

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

**A INGESTÃO ELEVADA DE FRUTOSE ALTERA A REATIVIDADE
VASCULAR MESENTÉRICA EM RATOS NORMOTENSOS**

GLAUCIENE JANUÁRIO DE SOUSA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

VITÓRIA

2017

GLAUCIENE JANUÁRIO DE SOUSA

**A INGESTÃO ELEVADA DE FRUTOSE ALTERA A REATIVIDADE
VASCULAR MESENTÉRICA EM RATOS NORMOTENSOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, em cumprimento às exigências parciais para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof^o. Dr^o Marcelo Perim Baldo

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Nazaré Souza Bissoli

VITÓRIA

2017

A INGESTÃO ELEVADA DE FRUTOSE ALTERA A REATIVIDADE VASCULAR MESENTÉRICA EM RATOS NORMOTENSOS

GLAUCIENE JANUÁRIO DE SOUSA

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

Aprovada em 17 de fevereiro de 2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Perim Baldo
Dept. Ciências Fisiológicas CCS – UFES
Orientador

Prof. Dr. Nazaré Souza Bissoli
Dept. Ciências Fisiológicas CCS – UFES
Co-Orientadora

Prof. Dr. Sônia Alves Gouvêa
Dept. Ciências Fisiológicas CCS - UFES

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira
Dept. de Morfologia CCS -UFES

Sousa, Glauciene Januário 1991

A ingestão elevada de frutose altera a reatividade vascular mesentérica em ratos normotensos [Vitória] 2017. xx, 77p., 29,7 cm (UFES, M. Sc. Ciências Fisiológicas, 2017).

Orientador: Prof^o. Dr^o. Marcelo Perim Baldo

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Nazaré Souza Bissoli

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

1. Frutose 2. Doença Cardiometabólica 3. Síndrome Metabólica 4. Disfunção vascular 5. Disfunção endotelial 6. Prostanóides 7. Mesentério

DEDICATÓRIA

À Deus,

Pelo dom da vida e por ter me inspirado a ter paciência, discernimento e ânimo em todos os momentos. Aos anjos que colocou em meu caminho em forma de família e amigos. E pelas provas e desafios que lapidaram meu espírito.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me concedeu o dom da vida e que me permitiu chegar até aqui dando forças, sabedoria e paciência. Que sempre esteve e estará comigo em todos os momentos.

A toda minha família, pelo amor, confiança, dedicação e investimentos necessários para o meu desenvolvimento. Em especial, aos meus pais Beth e Adão, por todo amor, cuidado e apoio concedido durante todos os momentos.

A minha prof^a. Dr^a. Nazaré Souza Bissoli, por me permitir fazer parte do Laboratório de Hipertensão Experimental e por todo ensinamento e apoio concedido. Obrigada por me ensinar os primeiros passos da ciência e continuar contribuindo ricamente para minha formação profissional e pessoal. Obrigada por mesmo nos momentos difíceis sempre acreditar em mim, saber esperar o meu ritmo com paciência e por mesmo na função de coorientadora, não deixar de me orientar em nenhum momento, estando sempre presente em todas as etapas da execução deste trabalho. Muito obrigada pela confiança, amizade e oportunidade.

Ao meu orientador prof^o Dr^o Marcelo Perim Baldo, pela excelente orientação e por toda confiança depositada em mim em todos os momentos. Que se fez totalmente presente durante cada etapa deste trabalho, mesmo quando as distâncias geográficas o impediram, pois não faltaram e-mails, imensas conversas no whatsapp e ligações para me auxiliar em cada momento. Posso dizer que fui uma pessoa abençoada por ter orientadores tão dedicados. Muito obrigada por entender o meu ritmo, o meu tempo e todas as fases que eu vivi durante o mestrado, agradeço imensamente a confiança e oportunidade.

