa alterações metabólicas em humanos e em animais de experimentação. Considerando isto, e o fato de que o consumo excessivo de frutose ocorre tanto em indivíduos normotensos como em hipertensos, levantamos a hipótese de que a ingestão excessiva de frutose em ratos espontaneamente hipertensos pode ter um impacto pior quando comparado aos ratos normotensos. Assim, nos propusemos a investigar os efeitos da ingestão crônica de frutose em ratos normotensos e hipertensos.

Os resultados desse estudo irão permitir avançar no conhecimento dos efeitos do consumo excessivo de frutose associado à hipertensão essencial e a possível relação com o desenvolvimento da esteatose hepática. Esse conhecimento ajudará na validação do cuidado com o consumo de industrializados com adição de frutose e na compreensão do curso de desenvolvimento das alterações metabólicas produzidas pela ingestão de grandes quantidades deste açúcar.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da dieta crônica com frutose no desenvolvimento das alterações metabólicas e da doença hepática gordurosa não-alcoólica em ratos normotensos e hipertensos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar se a dieta crônica com frutose em animais normotensos e hipertensos:

- I. Acelera o desenvolvimento da hipertensão arterial;
- II. Influencia na deposição de gordura abdominal;
- III. Acelera o desenvolvimento da doença hepática gordurosa não-alcoólica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO E DELINEAMENTO DO ESTUDO

Os animais submetidos ao estudo foram condicionados em uma sala apropriada para criação de animais, com condições de temperatura, umidade e ciclo claro-escuro rigorosamente controladas. Os protocolos associados a essa pesquisa foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (UFES-ES), sob projeto nº 045/2014.

Ratos Wistar e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) machos, provenientes do Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, com seis semanas de idade, foram divididos aleatoriamente em grupos experimentais: dois grupos Wistar e dois grupos SHR, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Grupos experimentais, amostra utilizada por grupo e descrição do tratamento que foi realizado em cada grupo

GRUPO EXPERIMENTAL	N	DESCRIÇÃO DO TRATAMENTO
Controle Wistar (C)	32	Os animais foram tratados com ração padrão e água (grupos controle) e ração padrão e frutose 10% em água potável (grupos frutose), por seis semanas [25].
Frutose Wistar (F)	32	
Controle SHR (SHR-C)	32	
Frutose SHR (SHR-F)	32	

Os animais foram pesados antes do início do protocolo e semanalmente, até a sexta semana. Foram condicionados em gaiolas higienizadas adequadamente e com no máximo quatro animais por gaiola.

3.2. AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE ÁGUA E RAÇÃO E DO VOLUME URINÁRIO

Avaliações do consumo de água e ração, e coleta do volume urinário foram realizadas no início e a cada 15 dias durante o protocolo. Os animais foram individualmente colocados em gaiolas metabólicas (TECNIPLAST, ITALIA) por 24 horas, após um período de adaptação de 24 horas [38]. O consumo de ração foi avaliado em balança com precisão de 0,1 gramas. O volume de água e de urina foi medido em proveta com precisão de 0,5 ml.

A determinação da quantificação de sódio e potássio foi realizada por meio da utilização de eletrodos íon seletivos (ISE) e a excreção destes íons foi calculada com base no volume excretado em 24 horas.



Figura 2. Gaiola metabólica utilizada para quantificar consumo de ração, ingestão de líquido e excreção urinária.

3.3. MEDIDAS NÃO INVASIVAS DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida em 4 momentos durante o protocolo experimental: início e a cada quinze dias até a sexta semana do estudo.

As medidas foram obtidas em animais livres de efeito anestésico ou analgésico, por meio de método indireto não invasivo. Em um pletismógrafo, os animais foram acondicionados em uma câmara aquecida, com um *cuff* de pulso pneumático acoplado na região proximal da cauda. Um esfigmomanômetro foi insuflado e desinsuflado automaticamente, e o valor da pressão arterial sistólica (PAS) foi obtido através dos sinais do transdutor acoplado a um computador [66-68]. Ao menos 5 medidas válidas foram obtidas de cada animal, e o valor de PAS foi dado como a média entre essas 5 medidas. Todos

os animais foram adaptados ao procedimento por 5 dias antes da obtenção de registros.

3.4. GLICEMIA EM JEJUM, TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE E TESTE DE SENSIBILIDADE A INSULINA

A glicemia foi avaliada antes do início do estudo e a cada quinze dias até o final do estudo (basal, 15 dias, 30 dias e 45 dias). O animal foi submetido ao jejum por um período de aproximadamente 12-14 horas, no período noturno, antes da realização do teste. Isso por que o animal escolhido para o estudo possui hábitos noturnos, então, o intuito do jejum neste horário foi o de privar, de fato, o animal da dieta, considerando que durante o dia o consumo de solução de frutose e ração é reduzido [61].

O teste de tolerância a glicose foi realizado em 50% dos animais de cada grupo e o teste de sensibilidade à insulina nos outros 50%. Estes testes foram realizados ao final das seis semanas do estudo e consistem, respectivamente, na aferição das variações na glicemia após administração de glicose (2 mg/Kg) por via intraperitoneal, nos tempos 5', 10', 15', 20', 30', 60', 90' e 120' após a administração; e na aferição das variações da glicemia após a administração de insulina (insulina regular, Lilly France SAS) via intraperitoneal (1 U/Kg), nos tempos 5', 10', 15', 20', 30', 60', 90' e 120' após a administração. Para a aferição dos valores de glicemia, foi utilizado um glicosímetro (ACCU-CHEK, Roche, Alemanha). O teste de tolerância à glicose foi realizado após jejum de

12-14 horas, e o teste de sensibilidade à insulina foi realizado após jejum de 6 horas [25, 65].

3.5. COLETA DE SANGUE E VISCERAS

Ao final do protocolo de 6 semanas, os animais foram submetidos a eutanásia por sobrecarga anestésica. Antes, foi realizada coleta de sangue, por punção cardíaca, para análise do perfil lipídico e de enzimas hepáticas. Além disso, vísceras foram pesadas e coletadas para análise posterior. Foram coletados para pesagem o pulmão, fígado, rim, coração e gorduras mesentérica, epididimal e retroperitoneal. Parte do fígado foi pesado e guardado para análises histológicas posteriores [69,70].

3.6. EXAMES BIOQUÍMICOS

Para análises bioquímicas [36, 70] foi utilizado o Analisador Automático de Bioquímica BS120 (Bioclin – Mindray), que segue como princípio o método de espectrofotometria que consiste em um método de análise óptico. Para determinação do colesterol foi utilizado o kit Colesterol Monoreagente K083 (Bioclin – Mindray), para quantificação do HDL foi usado o kit HDL Direto K071 (Bioclin – Mindray), para determinação de TGP foi utilizado o kit Transminse ALT (TGP) Cinética K049 (Bioclin – Mindray), para determinação de TGO foi utilizado o kit Transminse AST (TGO) Cinética K048 (Bioclin – Mindray), para a quantificação de triglicerídeos foi utilizado o kit Triglicérides Monoreagente

K117 (Bioclin – Mindray). Todos os testes realizados tratam-se de testes enzimáticos colorimétricos.

3.7. HISTOLOGIA

Os fígados foram removidos e fixados em solução de formol tamponado a 4% durante 48 h, em seguida, cortados transversalmente, com uma espessura de 10 µm em um criostato - 25 ° C (Jung CM 1860, Leica, Wetzlar, Alemanha). As secções foram montadas em lâminas e coradas com Oil Red-O-(Sigma-Aldrich revestidos por gelatina, St. Louis, MO) para a detecção de lípidos neutros, para a análise morfológica que foi realizada por um investigador independente. Além disso, cortes de fígado eram embebidos em parafina e seccionados a 5 µm de espessura, as lâminas foram coradas com Picrosirius vermelho para a coloração de colágeno específico, para avaliar o conteúdo de colágeno no fígado. As imagens foram capturadas com uma câmera de vídeo (AxioCam ERc5s, Carl Zeiss, Alemanha) acoplado a um microscópio óptico (AX70, Olympus Corporation, Japão) usando a objetiva 20 x e a quantificação foi realizada utilizando o software Image J. (National Institutes of Health, Bethesda, EUA). Para cada análise, 8 diferentes cortes por animal foram aleatoriamente utilizados. Para todas as análises histológicas e morfométricas dos grupos experimentais, o examinador não tinha o conhecimento dos grupos experimentais.

3.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram apresentados pela média \pm erro padrão da média. Análise de variância (ANOVA) de dois fatores foi utilizada para comparação das médias. Em caso de diferença significativa no teste F, a correção de Bonferroni foi utilizada para comparações específicas.

Foram adotados valores de $P < 0,05$ como sendo estatisticamente significantes. As análises estatísticas foram conduzidas com o auxílio do programa SPSS® (v. 20, Chicago, USA).

4. RESULTADOS

4.1. PRESSÃO ARTERIAL E RESISTÊNCIA INSULÍNICA EM RATOS HIPERTENSOS E NORMOTENSOS

Com o objetivo de estabelecer características gerais e parâmetros de comparação entre os animais normotensos e hipertensos, os valores obtidos nas avaliações de pressão arterial sistólica, glicemia em jejum, teste de tolerância à glicose e teste de sensibilidade à insulina foram comparados.

4.1.1. Medida não-invasiva da pressão arterial sistólica

No início do protocolo, os animais hipertensos já apresentavam PAS significativamente mais elevada que os animais normotensos ($145,9 \pm 5,6$ vs $120,8 \pm 7,5$). No animal hipertenso, a PAS aumentou progressivamente no decorrer das seis semanas de estudo; progressão esta não observada nos animais normotensos (Figura 3).

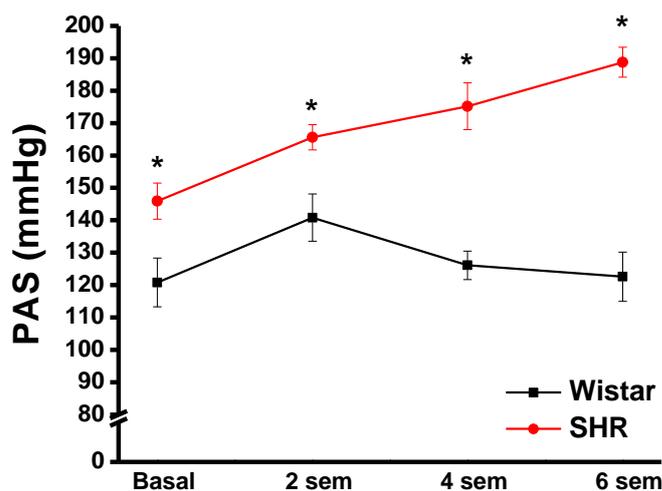


Figura 3. Pressão arterial de ratos normotensos e hipertensos ao longo de seis semanas de tratamento. * $P < 0,05$ vs. ratos Wistar.

4.1.2. Avaliação da glicemia após 12-14 horas de jejum

A avaliação dos níveis de glicemia em jejum dos grupos hipertenso e normotenso foi avaliada antes do início do protocolo e a cada duas semanas, até o final do estudo. Observamos que nos animais hipertensos, os níveis de glicemia em jejum mantiveram-se ligeiramente inferiores quando comparados aos animais normotensos, exceto na última aferição (sexta semana de acompanhamento) (Figura 4).

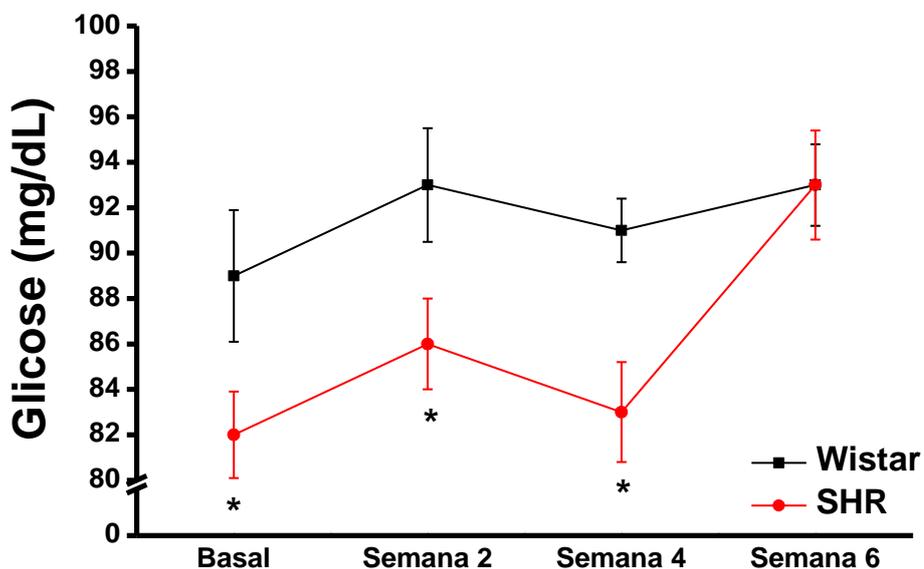


Figura 4. Glicemia em Jejum de ratos normotensos e hipertensos ao longo de seis semanas de seguimento. * $P < 0,05$ vs. ratos Wistar.