A prof^a. Dr^a. Sônia Alves Gouvêa, por sua contribuição na minha formação, por toda compreensão com os prazos, e por todos os momentos de muita risada e alegria que você proporciona a todos que estão a sua volta e é claro por sua especial participação na banca.

Ao prof^o Dr^o Breno Valentim Nogueira por ter me recebido tão bem em seu laboratório e disponibilizado todos os recursos necessários para execução da microscopia eletrônica e outras técnicas, além de auxiliar na análise das imagens obtidas e por gentilmente aceitar o convite para compor a banca.

A Prof^a Dr^a Fabiana Magalhães Siman, pelas importantes contribuições na avaliação deste trabalho durante a qualificação.

Ao meu ex-noivo, agora marido e eterno amor (Gabriel), por todo incentivo, amor e compreensão. Obrigada por entender minha ausência, meu estresse, meu tempo, meus delírios e ainda assim jamais me abandonar. Obrigada por acreditar em mim e me fazer capaz de encarar o mestrado juntamente com os preparativos do casamento e os desafios da nova vida de casada, saiba que isso só foi possível porque tive seu apoio em todos os momentos. Obrigada por toda ajuda com a organização do casório, por todos os jantares que preparou, por todo auxílio que sempre me deu para cuidar do nosso novo lar e por ser o maior incentivador e admirador desta conquista e estar sempre presente em minha vida. Esta conquista também é sua, amor!

A minha dupla, meu parceiro e amigo, mas que também é não deixa de sempre um ótimo professor e também orientador Phablo Oliveira, que além de grandes ensinamentos científicos e domingos, feriados, natal e ano novo compartilhando experimentos no laboratório, tornou-se um grande amigo. Muito obrigada por participar de literalmente todos os protocolos realizados neste trabalho ajudando desde testes piloto, tratamento dos animais até a escrita do artigo e dissertação. Muito obrigada pela total parceria e cumplicidade.

A Aline, Izabela e Polyana por todo apoio, amizade, torcida, carinho e ensinamentos que foram fundamentais para o início da minha vida científica e permanência no laboratório. E que mesmo devido às circunstâncias da vida estejam mais distante da convivência diária no laboratório, não mediram esforços para ajudar, tirar dúvidas e sempre apoiar o meu trabalho. Não faltaram treinamentos de Blot (até as 23:05 hrs), e mensagens diretamente dos EUA com dicas super preciosas. Obrigada meninas, vocês são hoje além de colaboradoras grandes amigas.

Ao Antônio, pela parceria nos projetos, por sempre fazer aquele cafezinho e é claro por tornar tudo mais especial e divertido, me ajudando a superar as dificuldades e sempre me apoiando e compartilhamos risos e também “choros” que só nós entendemos.

Aos alunos de Iniciação científica Ana Carolina, Ana Paula, Edgar, Mariana, Marília, Mayara, Nara e Wedson por toda ajuda e apoio. Pelos finais de semana e feriados realizando experimentos, análises de dados e por toda caminhada até chegar aqui. Na

medida do tempo, da necessidade, da solicitação, todos, uns mais, outros menos, participaram deste resultado, mas não poderia deixar de agradecer de forma muito especial a Mari (nossa Marisleide) que me acompanhou desde o início e por participar arduamente em todas as etapas deste trabalho, sempre se disponibilizando a ajudar além de se tornar uma grande amiga.

A Layla, Ludmila e Rafaela, por gentilmente se disponibilizarem a me ensinar e/ou auxiliar na execução e análise de algumas técnicas.

A todos os amigos do Laboratório de Hipertensão Experimental pela contribuição com meu aprendizado, pelos momentos de convivência e por todo incentivo: Pollyana, Eweline, Gírlândia, Andrews e em especial a Karine e ao Marcos pela companhia no RU e por estarem sempre na torcida.

Ao LUCCAR pela estrutura e auxílio prestados que permitiram a realização de parte do protocolo experimental deste estudo e em especial ao Wanderson e Jairo que com toda paciência e disposição me deram total apoio na execução da microscopia eletrônica.

Ao LHMI pela estrutura e auxílio prestados, que permitiram a realização de parte do protocolo experimental deste estudo e em especial a Dani e Mário que sempre se dispuseram a nos ajudar.

A Rosa e ao meu sogro Mário que é um dos meus maiores incentivadores nesta caminhada acadêmica e também a Elza, Patrícia e Paulinho que sempre acreditaram em mim e me dão total apoio e incentivo.

Aos amigos do PPGCF por todos os momentos compartilhados, pelos desesperos, alegrias, dúvidas e emoções. Certamente nossos caminhos serão distintos, mas ficarão as lembranças e as descobertas que fizemos durante esse tempo que estivemos juntos. Obrigada a todos os alunos de cada laboratório do programa que ajudaram de alguma forma, seja emprestando diversas vezes alguns materiais, equipamentos, ajudando nos estudos das disciplinas e incentivando e apoiando sempre.

Aos professores do PPGCF, secretários e funcionários, em especial ao Anderson por todo apoio técnico durante os experimentos além de sempre nos ajudar com muita criatividade a resolver os mais diversos problemas enfrentados no laboratório e claro pelas conversas filosóficas. A Cintia por toda compreensão e por se mostrar sempre

solicita em todos os momentos que precisei. Ao Rodolfo, João e demais funcionários do biotério que sempre nos atenderam prontamente.

A UFES e ao PPGCF por toda estrutura que permitiram a minha formação e a realização deste trabalho. Em especial, a população que contribui para existência e manutenção desta instituição. E também a CAPES, CNPq e FAPES pelo apoio financeiro fornecido a essa e a tantas outras pesquisas em nossa instituição.

A todos meus amigos, por serem grandes incentivadores e por toda compreensão, principalmente nos momentos de ausência. Em especial, a Lohanna, Mayelle, Paola, Raquel e Raylana que acompanharam todas as etapas desta conquista, desde o ensino médio, aprovação no vestibular, graduação e todo período do mestrado, sempre com sincera amizade e companheirismo. E também aos meus amigos da igreja, em especial a tribo de Manassés, que sempre me incentivaram e ajudaram em orações nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos da FarmaUFES, em especial a turma 2009/2 que mora no meu coração sem deixar de destacar as najas mais amáveis do mundo: Brilian, Greg, Larinha, Larys, Lets, Lelê e Martielinho, por serem essenciais na minha vida, por sempre me incentivarem, por toda “nageação” alheia e por me fazerem tão bem. Amo vocês.

Aos animais (ratinhos), que por meio de suas vidas permitem o desenvolvimento e compreensão da ciência. Eles merecem todo respeito, reconhecimento, e principalmente cuidados adequados durante todos os procedimentos, pois sem eles nada disso seria possível.

Ao olhar para minha lista de agradecimentos, me assustei com as 4 páginas, mas ainda assim concluo ela com dois sentimentos, um é de que com certeza aqui não consta o nome de todas as pessoas que merecem ser agradecidas e outro, ainda mais importante, é que ninguém realmente faz nada sozinho.

Então, agradeço a todos que, embora não nomeados, de alguma forma tornaram possível a conclusão deste trabalho e toda a caminhada até chegar aqui.

Meu sincero MUITO OBRIGADA!!!