4.1.3. Testes de tolerância à glicose e de sensibilidade à insulina

Ao final do protocolo experimental, avaliamos a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina dos animais normotensos e hipertensos. Para isto o teste de tolerância à glicose foi realizado com a aplicação de uma injeção de glicose (2 mg/kg, *ip*), após jejum de 12-14 horas. A Figura 5 apresenta o curso temporal dos níveis séricos de glicose, após a injeção intraperitoneal. É possível observar que os níveis basais de glicemia são semelhantes; porém, após a infusão de uma solução concentrada de glicose, a elevação nos níveis glicêmicos nos animais hipertensos foi menor que nos animais normotensos.

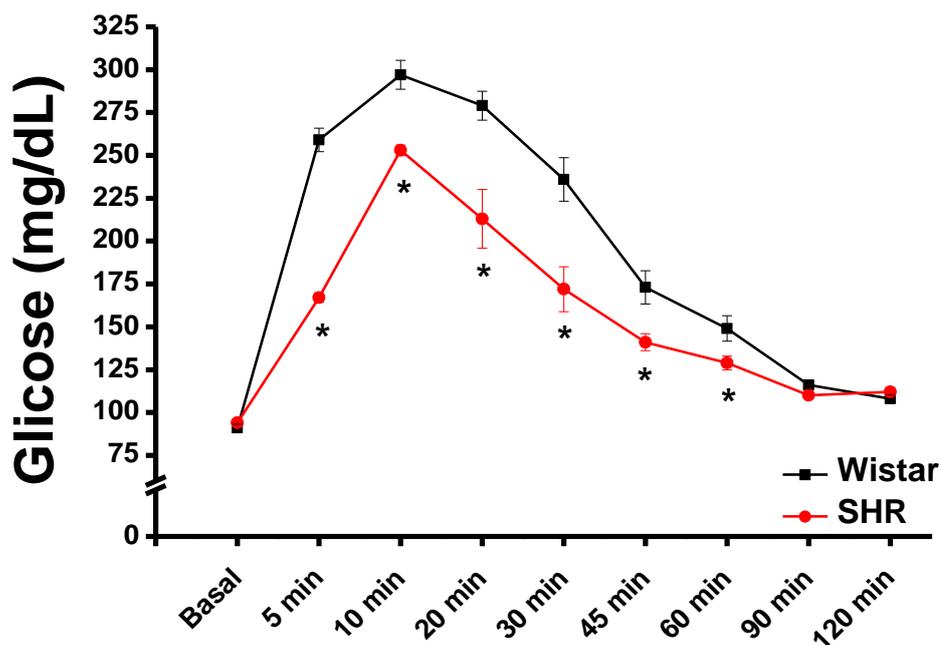


Figura 5. Curso temporal dos níveis séricos de glicose, após injeção de glicose (2 mg/kg, *ip*). * $P < 0,05$ vs. ratos Wistar.

Para o teste de sensibilidade à insulina, cujo resultado está apresentado na Figura 6, os níveis plasmáticos de glicose foram avaliados após a injeção intraperitoneal de insulina (1 U/kg, *ip*), nos animais em jejum de 6 horas. Observamos que os níveis de glicemia após a injeção de insulina foi menor nos animais hipertensos.

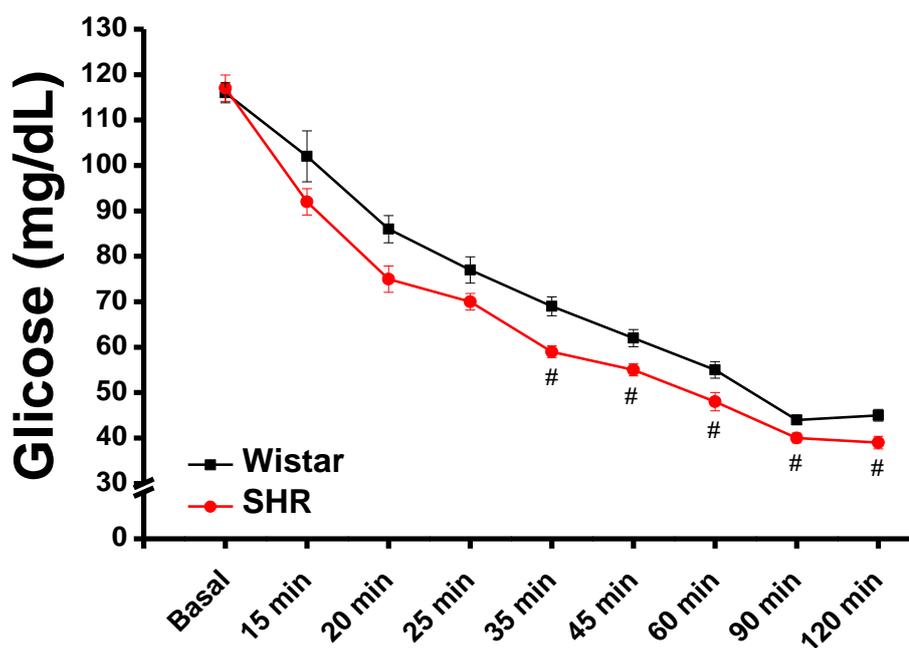


Figura 6. Curso temporal dos níveis séricos de glicose, após injeção de insulina (1 U/kg, *ip*). # $P < 0,05$ vs. ratos normotensos.

4.2. EFEITOS DA ALTA INGESTÃO DE FRUTOSE SOBRE A INGESTÃO DE ÁGUA E ALIMENTOS E PESO CORPORAL DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

4.2.1. *Consumo alimentar e energético*

Com o objetivo de avaliar a ingestão de água e alimento dos animais submetidos ao estudo, os ratos foram condicionados em gaiolas metabólicas individuais, antes do início do protocolo e a cada duas semanas (Figura 7). Foi observado um aumento progressivo do consumo de ração nos grupos controle, tanto normotensos quanto hipertensos (Figura 7A). Porém, nos grupos que receberam solução de frutose 10%, não houve alteração no padrão de consumo alimentar durante as seis semanas de tratamento. Em contra partida, quando analisamos o consumo de água, notamos que os animais tratados cronicamente com frutose apresentaram aumento significativo na ingestão da solução de frutose quando comparados aos seus respectivos controles, tratados com água (Figura 7B). Com as alterações observadas no consumo de ração e água, fez-se necessário avaliar o consumo energético.

O consumo energético foi calculado com base na ingestão diária de ração e ingestão de frutose. O consumo energético foi significativamente maior nos animais que receberam frutose, tanto em normotensos e hipertensos, no último período de análise (Figura 7C).

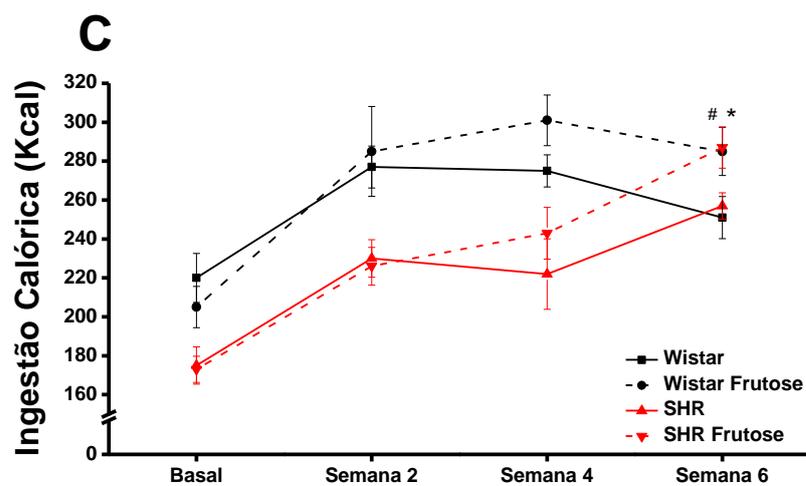
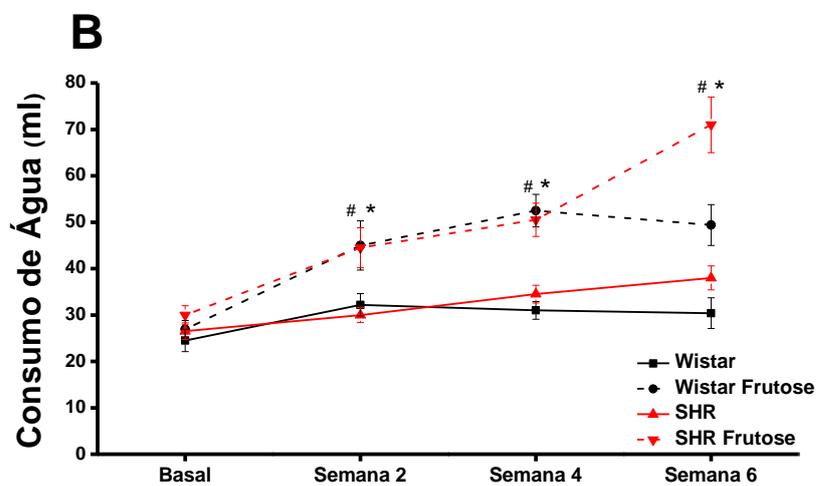
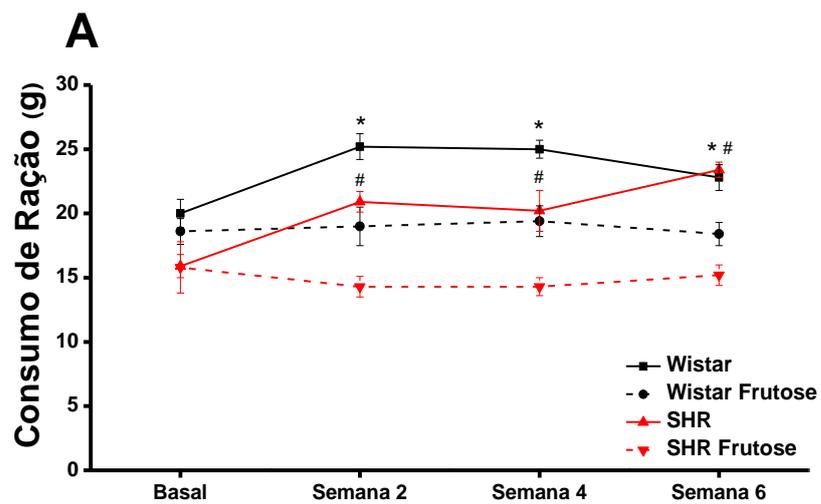


Figura 7. Ingestão de água e alimento dos animais submetidos ao estudo. (A) Consumo diário de ração dos grupos normotenso e hipertenso controle e normotenso e hipertenso frutose. (B) Consumo diário de água ou solução de frutose dos animais normotensos e hipertensos dos grupos controle e frutose. (C) Consumo energético de animais normotensos e hipertensos dos grupos controle e frutose. As comparações foram realizadas entre os grupos entre os grupos controle e frutose da mesma linhagem. # $P < 0,05$ ratos controle vs. ratos frutose normotensos.* $P < 0,05$ ratos controle vs. ratos frutose hipertensos.

4.2.2. Análise temporal do ganho de peso em animais normotensos e hipertensos submetidos à dieta crônica com frutose

A curva temporal de ganho de peso está apresentada na Figura 8. A diferença de peso observada entre os animais hipertensos e normotensos já era esperada, visto que os animais hipertensos são naturalmente menores que os animais normotensos em todos os períodos da vida [12].

Apesar das diferenças encontradas no padrão de consumo energético entre os animais submetidos ou não à dieta crônica com frutose, não foram observadas alterações significativas associadas ao tratamento com frutose no ganho de peso dos animais (Figura 8).

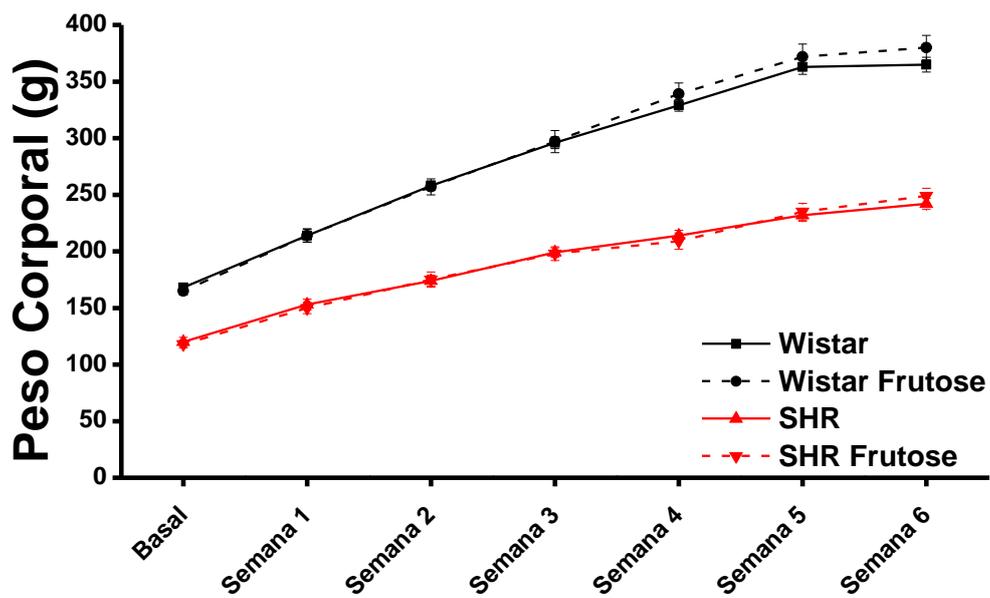


Figura 8. Evolução do peso corporal dos animais normotensos e hipertensos dos grupos controle e frutose.