*Sim, grandes coisas fez o Senhor por nós, e por
isso estamos alegres.*

Salmos 126:3.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 ENDOTÉLIO VASCULAR E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL.....	24
1.2 FRUTOSE.....	26
1.2.1 Características Gerais e Fontes Alimentares.....	26
1.2.2 Metabolismo da Frutose.....	29
1.2.3 Frutose na Disfunção Endotelial e Hipertensão.....	35
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	36
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	36
3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	37
3.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS.....	36
3.4.1 Evolução ponderal e coleta de amostras.....	37
3.4.2 Glicemia em Jejum, Teste de Tolerância à Insulina e Glicose.....	38
3.4.3 Medidas de Pressão Arterial Sistólica (PAS).....	38
3.5 PREPARAÇÃO DE LEITOS VASCULARES MESENTÉRICOS.....	39
3.5.1 Reatividade vascular no LVM.....	40
3.5.2 Análise dos resultados de reatividade vascular.....	40
3.6 ESTUDO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS – DIHIDROETÍDEO (DHE).....	41

3.7 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PROTEICOS POR <i>WESTERN BLOT</i>	42
3.7.1 Extração das proteínas.....	42
3.7.2 Dosagem das proteínas.....	42
3.7.3 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE).....	43
3.7.4 Transferência das proteínas.....	43
3.7.5 Incubação dos anticorpos.....	44
3.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	44
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
4 RESULTADOS	46
4.1 PRESSÃO ARTERIAL, PARÂMETROS PONDERAIS E METABÓLICOS.....	46
4.2 TESTE DE TOLERÂNCIA A INSULINA E GLICOSE.....	47
4.3 REATIVIDADE VASCULAR DO LEITO MESENTÉRICO.....	49
4.3.1 Reatividade Vascular em resposta à NOR.....	49
4.3.2 Reatividade vascular em resposta a ACh	53
4.3.3 Reatividade vascular em resposta ao NPS.....	56
4.4 ANÁLISE POR WESTERN BLOT DE eNOS, iNOS, COX-2 E Nox2.....	57
4.5 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs) NA ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR.....	59
4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DA ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR.....	59
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	67

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1: Definições de Síndrome Metabólica.....22

Tabela 1: Peso de órgãos em gramas (g) e razão destes com o comprimento da tíbia em centímetros (cm) nos grupos CON e FRU.....47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fisiopatologia da disfunção endotelial.....	25
Figura 2: Formas isoméricas da frutose.....	27
Figura 3: Evolução do consumo de xarope de milho rico em frutose (HFCS) e de sacarose nos Estados Unidos entre 1970 e 2006.	28
Figura 4: Metabolismo hepático da frutose.....	31
Figura 5: Mecanismo proposto da relação entre o consumo excessivo de frutose, disfunção endotelial e hipertensão.....	34
Figura 6: Organograma do Protocolo Experimental.....	37
Figura 7: Fotografia da artéria mesentérica superior e do leito mesentérico.....	40
Figura 8: Pressão arterial sistólica (PAS), parâmetros ponderais e metabólicos durante 6 semanas de tratamento nos grupos CON e FRU.....	46
Figura 9: Teste de tolerância à insulina nos grupos CON e FR.....	48
Figura 10: Teste de tolerância à glicose nos grupos CON e FRU.....	49
Figura 11: Efeitos do tratamento com frutose na curva dose-resposta de vasoconstrição induzida por NOR no leito vascular mesentérico dos grupos CON e FRU na ausência de inibidores.....	50
Figura 12: Efeitos do tratamento com frutose na curva dose-resposta de vasoconstrição induzida por NOR no leito vascular mesentéricos dos grupos CON e FRU na presença de L-NAME.....	51
Figura 13: Efeitos do tratamento com frutose na curva dose-resposta de vasoconstrição induzida por NOR no leito vascular mesentérico dos grupos CON e FRU na presença de indometacina (INDO).....	52