4.2.3. Excreção urinária de Na^+ e K^+

O padrão de ingestão alimentar observado nos grupos tratados com frutose provocou redução significativa da excreção de Na^+ (Figura 9A) e K^+ (Figura 9B) urinário. Este padrão de ingestão de alimentos foi observado tanto em animais hipertensos quanto em normotensos.

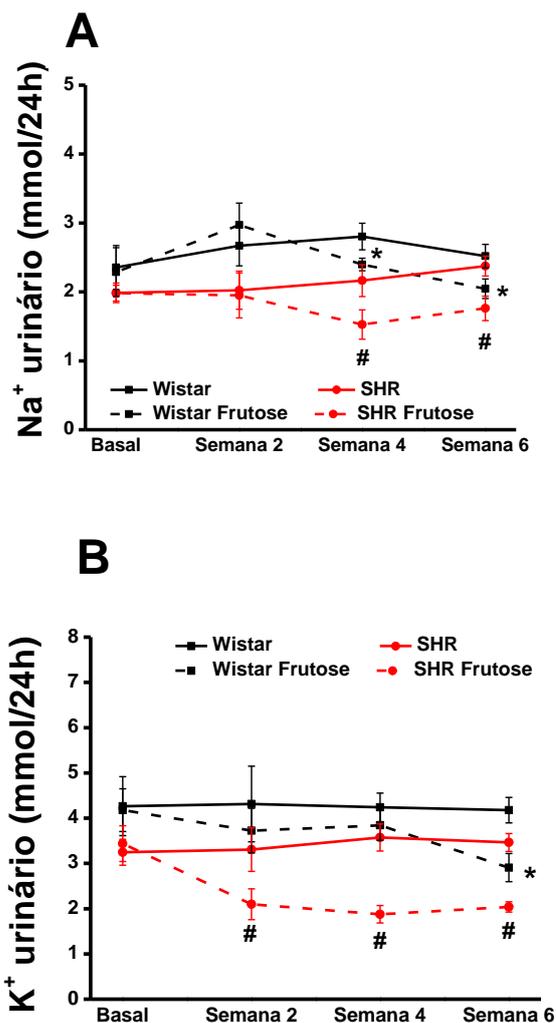


Figura 9. (A) Excreção de sódio urinário em 24 horas (B) Excreção de potássio urinário. # $P < 0,05$ ratos hipertensos vs. ratos normotensos. * $P < 0,05$ ratos hipertensos vs. ratos normotensos, sob ingestão de frutose.

4.3. EFEITOS DA ALTA INGESTÃO DE FRUTOSE SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL, GLICEMIA EM JEJUM, TOLERÂNCIA A GLICOSE E RESISTÊNCIA À INSULINA DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

4.3.1. Efeitos da dieta crônica com frutose sobre a PAS de animais normotensos e hipertensos

Com o objetivo de avaliar os efeitos da dieta rica em frutose sobre a PAS em ratos normotensos e hipertensos, a PAS foi aferida de forma não-invasiva em quatro momentos ao longo do estudo. Observamos que seis semanas sob alta ingestão de frutose não foram suficientes para promoverem alterações na PAS de animais normotensos e hipertensos (Figura 10).

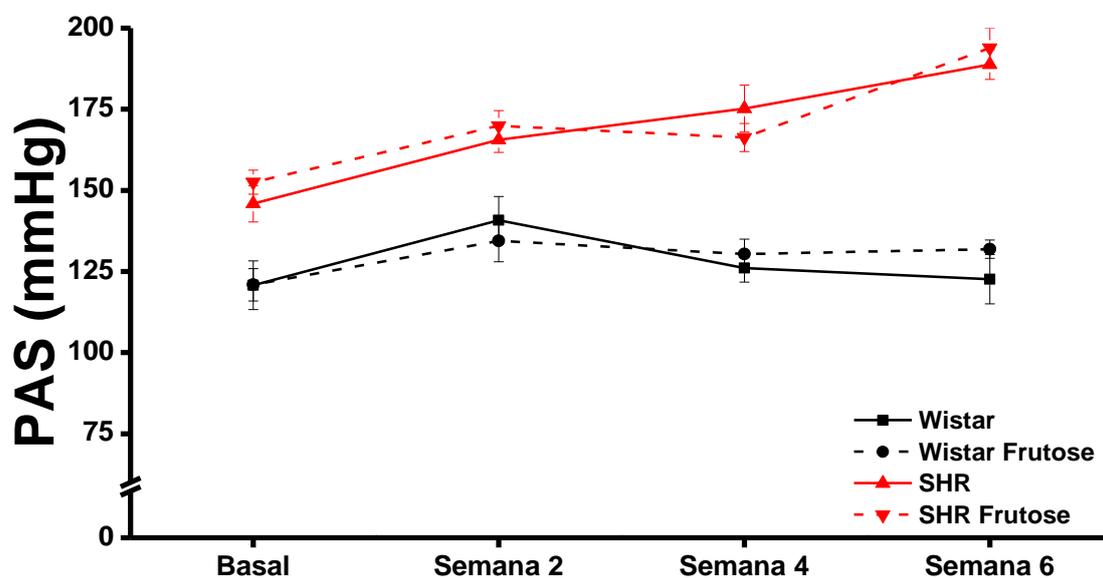


Figura 10. Pressão arterial de ratos normotensos e hipertensos, dos grupos controle e frutose, ao longo de seis semanas de tratamento.

4.3.2. Avaliação da glicemia de jejum, tolerância à glicose e sensibilidade à insulina em animais normotensos e hipertensos após ingestão crônica de frutose

A glicemia foi avaliada após jejum de 12-14 horas, conforme descrito na metodologia. Como pode ser observado na Figura 11, a ingestão crônica de frutose aumenta de forma sustentada a glicemia tanto em animais hipertensos como em animais normotensos.

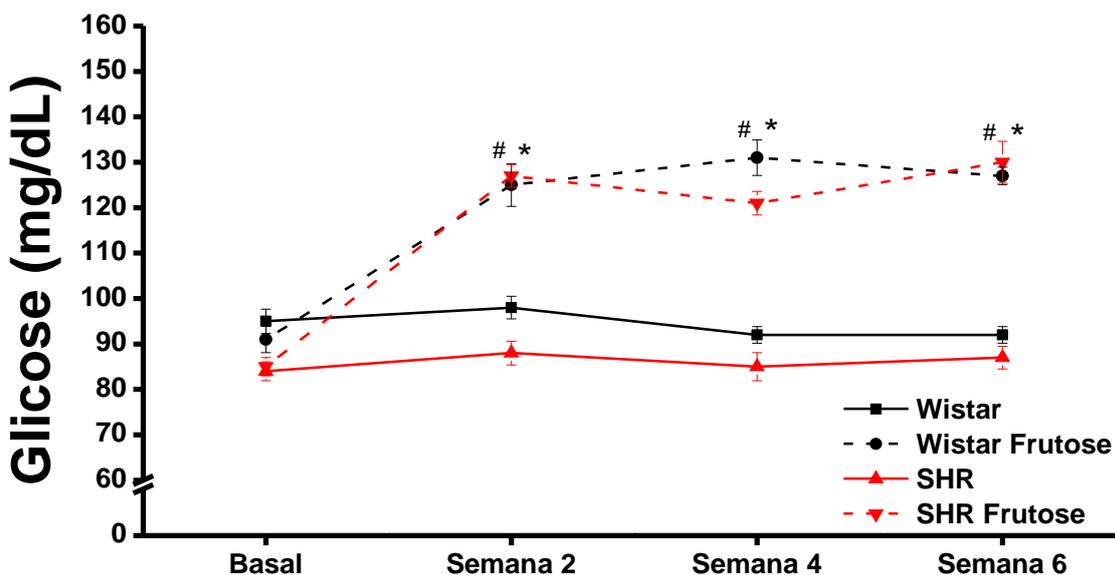


Figura 11. Glicemia em Jejum de ratos normotensos e hipertensos ao longo de seis semanas de tratamento. # $P < 0,05$ vs. ratos normotensos. * $P < 0,05$ vs ratos hipertensos, sob ingestão de frutose.

A Figura 12A, que representa o curso temporal dos níveis séricos de glicose após injeção de glicose (2 mg/kg, ip) mostra que os animais submetidos à dieta crônica com frutose apresentam menor tolerância à glicose, uma vez que os níveis de glicemia apresentados em cada ponto da curva estão mais elevados que seus respectivos controles.

A área abaixo da curva confirma que a dieta rica em frutose aumenta menor tolerância à glicose (Figura 12B).

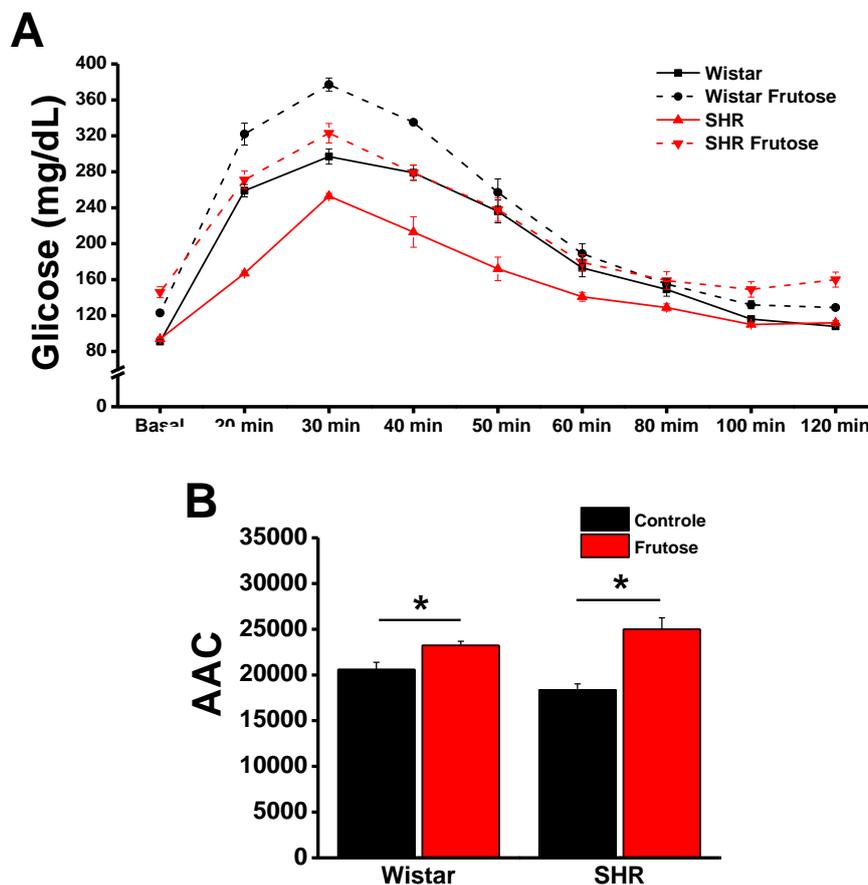


Figura 12. (A) Curso temporal dos níveis séricos de glicose, após injeção de glicose (2 mg/kg, ip). (B) Área abaixo da curva, dos níveis séricos de glicose, após injeção de glicose (2 mg/kg, ip)* $P < 0,05$ vs ratos controle.

Foi também realizado o teste de sensibilidade à insulina, após a injeção intraperitoneal de insulina (1 U/kg, *ip*) nos animais em jejum de 6 horas. Observamos que os animais tratados com frutose, independentemente se normotensos ou hipertensos, apresentaram menor sensibilidade à insulina, apresentando valores de glicemia mais elevados durante toda a curva quando comparados aos respectivos controles (Figura 13A e 13B).

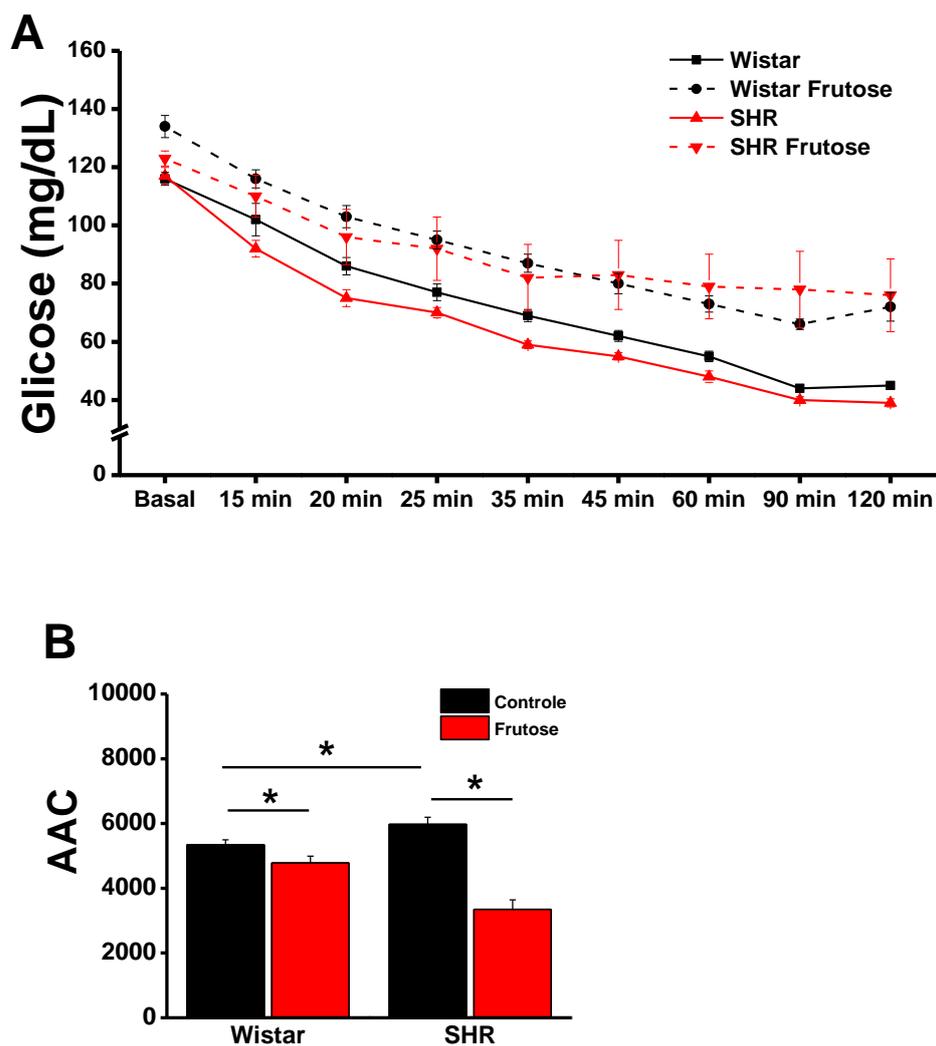


Figura 13. (A) Curso temporal dos níveis séricos de glicose, após injeção de insulina (1 U/kg, *ip*). (B) Área abaixo da curva, dos níveis séricos de glicose, após injeção de insulina (1 U/kg, *ip*). * $P < 0,05$ vs ratos controle.

4.4. EFEITOS DA ALTA INGESTÃO DE FRUTOSE SOBRE A MASSA MAGRA E DEPOSIÇÃO DE GORDURA CORPORAL DE ANIMAIS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

4.4.1. *Avaliação da massa magra em animais normotensos e hipertensos submetidos à dieta crônica com frutose*

Para análise da alta ingestão de frutose sobre a massa magra dos animais submetidos ao estudo, foram coletados os músculos gastrocnêmio e peitoral maior dos ratos após seis semanas de tratamento.

É possível observar na Figura 13 que os animais hipertensos possuem o volume de massa magra significativamente menor que os animais normotensos, observado pelo peso do músculo peitoral nos animais hipertensos ser ligeiramente menor (sem diferença estatisticamente significante) que dos animais normotensos (Figura 14A). Além disso, o músculo gastrocnêmio foi significativamente menor nos animais hipertensos (Figura 14B). No entanto, a alta ingestão de frutose por seis semanas não provocou alterações na massa magra dos animais estudados.

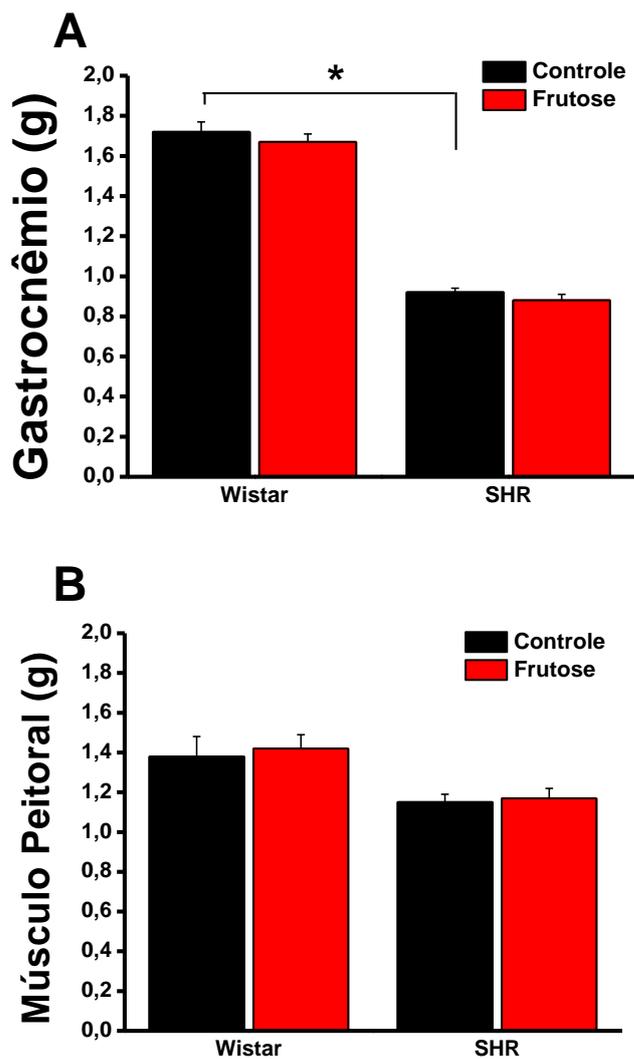


Figura 14. Massa magra de animais normotensos e hipertensos submetidos ao estudo. (A) Músculo Gastrocnêmio de animais normotensos e hipertensos dos grupos controle e frutose. (B) Músculo Peitoral de animais normotensos e hipertensos dos grupos controle e frutose. * $P < 0,05$ vs ratos normotensos.

4.4.2. Efeitos da dieta crônica com frutose na deposição de gordura visceral em animais normotensos e hipertensos

Como observado na Figura 15, os animais normotensos submetidos à dieta rica em frutose apresentam deposição de gordura abdominal total significativamente maior que seus controles. Além disso, os animais normotensos apresentam acúmulo de gordura significativamente maior que os animais hipertensos. Porém, o tratamento com frutose não alterou significativamente a deposição de gordura visceral em animais hipertensos (Figura 15).

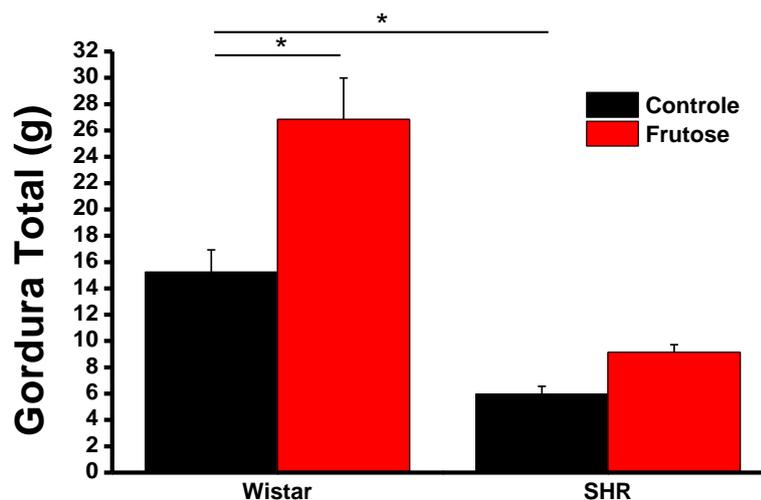
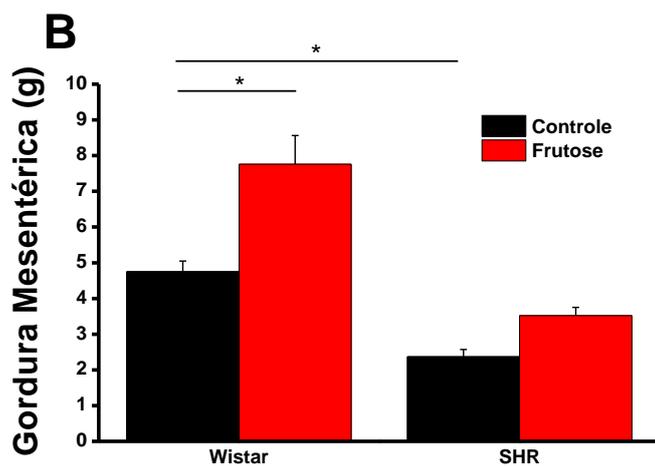
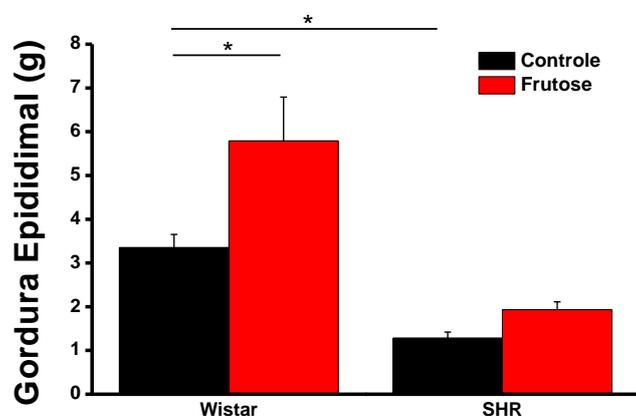


Figura 15. Deposição de gordura abdominal total de animais normotensos e hipertensos submetidos ao estudo. * $P < 0,05$ vs ratos normotensos controle.

Também foi avaliada a deposição específica de gordura visceral dos animais submetidos ao tratamento de seis semanas. A coleta de gordura foi realizada em três diferentes sítios: epididimal (Figura 16A), mesentérica (Figura 16B) e retroperitoneal (Figura 16C). Em animais normotensos, a dieta crônica com frutose aumentou significativamente a deposição de gordura em todos os 3 sítios avaliados (Figura 16 A – C). Esse aumento, porém, não foi observado em animais hipertensos.



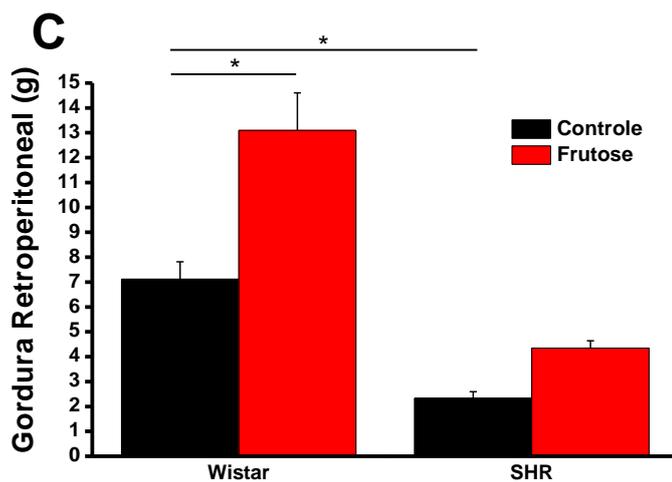


Figura 16. Deposição de gordura abdominal de animais normotensos e hipertensos submetidos ao estudo. (A) Deposição de gordura epididimal de animais normotensos e hipertensos dos grupos controle e frutose. (B) Deposição de gordura mesentérica de animais normotensos e hipertensos dos grupos controle e frutose. (C) Deposição de gordura retroperitoneal de animais normotensos e hipertensos dos grupos controle e frutose. * $P < 0,05$ vs ratos normotensos controle.

4.5. EFEITOS DA ALTA INGESTÃO DE FRUTOSE SOBRE PARÂMETROS PLASMÁTICOS DE ANIMAIS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

A dieta crônica com frutose por seis semanas causou alterações em diversos parâmetros plasmáticos dos animais normotensos e hipertensos, apresentadas na Tabela 2.

As seis semanas de tratamento com a dieta crônica de frutose foi suficiente para aumentar significativamente os níveis plasmáticos de triglicerídeos. Os níveis séricos de glicose, como já relatado anteriormente neste trabalho, também foram aumentados em animais normotensos e hipertensos após dieta crônica com frutose. Além disso, a sobrecarga de frutose não modificou os níveis de colesterol total nos animais normotensos. Já os animais hipertensos submetidos à alta ingestão de frutose, houve uma elevação significativa dos níveis plasmáticos de colesterol. Não foram observadas alterações nos níveis de HDLc.

Sobre os níveis das transaminases hepáticas, AST e ALT, a dieta crônica com frutose não foi suficiente para provocar alterações significativas nos níveis plasmáticos destas enzimas. Porém, os animais hipertensos apresentam níveis séricos aumentados de ALT quando comparados aos normotensos, mas sem influência da frutose nesse resultado.