Figura 14: Efeitos do tratamento com frutose na curva dose-resposta de vasoconstrição induzida por NOR no leito vascular mesentérico dos grupos CON e FRU após remoção do endotélio com CHAPS.....	53
Figura 15: Efeitos do tratamento com frutose na curva dose-resposta de relaxamento induzido por ACh no leito vascular mesentérico dos grupos CON e FRU na ausência de inibidores.....	54
Figura 16: Efeitos do tratamento com frutose na curva dose-resposta de relaxamento induzido por ACh no leito vascular mesentérico dos grupos CON e FRU na presença de L-NAME.....	55
Figura 17: Efeitos do tratamento com frutose na curva dose-resposta de relaxamento induzido por ACh no leito vascular mesentérico dos grupos CON e FRU na presença de indometacina (INDO).....	56
Figura 18: Efeitos do tratamento com frutose na curva dose-resposta de relaxamento induzido por NPS no leito vascular mesentérico dos grupos CON e FRU na ausência de inibidores.....	57
Figura 19: Efeitos do tratamento com frutose na expressão das proteínas (A) eNOS, (B) iNOS em ramos vasculares mesentéricos nos grupos CON e FRU.....	58
Figura 20: Efeitos do tratamento com frutose na expressão das proteínas (A) COX-2, (B) Nox2 em ramos vasculares mesentéricos nos grupos CON e FRU.....	58
Figura 21. Coloração com DHE para avaliação da produção de EROs na artéria mesentérica superior.....	59
Figura 22: Microscopia eletrônica de varredura da artéria mesentérica superior. Imagens da ultraestrutura dos vasos.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh: Acetilcolina

Akt: Proteína quinase B

ATP: Trifosfato de adenosina

AUC: Área abaixo da curva

CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)-dimetil-amônio]-1-propano-sulfonato

CON: Grupo controle

COX: Ciclooxigenase

dAUC: Diferenças das áreas abaixo das curvas

DCV: Doenças cardiovasculares

DHE: Dihidroetídeo

DM2: Diabetes melittus tipo 2

EDHF: Fator hiperpolarizante derivado de endotélio

eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial

EROs: Espécies reativas do oxigênio

ET1: Endotelina 1

FRU: Grupo frutose

GLUT-2: Transportador de glicose tipo 2

GLUT-5: Transportador de glicose tipo 5

HFCS: xarope de milho rico em frutose (do inglês *High-fructose corn syrup*)

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

IL-6: Interleucina-6

INDO: Indometacina

L-NAME: N ω -nitro-L-arginina metil ester

LVM: Leito vascular mesentérico

NOX: NADPH oxidase

Nox2: Subunidade (gp91phox) da NADPH oxidase

NO: Óxido nítrico

NPS: Nitroprussiato de sódio

NOR: Noradrenalina

NOS: Óxido nítrico sintase

O₂⁻: Ânion superóxido

ONOO⁻: Peroxinitrito

PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase

PGI₂: Prostaciclina

RI: Resistência à insulina

SM: Síndrome metabólica

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TXA₂: Tromboxano A2

RESUMO

As doenças metabólicas crônicas são um resultado comum do estilo de vida ocidental moderno, como mostrado pela atual prevalência de obesidade, resistência à insulina e síndrome metabólica (SM), que se correlaciona com o aumento do consumo de frutose e pode levar a doenças cardiovasculares. Hipotetizamos que a ingestão crônica de elevadas concentrações de frutose mimetiza os estágios iniciais da doença cardiometabólica como a SM, levando a alterações vasculares iniciais. **Métodos:** Ratos wistar foram separados em dois grupos: (FRU) frutose 10% em água de beber por 6 semanas e (CON) controle sem frutose. A pressão arterial foi avaliada por pletismografia de cauda. Realizou-se avaliação da glicemia de jejum e teste de tolerância à glicose e a insulina utilizando um glicosímetro. A reatividade dos leitos vasculares mesentéricos foi testada em um sistema de perfusão. Realizou-se a análise da expressão de iNOS, eNOS, Nox2 e COX-2 por *Western Blot*. A coloração com dihidroetídeo (DHE) foi utilizada para a detecção vascular de ânion superóxido (O_2^-). A microscopia eletrônica de varredura forneceu a observação ultraestrutural dos vasos. **Resultados:** A pressão arterial não foi alterada. FRU mostrou aumento da deposição de gordura visceral e peso do fígado, bem como aumento da glicose de jejum e tolerância prejudicada à insulina e a glicose. A frutose aumentou a vasoconstrição induzida por noradrenalina (NOR), que foi abolida tanto pela indometacina como pela remoção do endotélio. O relaxamento induzido por acetilcolina (ACh) foi preservado, e o L-NAME promoveu redução significativa da resposta no grupo FRU. O relaxamento induzido por nitroprussiato de sódio (NPS) não foi alterado. No grupo FRU a expressão protéica de iNOS foi maior e não houve alterações de eNOS, Nox2 e COX-2. DHE não mostrou diferenças. As imagens de microscopia eletrônica de varredura mostraram uma ligeira desordem na superfície da camada endotelial que são sugestivas de desarranjo da camada íntima com mudança da forma e disposição das células endoteliais. **Conclusões:** A ingestão elevada de frutose leva a um distúrbio metabólico e promove aumento da vasoconstrição induzida pela NOR por meio da via das prostaglandinas endoteliais, bem como aumento do relaxamento mediado pelo NO associado ao aumento da iNOS.