TABELA 2. Parâmetros plasmáticos de animais normotensos e hipertensos, após seis semanas de tratamento com dieta rica em frutose

	WISTAR		SHR	
	Controle	Frutose	Controle	Frutose
Glicemia (mg/dL)	93±2	127±2*	93±2	127±3†
Colesterol (mg/dL)	75.2±5.6	68.5±7.1	63.3±3.1	76.1±3.3†
HDLc (mg/dL)	25.5±1.4	26.6±2.7	24.1±0.8	26.8±16.5
Triglicerídeos (mg/dL)	105±13.5	286.4±56.3*	41.8±1.6#	101.8±6.2†
ALT (U/L)	66.4±7.5	69.2±3.4	169.9±15.3#	195.8±26.9
AST (U/L)	43.8±5.2	36.9±1.6	50.8±3.3	53.5±3.7

$P < 0,05$ vs. ratos normotensos. * $P < 0,05$ ratos normotensos vs ratos hipertensos. † $P < 0,05$ vs. ratos hipertensos controle.

4.6. EFEITOS DA ALTA INGESTÃO DE FRUTOSE SOBRE PESO DOS ÓRGÃOS DE ANIMAIS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

Foram coletados ventrículos, rim, fígado e pulmões. A tíbia foi coletada para a correção dos valores (Tabela 3). Os animais hipertensos apresentaram comprimento da tíbia, peso dos ventrículos e do rim naturalmente menores que os animais normotensos, e o tratamento de seis semanas com a dieta rica em frutose não foi suficiente para causar alterações nos pesos destes órgãos. Não foi encontrada diferença no peso dos pulmões.

TABELA 3. Peso dos órgãos de ratos normotensos e hipertensos após seis semanas de tratamento com alta ingestão de frutose.

	WISTAR		SHR	
	Controle	Frutose	Controle	Frutose
Tíbia (cm)	4,10±0,02	4,11±0,03	3,69±0,02#	3,63±0,02
Ventrículos/tíbia (g/cm)	0,256±0,017	0,238±0,014	0,216±0,005#	0,222±0,007
Fígado/tíbia (g/cm)	0,274±0,011	0,260±0,008	0,217±0,004#	0,202±0,004
Rim/tíbia (g/cm)	2,40±0,18	3,31±0,17*	2,11±0,04	2,66±0,08†
Pulmões/tíbia(g/cm)	0,36±0,01	0,37±0,01	0,39±0,01	0,39±0,01

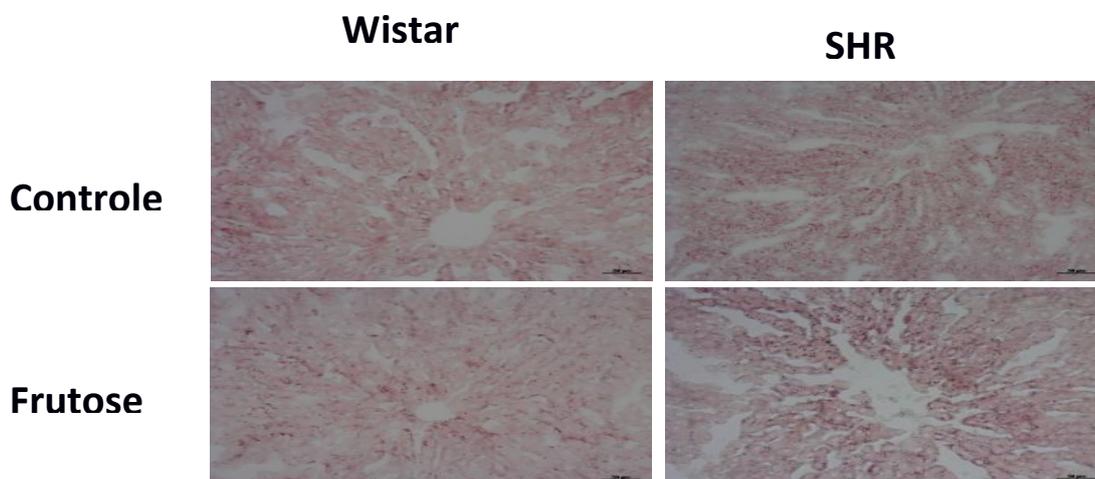
$P < 0,05$ vs. ratos normotensos. * $P < 0,05$ ratos normotensos vs ratos hipertensos. † $P < 0,05$ vs. ratos hipertensos, sob ingestão de frutose.

4.7. EFEITO DO CONSUMO CRÔNICO DE FRUTOSE NA INDUÇÃO DE DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO – ALCOÓLICA EM ANIMAIS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

Para análise do efeito do consumo de frutose por seis semanas na indução da doença hepática gordurosa não-alcoólica, foi realizada a análise histológica do fígado com intuito de avaliar a deposição de gordura e fibrose no órgão dos animais submetidos ao tratamento por seis semanas.

4.7.1. Efeito da frutose na deposição de gordura no fígado de ratos normotensos e hipertensos

A alta ingestão de frutose em animais normotensos não promoveu aumento na deposição de gordura hepática. Porém, ao avaliarmos os animais hipertensos, observamos que a dieta rica em frutose foi suficiente para aumentar a deposição de gordura no fígado destes animais quando comparados ao seu grupo controle e ao grupo normotenso (Figura 17).



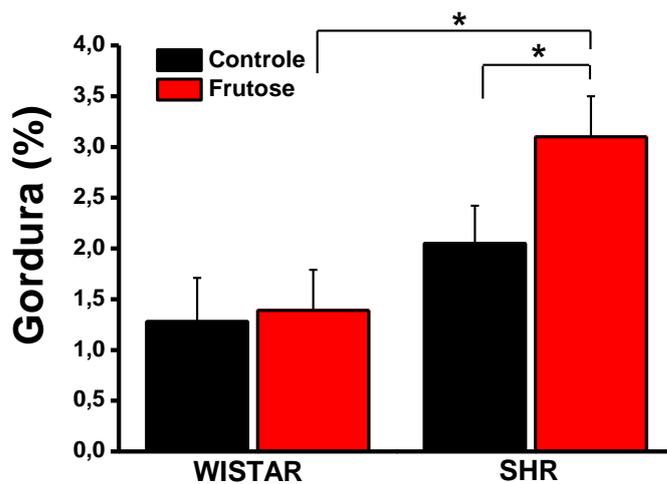


Figura 17. Efeito do consumo crônico de frutose na indução de doença hepática gordurosa não - alcoólica. Imagens histológicas representativas de tecido de fígado coradas com Vermelho de Óleo O, de ratos normotensos e hipertensos submetidos a dieta rica em frutose foram. Escala : 50 mm . * $P < 0,05$.

4.7.2. Efeito da frutose na indução de fibrose intersticial no fígado de animais normotensos e hipertensos

A dieta crônica com frutose por seis semanas promoveu aumento da fibrose hepática nos animais hipertensos, mas não nos animais normotensos. Nos animais normotensos, a frutose não promoveu proliferação de fibrose no fígado (Figura 18).

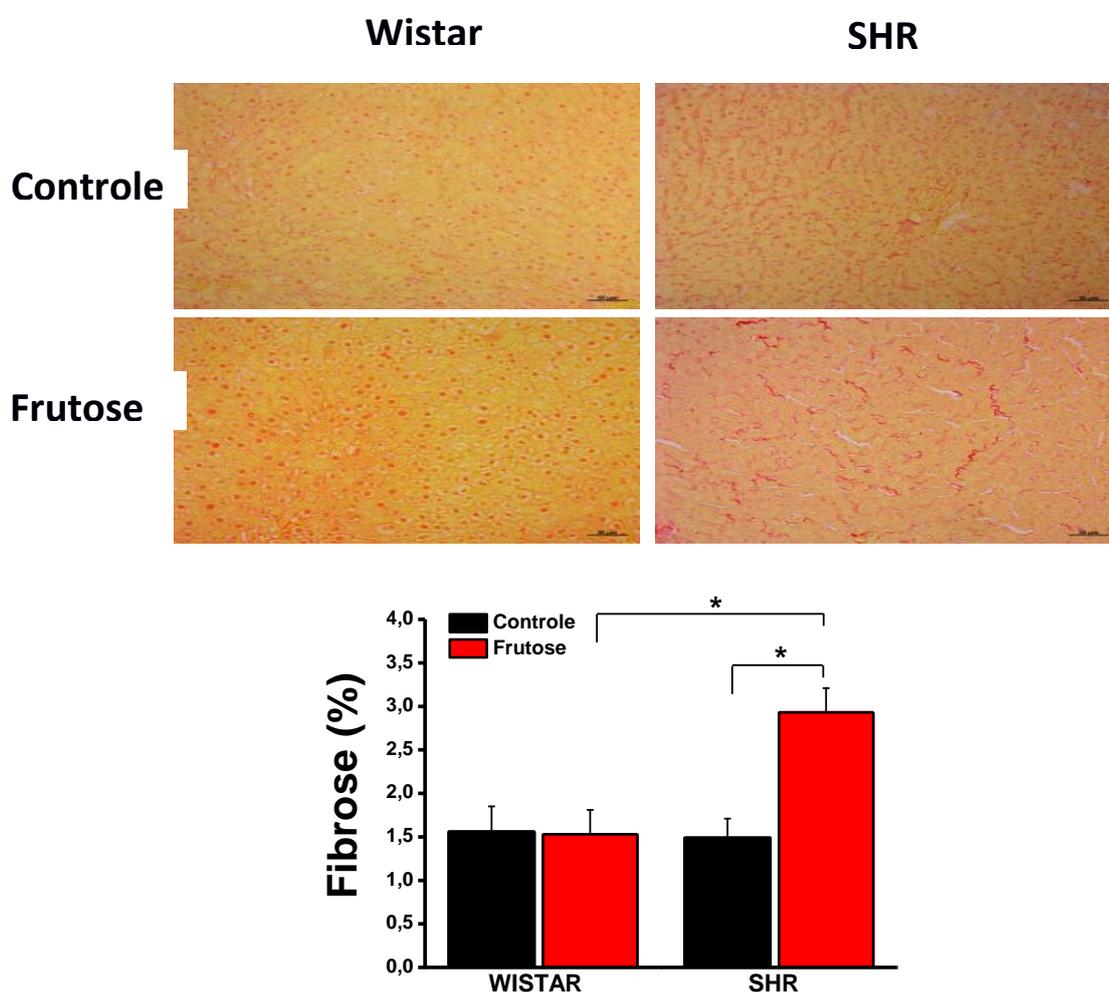


Figura 18. Efeito do consumo crônico de frutose na indução de doença hepática gordurosa não - alcoólica. Imagens histológicas representativas de tecido de fígado coradas com com Picrosirius red (painel inferior) de ratos normotensos e hipertensos submetidos a dieta rica em frutose foram. Escala : 50 mm . * $P < 0,05$

5. DISCUSSÃO

5.1. DIFERENÇAS ENTRE WISTAR E SHR

Animais Wistar e SHR são naturalmente diferentes quanto ao peso corporal, pressão arterial, fatores que independem da dieta ou tratamento ofertado. Mesmo com as diferenças naturais, os animais Wistar são frequentemente utilizados como controle normotenso de animais SHR [69-71].

Para desenvolvimento deste trabalho foram utilizados ratos Wistar, como modelo de animal normotenso, e ratos SHR, que é um modelo amplamente utilizado para a identificação de parâmetros hemodinâmicos e metabólicos alterados no estado hipertensão. Diferenças esperadas foram encontradas ao compararmos os animais dos grupos controles normotenso e hipertenso: os ratos SHR apresentaram pressão arterial basal mais elevada que os animais normotensos e esse efeito foi sustentado durante as seis semanas de tratamento. Assim como o peso corporal menor que os animais normotensos. Esses dados vão ao encontro do que é descrito na literatura [19, 36]. Estas diferenças independem da dieta que foi oferecida aos animais no decorrer do estudo.

Outros parâmetros também apresentaram diferença, os animais hipertensos apresentam glicemia em jejum ligeiramente inferior a dos animais normotensos. Assim como acontece no teste de tolerância à glicose e na curva de sensibilidade à insulina. Diferenças também foram encontradas na ingestão calórica, níveis séricos de triglicérides e deposição de gordura abdominal [19, 20, 72].

A resistência à insulina em animais SHR vem sendo relacionada a uma mutação gênica no quarto cromossomo, com menor expressão do gene responsável pela determinação do transporte de ácidos graxos [94, 95]. Outra hipótese é de que a alteração relatada nestes animais esteja relacionada com o aumento da atividade adrenérgica presente, que induz a redução da sensibilidade a insulina por provocar a inibição da expressão do receptor de insulina e interferir na translocação do GLUT 4, ocasionando assim hiperinsulinemia [96].

5.2. EFEITOS DA FRUTOSE SOBRE GLICEMIA, INTOLERÂNCIA À GLICOSE E SENSIBILIDADE A INSULINA

O principal fator de risco associado ao diabetes, a síndrome metabólica tem etiologia múltipla. Decorre da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos, culminando com hiperglicemia crônica e distúrbios do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas [73], além do desenvolvimento de hipertensão arterial [74, 75]. Inúmeros estudos comprovam a relação positiva entre a ingestão de dietas ricas em açúcar com a redução da tolerância à glicose e com o diabetes [74, 75]. O *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS), estudo que investigou se o controle rigoroso da glicemia e da hipertensão era capaz de reduzir as complicações do diabetes, além da mortalidade por doenças cardiometabólicas, apontou que de fato o controle da destes parâmetros é fundamental para a redução da morbidade e mortalidade relacionada ao DM [73, 75].

Diversos estudos avaliaram as alterações glicêmicas promovidas pela ingestão de dietas ricas em frutose por animais de experimentação, apontando, assim como em no nosso estudo, que a dieta ofertada foi capaz de promover aumento sustentado da glicemia dos animais tratados com solução de frutose [34, 54, 56, 61, 69]. Em um estudo realizado por Cheng et al (2014), com animais Wistar submetidos a 13 semanas de tratamento com dieta rica em frutose, demonstrou que estes animais tiveram aumento da glicemia em jejum. Estes dados vão ao encontro dos resultados apresentados por Behr-Roussel et al (2008), que apresentou que animais Wistar submetidos a 9 semanas de tratamento com dieta rica em frutose apresentaram aumento da glicemia em jejum.

A frutose é metabolizada no fígado, e sua entrada nas células desse órgão é mediada pela proteína carreadora GLUT2. No hepatócito, a frutose dá origem há dois compostos, diidroxiacetona e gliceraldeído-fosfato, que podem seguir três vias distintas: dando origem ao piruvato e liberando energia; ser reduzida até glicerol, necessário para a síntese de lipídeos; ou dar origem a glicose ou glicogênio, aumentando desta forma a oferta de glicose ao organismo, sem estímulo da insulina, aumentando os níveis glicêmicos [26-28].

Com relação à tolerância do organismo aos altos níveis de glicose, os animais normotensos apresentam níveis mais elevados de glicemia após a injeção intraperitoneal de glicose. Resultados semelhantes foram encontrados por alguns autores que objetivaram avaliar os efeitos da dieta rica em frutose em animais normotensos [54, 56, 59]. Além de manter sustentada uma elevada glicemia em jejum, estes animais apresentaram níveis elevados de glicemia no

teste de tolerância à glicose [59, 54, 56]. Nossos dados vão ao encontro dos resultados apresentados por Axelsen et al (2010), que acompanhou durante 6, 12, 18, 24, 36 e 48 semanas, animais Sprague-Dawley tratados com frutose. Os animais tratados apresentaram níveis mais elevados que seus controles tanto no teste de tolerância à glicose, quanto no teste de sensibilidade à insulina.

A insulina induz a absorção de glicose em tecidos sensíveis à insulina, tais como o músculo esquelético, gordura e do coração. O aumento da ingestão de alimentos ricos em açúcar prejudica a oxidação dos ácidos graxos com o redirecionamento da cadeia longa acil coenzima, favorecendo a síntese de triglicerídeos. O acúmulo de gordura leva a esteatose hepática, desequilíbrio na disponibilidade de ácidos graxos livres e prejuízo oxidativo na capacidade das mitocôndrias. Este efeito prejudica a sinalização da insulina e previne a translocação de GLUT4, levando à resistência a insulina. [76].

5.3. OS EFEITOS DA DIETA RICA EM FRUTOSE SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL

Considerando que a pressão arterial elevada é um componente essencial da síndrome metabólica, não é surpreendente que grande parte dos portadores desta síndrome apresentem hipertensão arterial. Por exemplo, o estudo *Pressioni Arteriose Monitorate e Loro Associazioni* (PAMELA), realizou um estudo populacional que revelou que valores elevados de pressão arterial estão presentes em 80% dos indivíduos portadores da síndrome metabólica [77].

A dieta rica em açúcar, em especial a frutose, induz alterações metabólicas caracterizadas pelo aumento nos níveis plasmáticos de triglicédeos, hiperglicemia, elevação da pressão arterial sistólica, resistência à insulina e aumento do peso corporal [78].

Diversos estudos sugerem que o consumo excessivo de frutose por animais de experimentação é precursor de uma síndrome parecida com a síndrome metabólica descrita para humanos [79]. O modelo animal para retratar os efeitos da ingestão crônica de frutose tem se mostrado um importante instrumento para a compreensão das alterações metabólicas causadas por este tipo de dieta e o curso temporal desta doença [80].

A associação entre o consumo de frutose e pressão arterial foi relatada em um estudo, em humanos, em que um aumento progressivo de 26, 30 e 77% na ingestão de frutose, elevou a pressão arterial para 135/85, 140 /90, e 160/100 mmHg, respectivamente [81]. No presente estudo, 6 semanas de ingestão de frutose não foi suficiente para alterara a pressão arterial de ratos normotensos e hipertensos. Ainda há discordância com o que diz respeito ao aumento de pressão e o tempo de tratamento com frutose necessário para indução de hipertensão. Um estudo realizado por Cheng et al.(2014) usando animais normotensos tratados 13 semanas com dieta rica e frutose, relatou aumento significativo da pressão arterial, além das alterações de outros parâmetros metabólicos [45]. Em outro estudo realizado por Behr Roussel et al.(2008), após 9 semanas de tratamento, mostrou aumento significativo da pressão arterial nos animais tratados com frutose quando comparado aos demais grupos do estudo [36]. Porém, Garcia et al. (2013) observaram que 8 semanas

de tratamento com frutose não foi suficiente para alterar os níveis de pressão arterial de ratos Wistar [70].

O mecanismo pelo qual a ingestão crônica de frutose levaria à alteração da pressão arterial ainda não está bem esclarecido. Estudos relatam que a dieta rica em frutose sustentada poderia levar a estimulação no sistema nervoso simpático, ocasionando aumento da PA [82], bem como poderia causar disfunção endotelial, que pode levar ao aumento da pressão arterial [36]. Além de produzirem aumento os níveis plasmáticos de insulina, alguns estudos, relatam que esta condição levaria a indução da hipertensão [82].

O Estudo Internacional de macro/micronutrientes avaliou 2696 indivíduos com idades entre 40 e 59 anos, com o intuito de relacionar a associação entre o consumo de açúcar (em especial a frutose) em bebidas adoçadas e a elevação da pressão arterial. Os dados sugeriram que a ingestão de frutose foi maior nos indivíduos que consumiam mais de 355 mL/dia de bebidas adoçadas e que os consumidores tinham o índice de massa corporal maior que os participantes que não consumiam este tipo de bebida [83].

5.4. EFEITOS DA FRUTOSE SOBRE O GANHO DE PESO CORPORAL E O ACÚMULO DE GORDURA VISCERAL

Os nossos resultados mostram que 6 semanas de ingestão de uma dieta rica em frutose não foi suficiente para causar alterações significativas no peso corporal em comparação com o grupo controle da mesma linhagem, uma vez que o consumo energético foi semelhante entre os grupos durante o estudo.

Nossos dados são coerentes com o estudo de Ruzzin et al. [84] que relataram um aumento no consumo energético, sem aumento de peso em ratos que foram submetidos a uma dieta rica em frutose ou sacarose. Para que os animais mantivessem o consumo energético dentro dos limites normais, os animais tratados com frutose diminuíram a ingestão de alimentos. Como consequência, a excreção de sódio e potássio em 24 horas também foi reduzida, o que poderia explicar em parte a estabilidade da pressão arterial ao longo das seis semanas de estudo. Embora a ingestão reduzida de alimentos justifique tal efeito sobre a excreção de Na^+ e K^+ , foi também sugerido que os ratos alimentados com frutose têm um aumento da absorção de Na^+ no intestino delgado e no túbulo proximal renal, estimulando a troca Na^+/H^+ [85, 86].

Existem alterações humorais induzidas pela sobrecarga de frutose. Estudos demonstram que a sobrecarga de frutose promove aumento da expressão de receptores nos vasos e níveis plasmáticos de angiotensina II [97-99]. Em um estudo realizado em 2006, por Farah e colaboradores, a sobrecarga de frutose na alimentação de camundongos, resultou no aumento nos níveis plasmáticos de Angio II e no aumento da produção de aldosterona, que atua na reabsorção renal de sódio [100]. Com relação a excreção de sódio e potássio o efeito observado se dá diretamente pela redução da absorção intestinal e pelo aumento da reabsorção renal.

De acordo com os resultados observados neste estudo, os animais normotensos apresentaram acúmulo de gordura abdominal maior do que aquela observada em animais hipertensos, e que a dieta rica em frutose torna

esta diferença muito mais acentuada. O aumento da obesidade abdominal é um marcador chave da síndrome metabólica. Alguns mecanismos poderiam explicar o aumento da deposição de gordura em animais normotensos e não nos hipertensos. Primeiro, ratos normotensos e hipertensos de mesma idade tem uma clara diferença na massa corporal, tal como observado na curva de ganho de peso, além do peso do gastrocnêmio. Além disso, os ratos SHR apresentam uma hiperatividade do sistema nervoso simpático. Este efeito é conhecido por possuir uma atividade lipogênica aumentada, o que poderia evitar a acúmulo de gordura abdominal [87].

Nossos dados vão ao encontro do estudo realizado por Thomassim et al (2010), que apresentou que animais tratados com frutose durante 9 semanas apresentam aumento da deposição de gordura abdominal. Além disso, a frutose é precursora de gorduras, o consumo excessivo de frutose leva à formação de quantidades elevadas de acetil-CoA, o que aumenta a biossíntese de ácidos graxos, provocando acúmulo de gordura corporal [88]. Como descrito anteriormente, a frutose após ser metabolizada pelo fígado gera dois compostos que podem seguir três vias distintas, dando origem a piruvato, dar origem à glicose ou glicogênio ou serem reduzidas até glicerol, necessário para a síntese de lipídeos [26-28].

A alta ingestão de frutose em ratos normotensos aumentou a deposição de massa de gordura visceral sem alterar a massa magra, como observado pelo peso do músculo peitoral e gastrocnêmio. Nossos dados apontam que, naturalmente, os animais SHR possuem massa magra menor que os animais Wistar, assim como menor quantidade de gordura. Esta condição não foi

alterada pela dieta ofertada. Salvo nos animais normotensos, nos quais a dieta rica em frutose induziu aumento da deposição de gordura abdominal quando comparados ao grupo controle.

5.5. EFEITOS DA FRUTOSE SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E PERFIL LIPÍDICO

Nossos resultados demonstram que a dieta crônica com frutose por seis semanas causou alterações em diversos parâmetros plasmáticos dos animais normotensos e hipertensos. O período de tratamento foi suficiente para aumentar significativamente os níveis plasmáticos de triglicerídeos e níveis séricos de glicose. Já os animais hipertensos submetidos à alta ingestão de frutose, houve uma elevação significativa dos níveis plasmáticos de colesterol. Não foram observadas alterações nos níveis de HDLc. A dieta crônica com frutose não foi suficiente para promover alteração nas enzimas transaminases hepáticas, AST e ALT. Porém, os animais hipertensos apresentam níveis séricos aumentados de AST quando comparados aos normotensos, mas sem influência da frutose nesse resultado. Nossos resultados são sustentados por outros estudos que apontam que a dieta rica em frutose é de fato capaz de promover alterações significativas nos níveis de lipídeos sanguíneos [35, 38, 45, 59, 61]. Cheng et al (2014) demonstrou que animais tratados por 13 semanas apresentam aumentos dos níveis séricos de triglicerídeos e colesterol, concordando com Tran et al (2014), que apresentou que 9 semanas

de tratamento são suficientes para promover aumento dos níveis plasmáticos de triglicerídeos de animais tratados com frutose.

5.6. EFEITOS DA FRUTOSE SOBRE A ESTEATOSE.

As alterações promovidas pela dieta rica em frutose podem levar ao desenvolvimento de uma doença conhecida como esteatose hepática, que trata-se de um acúmulo de gordura nas células do fígado, também conhecida como infiltração ou doença gordurosa do fígado. Existem duas variações desta doença, a doença gordurosa alcoólica, induzida pelo uso abusivo de bebidas alcoólicas e a doença gordurosa não alcoólica do fígado, que é multifatorial e não tem relação com o consumo de álcool [54, 56]. A DHGNA está associada com a obesidade, resistência à insulina, hipertensão e dislipidemia, e é considerada como a manifestação da síndrome metabólica no fígado [57]. Estudos mostram que as dietas com alta ingestão de gordura saturada, refrigerantes e carne, e baixa ingestão de micronutrientes essenciais estão associadas com um risco aumentado de desenvolver a doença em questão [59-62].

Em um estudo realizado em 2011, que teve por objetivo apresentar as alterações hepáticas decorrentes da alta ingestão de frutose em diferentes períodos de consumo e desenhos experimentais em ratos *Wistar* teve como conclusão que a frutose é altamente lipogênica, no entanto a indução de DHGNS em modelos crônicos necessita de longos períodos de tratamento [89]. Nosso estudo demonstrou que seis semanas de tratamento não são suficientes para desenvolver esteatose hepática em animais normotensos, indo ao encontro de outros estudos realizados [55, 64, 89].

Estudos recentes em humanos indicam que a dieta rica em frutose talvez seja uma causa significativa da DHGNA. O consumo excessivo de frutose tem sido postulado como tecla inicial para o desenvolvimento da esteatose hepática. De acordo com os nossos resultados, foi demonstrado que a alta ingestão de frutose por animais hipertensos pode resultar em esteatose hepática, acompanhada pela resistência à insulina e níveis elevados de triglicédeos no plasma.

Estes dados são clinicamente corroborados por Ramsay et. al. [90], que descobriram que até 15% de todos os homens hipertensos tiveram testes de função hepática anormais. Além disso, a esteatose hepática, identificada por ultrassonografia abdominal, era significativamente mais prevalente em hipertensos (30,9%) em comparação aos controles normotensos (12,7%) [91]. Encontramos também que a fibrose do fígado aumentou apenas em ratos hipertensos que se submeteram a alta ingestão de frutose.

Pacientes diagnosticados com hipertensão primária possuem comumente outras condições associadas, tais como a resistência à insulina, adiposidade visceral, hiperlipidemia, hiperglicemia ou esteatose hepática. O fato de que ratos hipertensos terem apresentado a doença hepática induzida por frutose precoce aos animais normotensos pode ser explicado por algumas razões. Vários autores demonstraram que enzimas lipogênicas, como a síntese de ácido graxo e transportadores de ácidos graxos livres são reguladas no fígado do SHR. Além disso, o SHR tem dislipidemia e aumento de acúmulo de lipídeos hepáticos em comparação com ratos normotensos. A expressão de

enzimas antioxidantes é também alterada em fígados de ratos SHR, os quais aceleram a lesão do fígado [92, 93].

6. CONCLUSÃO

Diante do apresentado durante o estudo e após a análise dos resultados obtidos, podemos concluir que a dieta crônica com frutose por 6 semanas causa resistência à insulina, eleva os níveis de triglicérides e aumenta a deposição de gordura abdominal, um conjunto de achados semelhantes aos encontrados na síndrome metabólica, sem alterar os níveis pressóricos, em ambos os grupos. Esses dados sugerem que a resistência insulínica e da obesidade abdominal precedem a elevação da pressão arterial nesse modelo.

Porém, pode ser observado também que no grupo de ratos naturalmente hipertensos, especificamente, que foram submetidos a dieta rica em frutose, além das alterações comuns as do grupo de animais normotensos submetidos a mesma dieta, ocorreu a deposição de gordura intersticial e fibrose hepática. Sugerindo, desta forma, que o desenvolvimento do distúrbio metabólico e da DHGNA induzidos pela ingestão de frutose pode ser acelerado nos animais com hipertensão idiopática.

Desta forma, podemos confirmar nossa hipótese inicial como verdadeira, que considera que a hipertensão essencial atue como fator que influencia em um pior prognóstico no desenvolvimento da síndrome metabólica e desordens hepáticas em animais hipertensos, quando comparados aos animais normotensos.

7. REFERÊNCIAS

1. RODRIGUEZ A, CATALAN V, BECERRIL S, GIL MJ, MUGUETA C, GOMEZ-AMBROSI J, ET AL. Impaired adiponectin-AMPK signalling in insulin-sensitive tissues of hypertensive rats. *Life sciences*. 2008 Oct 10;83(15-16):540-9.
2. AHA STATISTICAL UPDATE. Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update A Report From the American Heart Association. (*Circulation*. 2015;132:e323.
3. PRAVENEK M, ZIDEK V, LANDA V, SIMAKOVA M, MLEJNEK P, SILHAVY J, ET AL. Age-related autocrinediabetogenic effects of transgenic resistin in spontaneously hypertensive rats: gene expression profile analysis. *Physiological genomics*. 2011 Apr 12;43(7):372-9.
4. PATEL DA, SRINIVASAN SR, XU JH, CHEN W, BERENSON GS. Persistent elevation of liver function enzymes within the reference range is associated with increased cardiovascular risk in young adults: the Bogalusa Heart Study. *Metabolism: clinical and experimental*. 2007 Jun;56(6):792-8.
5. DONATI G, STAGNI B, PISCAGLIA F, VENTUROLI N, MORSELLI-LABATE AM, RASCITI L, ET AL. Increased prevalence of fatty liver in arterial hypertensive patients with normal liver enzymes: role of insulin resistance. *Gut*. 2004 Jul;53(7):1020-3.
6. BRASIL, Ministério da Saúde - Cadernos de Atenção Básica - n.º 17, PREVENÇÃO CLÍNICA DE DOENÇA CARDIOVASCULAR, CEREBROVASCULAR E RENAL CRÔNICA. Ministério da Saúde, 2009.
7. ARVINDGOEL, MD; MANISH R. MASKI, MD; SURICHHYABAJRACHARYA, MD; JULIA B. WENGER, MPH; DONGSHENG ZHANG, PHD; SAIRASALAHUDDIN, MD, PHD; SAJID S. SHAHUL, MD, MPH; RAVI THADHANI, MD, MPH; ELLEN W. SEELY, MD; S. ANANTHKARUMANCHI,

- MD; SAROSHRANA, MD. Epidemiology and Mechanisms of De Novo and Persistent Hypertension in the Postpartum Period. *Circulation*. 2015;132:1726-1733.
8. KHAN KS, WOJDYLA D, SAY L, GÜLMEZOĞLU AM, VAN LOOK PF. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet*. 2006;367:1066–1074.
 9. EDUARDO PIMENTA, DAVID A. CALHOUN, SUZANNE OPARIL. Mechanisms and Treatment of Resistant Hypertension. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia* 2007; 88(6) : 604-613.
 10. BELLAMY L, CASAS JP, HINGORANI AD, WILLIAMS DJ. Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. *British Medical Journal*. 2007;335:974.
 11. RODRIGUEZ A, CATALAN V, BECERRIL S, GIL MJ, MUGUETA C, GOMEZ-AMBROSI J, ET AL. Impaired adiponectin-AMPK signalling in insulin-sensitive tissues of hypertensive rats. *Life sciences*. 2008 Oct 10;83(15-16):540-9.
 12. KITTS DD, YUAN YV, GODIN DV. Plasma and lipoprotein lipid composition and hepatic antioxidant status in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1998 Feb;76(2):202-9.
 13. KRAUSS RM, ECKEL RH, HOWARD B ET AL. AHA dietary guidelines: revision 2000: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation* 102: 2284-99, 2000.
 14. INTERSALT COOPERATIVE RESEARCH GROUP. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary

- sodium and potassium excretion. *British Medical Journal - BMJ* v. 297 jul/1988, 319-328.
15. LÜDERS S, SCHRADER J, BERGER J ET AL. PHARAO STUDY GROUP. The PHARAO study: prevention of hypertension with the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril in patients with high-normal blood pressure: a prospective, randomized, controlled prevention trial of the German Hypertension League. *Journal of Hypertension*, 2008 Jul; 26(7):1487–1496.
 16. Sachs FM, Svetkey LP, Vollmer WM et al. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. *New England Journal of Medicine*, 2001; 344(1):3–10.
 17. BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. Volume 21 - No 1 - janeiro/março de 2012.
 18. BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. *ELSA Brasil*, Brasília, 2007.
 19. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Inquérito domiciliar sobre comportamentos de risco e morbidade referida de doenças e agravos não transmissíveis. Brasília (DF); 2011.
 20. BOSSOLAN G, BARREIROS RC, FERREIRA NM, MIRANDA AFM, TRINDADE CEP. Galactose and fructose levels in mothers and full-term newborn infants. Poster presentation - Pediatric Academic Societies and the American Academy of Pediatrics joint meeting - Boston. *Pediatric Research* 2000; 47:283A.
 21. SHAH SW, ZHAO H, LOW SY, MCARDLE HJ, HUNDAL HS. Characterization of glucose transport and glucose transporters in the human choriocarcinoma cell line, bewo. *Placenta*. Volume 20, Issue 8, November 1999, Pages 651–659.
 22. AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS. The American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for the

Management of Diabetes Mellitus: The AACE system of intensive diabetes self-management 2002 up date. *Endocrine Practice*, 2002; 8 Suppl1: S45-7.

23. LAURA G. SA´NCHEZ-LOZADA, EDILIA TAPIA, ADRIANA JIME´NEZ, PABLO BAUTISTA, MAGDALENA CRISTO´BAL, TOMA´S NEPOMUCENO, VIRGILIA SOTO, CARMEN A ´VILA-CASADO, TAKAHIKONAKAGAWA, RICHARD J. JOHNSON, JAIME HERRERA-ACOSTA, †AND MARTHA FRANCO. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 292: F423–F429, 2007.
24. RAN J, HIRANO T, FUKUI T, SAITO K, KAGEYAMA H, OKADA K, ADACHI M. Angiotensin II infusion decreases plasma adiponectin level via its type 1 receptor in rats: an implication for hypertension-related insulin resistance. *Metabolism*, 55: 478–488, 2006.
25. DAI S, MCNEILL JH. Fructose-induced hypertension in rats is concentration- and duration-dependent. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 33: 101–107, 1995.
26. JOHNSON RJ, RIDEOUT BA. Uric acid and diet—insights into the epidemic of cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*, 350: 1071–1073, 2004.
27. Mirjam Dirlewanger, Philippe Schneiter, Eric Je ´quier, and Luc Tappy. Effects of fructose on hepatic glucose metabolism in humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 279: E907–E911, 2000.
28. HUANG PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms*. 2009; 2(5-6):231-7.

29. BRUCE KD, BYRNE CD. The metabolic syndrome: common origins of a multifactorial disorder. *Postgraduate Medical Journal*. 2009; 85(1009):614-21.
30. VARTANIAN LR, SCHWARTZ MB, BROWNELL KD. Effects of soft drink consumption on nutrition and health: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Public Health*. 2007; 97(4):667-75.
31. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. World Health Organization, 2003; 916:i-viii, 1-149, backcover.
32. REUNGJUI S, RONCAL CA, MU W, SRINIVAS TR, SIRIVONGS D, JOHNSON RJ, ET AL. Thiazide diuretics exacerbate fructose-induced metabolic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2007; 18(10):2724-31.
33. BOUCHARD-THOMASSIM AA., LACHANCE D., DROLET MC., COUET J., ARSENAULT M. A high-fructose diet worsens eccentric left ventricular hypertrophy in experimental volume overload. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2011, p. 125-134.
34. CHENG SM., CHENG YJ., WU LY., KUO CH., LEE YS., WU MC., HUANG CY., TING H., LEE SD. Activated apoptotic and anti-survival effects on rat hearts with fructose induced metabolic syndrome. *Cell Biochemistry and Function*, 2014; 32, p. 133-141.
35. DELBOSC S., PAIZANIS E., MAGOUS R., ARAIZ C., DIMO T., CRISTOL JP., CROS G., AZAY J. Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat. *Atherosclerosis* 179, 2005; p. 43-49.
36. WHITE, J.S. Challenging the fructose hypothesis: new perspectives on fructose consumption and metabolism. *American Society for Nutrition, Advances in Nutrition*, v. 4, 2013, p. 246-256.

37. BUSSEROLLES J., GUEUX E., ROCK E., DEMIGNÉ C., MAZUR A., RAYSSINGUIER Y. Oligofructose Protects against the Hypertriglyceridemic and Pro-oxidative Effects of a High Fructose Diet in Rats. *Journal of Nutrition, American Society for Nutritional Science*, 2003, p. 1903-1907.
38. DIMITROPOULOU C., HAN G., MILLER A. W., MOLERO M., FUCHS L. C., WHITE R. E., CARRIER G. O. Potassium (BKCa) currents are reduced in microvascular smooth muscle cells from insulin-resistant rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 282: H908–H917, 2002.
39. GARCIA MD., GODOY YC., CELUCH SM. Impaired hypotensive responses induced by intrathecally injected drugs in fructose-fed rats. *European Journal of Pharmacology* 706, 2013; p. 17-24.
40. TRAN L.T., MACLEOD K.M., MCNEILL J.H. Selective alpha1-adrenoceptor blockade prevents fructose-induced hypertension. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2014; DOI 10.1007/s11010-014-2031-5.
41. DI VERNIERO CA., SILBERMAN EA., MAYER MA., OPEZZO JAW., TAIRA CA., HOCHT C. In Vitro and In Vivo Pharmacodynamic Properties of Metoprolol in Fructose-fed Hypertensive Rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v 51, n. 6, 2008, p. 532-541.
42. TRAN L.T., MACLEOD K.M., MCNEILL J.H. Selective alpha1-adrenoceptor blockade prevents fructose-induced hypertension. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2014; DOI 10.1007/s11010-014-2031-5.
43. TAPPY, L., LÉ, K.A. Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity. *Physiology Reviews*, v. 90, Janeiro – 2010, p. 23-46.

44. TRAN, L.T., YUEN, V. G., MCNEILL, J. H. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2009, p. 145-159.
45. JIANPING YE. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Frontier Medical Systems*. 2013 March ; 7(1): 14–24.
46. JORGE SALMERON, ALBERTO ASCHERIO, ERIC B. RIMM, GRAHAM A. COLDITZ, DONNA SPIEGELMAN, DAVID J. JENKINS, MEIR J. STAMPFER, ALVIN L. WING, WALTER C. WILLETT. Dietary Fiber, Glycemic Load, and Risk of NIDDM in Men. *Diabetes care*, v. 20, n. 4, april 1999, 545-550.
47. LIM J. S., MIETUS-SNYDER M., VALENTE A., SCHWARZ J. M., LUSTIG R. H. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 7, p. 251-64, 2010.
48. YASUTAKE K, KOHJIMA M, NAKASHIMA M, KOTOH K, NAKAMUTA M, ENJOJI M. Nutrition Therapy for Liver Diseases Based on the Status of Nutritional Intake. *Gastroenterology Research and Practice*, v. 2, p. 1-8, 2012.
49. EMILY J. GALLAGHER, MRCPI DEREK LEROITH. Epidemiology and Molecular Mechanisms Tying Obesity, Diabetes, and the Metabolic Syndrome With Cancer. *Diabetes care*, volume 36, supplement 2, august 2013, 233-239.
50. ANNA C. BELKINA AND GERALD V. DENIS. Obesity genes and insulin resistance. *Current Opinion in Endocrinology*. 2010 October ; 17(5): 472–477.
51. WINER S, PALTSER G, CHAN Y, ET AL. Obesity predisposes to Th17 bias. *European Journal Of Immunology*. 2009; 39:2629–2635.
52. ACKERMAN Z, ORON-HERMAN M, GROZOVSKI M, ROSENTHAL T, PAPP O, LINK G, SELA BA. Fructose-induced fatty liver disease: hepatic effects of

- blood pressure and plasma triglyceride reduction. *Hypertension*. 2005;45:1012-8.
53. LÉ, K.A., TAPPY, L. Metabolic Effects of Fructose. *Current Opinion Clinical and Nutrition Metabolic Care*, v. 9, 2006, p. 469-175.
54. BELLENTANI S., SCAGLIONI F., MARINO M., BEDOGNI G. Epidemiology of NonAlcoholic Fatty Liver Disease. *Digestive diseases*, v. 28, p. 155–161, 2010.
55. PEREZ-FERNANDEZ R, MARINO AF, CADARSO-SUAREZ C, BOTANA MA, TOME MA, SOLACHE I, ET AL. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in Galicia (Spain) and association with related diseases. *Journal of human hypertension*. 2007 May;21(5):366-73.
56. MADERO, M., POZO, S.E.P., JALAL, D., RICHARD, J.J., LOZADA, L.G.S. Dietary Fructose and Hypertension. *Current Hypertension ReviewsRep*, 2011, p. 29-35.
57. VANIERO, C.A.D., SILBERMAN, E.A., MAYER, M.A., OPEZZO, J.A.W., TAIRA, C.A., HOCHT, C. In Vitro and in vivo pharmacodynamic properties of metoprolol in fructose-fed hypertensive rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 51, n. 6, jun/2008, p. 532-541.
58. AXELSEN, L.N., LADEMANN, J.B., PETERSEN, J.S., RATTHLOU, N.H.H., PLOUG, T., PRATS, C., PEDERSEN, H.D., KJOUBYE, A.L. Cardiac and metabolic changes in long-term high fructose-fat fed rats with severe obesity and extensive intramyocardial lipid accumulation. *American Journal Physiology*, v. 298, 2010, p. 560-570.
59. GARCIA MD., GODOY YC., CELUCH SM. Impaired hypotensive responses induced by intrathecally injected drugs in fructose-fed rats. *European Journal of Pharmacology* 706, 2013; p. 17-24.

60. ROUSSEL, D.B, OUDOT, A., COMPAGNIE, S., GORNY D., COZ, O.L., BERNABE, J., WAYMAN, C., ALEXANDRE, L., GIULIANO, F. Impact of a long-term Sildenafil treatment on pressor response in conscious rats with insulin resistance and hypertriglyceridemia. *American Journal of Hypertension*, v. 21, n. 11, nov/2008, p. 1258-1263.
61. MARCHESINI G, BUGIANESI E, FORLANI G, CERRELLI F, LENZI M, MANINI R, NATALE S, VANNI E, VILLANOVA N, MELCHIONDA N, RIZZETTO M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*. 2003;37:917-23.
62. PAREKH S, ANANIA FA. Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2007;132:2191-207.
63. DAY C.P. Non-alcoholic fatty liver disease. In: McDonald JWD, Burroughs AK, Feagan BG, editors. *Evidence-based gastroenterology and hepatology*. 2^a ed. London: British Medical Journal - BMJ; 2004. p. 393-403.
64. YASUTAKE K, KOHJIMA M, NAKASHIMA M, KOTOH K, NAKAMUTA M, ENJOJI M. Nutrition Therapy for Liver Diseases Based on the Status of Nutritional Intake. *Gastroenterology Research and Practice*, v. 2, p. 1-8, 2012.
65. VASDEV S., GILL VD., RANDELL E., HAN Y., GADAG V. Fructose and moderately high dietary salt-induced hypertension: prevention by a combination of N-acetylcysteine and L-arginine. *Molecular and Cellular Biochemistry*(2010) 337:9–16 DOI 10.1007/s11010-009-0281-4.
66. BUNAG, R.D. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *Journal of Applied Physiology*, n. 34, v. 2, p. 279-282.

67. HWANG, I.S., HO H., HOFFMAN, B.B., REAVEN, G. M. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension*, n. 10, v. 5, p. 512-516.
68. TRAN, L.T., YUEN, V. G., MCNEILL, J. H. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2009, p. 145-159.
69. THOMASSIN, A.A.B., LACHANCE, D., DROLET, M.C., COUET, J., ARSENAUT, M. A high-fructose diet worsens eccentric left ventricular hypertrophy in experimental volume overload. *American Journal of Physiology*, p. 125-134, 2011.
70. TOMASSONI D, TRAINI E, VITAIOLI L, AMENTA F. Morphological and conduction changes in the sciatic nerve of spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience Letters*. 2004;362:131-5.
71. FRITZ M, RINALDI G. Blood pressure measurements with the tail-cuff method in Wistar and Spontaneously hypertensive rats: influence of adrenergic- and nitric oxide-mediated vasomotion. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2008;58:215-21
72. VOS MB, KIMMONS JE, GILLESPIE C, WELSH J, BLANCK HM. Dietary fructose consumption among US children and adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Medscape Journal of Medicine* . 2008; 10(7):160.
73. PARK YW, ZHU S, PALANIAPPAN L, HESHKA S, CARNETHON MR, HEYMSFIELD SB. The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition

- Examination Survey, 1988-1994. Archives of internal medicine. 2003 Feb 24;163(4):427-36.
74. STANHOPE KL, MEDICI V, BREMER AA, LEE V, LAM HD, NUNEZ MV, ET AL. A dose-response study of consuming high-fructose corn syrup-sweetened beverages on lipid/lipoprotein risk factors for cardiovascular disease in young adults. The American journal of clinical nutrition. 2015 Apr 22.
75. QUEIROZ-LEITE GD, CRAJOINAS RO, NERI EA, BEZERRA CN, GIRARDI AC, REBOUCAS NA, ET AL. Fructose acutely stimulates NHE3 activity in kidney proximal tubule. Kidney & blood pressure research. 2012;36(1):320-34.
76. ROBLES L, VAZIRI ND, LI S, MASUDA Y, TAKASU C, TAKASU M, ET AL. Dimethyl fumarate protects pancreatic islet cells and non-endocrine tissue in L-arginine-induced chronic pancreatitis. PloS one. 2014;9(9):e107111.
77. WALKER RW, DUMKE KA, GORAN MI. Fructose content in popular beverages made with and without high-fructose corn syrup. Nutrition. 2014 Jul-Aug;30(7-8):928-35.
78. STANHOPE KL, MEDICI V, BREMER AA, LEE V, LAM HD, NUNEZ MV, ET AL. A dose-response study of consuming high-fructose corn syrup-sweetened beverages on lipid/lipoprotein risk factors for cardiovascular disease in young adults. The American journal of clinical nutrition. 2015 Apr 22.
79. NOMURA K, YAMANOUCHI T. The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. The Journal of nutritional biochemistry. 2012 Mar;23(3):203-8.
80. BALDO MP, TEIXEIRA AK, RODRIGUES SL, MILL JG. Acute arrhythmogenesis after myocardial infarction in normotensive rats: influence of high salt intake. Food and chemical toxicology : an international journal

- published for the British Industrial Biological Research Association. 2012 Mar;50(3-4):473-7.
81. BROWN IJ, STAMLER J, VAN HORN L, ROBERTSON CE, CHAN Q, DYER AR, ET AL. Sugar-sweetened beverage, sugar intake of individuals, and their blood pressure: international study of macro/micronutrients and blood pressure. *Hypertension*. 2011 Apr;57(4):695-701.
82. JALAL DI, SMITS G, JOHNSON RJ, CHONCHOL M. Increased fructose associates with elevated blood pressure. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010 Sep;21(9):1543-9.
83. MANCIA G, BOMBELLI M, CORRAO G, FACCHETTI R, MADOTTO F, GIANNATTASIO C, ET AL. Metabolic syndrome in the PressioniArterioseMonitorate E LoroAssociazioni (PAMELA) study: daily life blood pressure, cardiac damage, and prognosis. *Hypertension*. 2007 Jan;49(1):40-7.
84. BEZERRA RM, UENO M, SILVA MS, TAVARES DQ, CARVALHO CR, SAAD MJ, ET AL. A high- fructose diet induces insulin resistance but not blood pressure changes in normotensive rats. *Brazilianjournalof medical andbiologicalresearch = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2001 Sep;34(9):1155-60.
85. YUDKIN J. Sugar and disease. *Nature*. 1972 Sep 22;239(5369):197-9.
86. RUZZIN J, LAI YC, JENSEN J. Consumption of carbohydrate solutions enhances energy intake without increased body weight and impaired insulin action in rat skeletal muscles. *Diabetes &metabolism*. 2005 Apr;31(2):178-88.

87. CABRAL PD, HONG NJ, HYE KHAN MA, ORTIZ PA, BEIERWALTES WH, IMIG JD, ET AL. Fructose stimulates Na/H exchange activity and sensitizes the proximal tubule to angiotensin II. *Hypertension*. 2014 Mar;63(3):e68-73.
88. RIZKALLA SW. Health implications of fructose consumption: a review of recent data. *Nutrition & Metabolism*. 2010; 7(82):1-17.
89. YEH WJ, LEAHY P, FREAKE HC. Regulation of brown adipose tissue lipogenesis by thyroid hormone and the sympathetic nervous system. *The American journal of physiology*. 1993 Aug;265(2 Pt 1):E252-8.
90. NAGAREDDY PR, MACLEOD KM, MCNEILL JH. GPCR agonist-induced transactivation of the EGFR upregulates MLC II expression and promotes hypertension in insulin-resistant rats. *Cardiovascular research*. 2010 Jul 1;87(1):177-86.
91. VELEZ M, KOHLI S, SABBAH HN. Animal models of insulin resistance and heart failure. *Heart failure reviews*. 2014 Jan;19(1):1-13. PubMed PMID: 23456447.
92. EL-BASSOSSY HM, WATSON ML. Xanthine oxidase inhibition alleviates the cardiac complications of insulin resistance: effect on low grade inflammation and the angiotensin system. *Journal of translational medicine*. 2015;13:82. PubMed PMID: 25889404.
93. BUCHANAN TA, YOUN JH, CAMPESE VM, SIPOS GF. Enhanced glucose tolerance in spontaneously hypertensive rats. Pancreatic beta-cell hyperfunction with normal insulin sensitivity. *Diabetes*. 1992 Jul;41(7):872-8.
94. CHIAPPE D. C. G. E., CALDIZ C.L. Insulin resistance and GLUT-4 glucose transporter in adipocytes from hypertensive rats. *Metabolism* 2004;53:382-7.

95. QI N., KAZDOVA L., ZIDEK V., LANDA V., KREN V., PERSHADSINGH H.A., et al. Pharmacogenetic evidence that cd36 is a key determinant of the metabolic effects of pioglitazone. *Journal of Biological Chemistry*,2002;277:48501-7.
96. SONE H., SUZUKI H., TAKAHASHI A., YAMADA N.. Disease model: Hyperinsulinemia and insulin resistance. Part A - targeted disruption of insulin signaling or glucose transport. *Trends in Molecular Medicine*, 2001;7:320-2.
97. HSIEH P. S. Reversal of fructose-induced hypertension and insulin resistance by chronic losartan treatment is independent of AT2 receptor activation in rats. *Journal of Hypertension*, 2005;23:2209-17.
98. KATOVICH M. J., REAVES P. Y., FRANCIS S. C., PACHORI A. S., WANG H. W., RAIZADA M. K. Gene therapy attenuates the elevated blood pressure and glucose intolerance in an insulin-resistant model of hypertension. *Journal of Hypertension*,2001;19:1553-8.
99. KAMIDE K., RAKUGI H., HIGAKI J., OKAMURA A., NAGAI M., MORIGUCHI K., et al. The renin-angiotensin and adrenergic nervous system in cardiac hypertrophy in fructose-fed rats. *American Journal of Hypertension*,2002;15:66-71.
100. FARAH, V. M. A.; ELASED, K. M.; CHEN, Y.; KEY, M. P.; CUNHA, T. S.; IRIGOYEN, M. C.; MORRIS, M. Nocturnal hypertension in mice consuming a high fructose diet. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, v. 130, p. 41-50, 2006.