Palavras-chave: Frutose, Doença cardiometabólica, Síndrome metabólica, Disfunção vascular, Disfunção endotelial, Prostanóides, Mesentério

ABSTRACT

Chronic metabolic diseases are a common outcome of modern western lifestyle, as shown by the current prevalence of as obesity, insulin resistance and metabolic syndrome (MS), which correlates with increased fructose consumption and can leads to cardiovascular diseases. We hypothesize that high intake of chronic fructose mimics the early stages of cardiometabolic disease like to the MS, leading to initial vascular alterations. **Methods:** Wistar rats was separated in tow groups: (FRU) fructose 10% in drink water for 6 weeks and (CON) without fructose. Blood pressure was evaluated by tail plethysmography. Fasting glucose, insulin and glucose tolerance test was made using a strip-based glucometer. Mesenteric vascular beds reactivity was tested in a perfused system. *Western blot* analysis of iNOS, eNOS, Nox2 and COX-2 was performed. DHE stain was used to vascular O₂⁻ detection. Scanning electron microscopy provided ultrastructural vessel observation. **Results:** Blood pressure was no altered. FRU shown increased visceral fat deposition and liver weight as well as increased fasting glucose and impaired insulin and glucose tolerance. Fructose increased NE-induced vasoconstriction which was abolished by both indomethacin and endothelium removal. ACh-induced relaxation was preserved, and L-NAME promoted a significant reduction in response in the FRU group. The SNP-induced relaxation was not altered. Protein expression of iNOS was increased, however, there was no changes in the eNOS, Nox2 and COX-2. DHE shown no differences. Additionally, the scanning electron microscopy images showed a slight disarray in the endothelium layer surface that are suggestive of derangement of the intima layer with a change in the shape and arrangement of the endothelial cells. **Conclusions:** High fructose intake for 6 weeks leads to metabolic disturbance and promotes increased NOR-induced vasoconstriction through endothelial prostaglandins pathway as well as increased the NO-mediated relaxation associated with iNOS increase.

Keywords: Fructose, Cardiometabolic disease, Metabolic syndrome, Vascular dysfunction, endothelial dysfunction, Prostanoids, Mesentery.

1 INTRODUÇÃO

As doenças metabólicas crônicas são um resultado comum do estilo de vida ocidental moderno, como observado pela atual prevalência de distúrbios metabólicos como a obesidade, resistência à insulina (RI) e doenças complexas como a síndrome metabólica (SM), que pode levar a doenças cardiovasculares (DCV) (Egger & Dixon, 2014).

A síndrome metabólica (SM) é uma doença caracterizada pela coocorrência de múltiplos fatores de risco cardiometabólico. Apesar de existirem critérios divergentes para a identificação da SM, os mais amplamente aceitos referem-se à existência de obesidade, resistência à insulina / hiperglicemia, dislipidemia e hipertensão (Huang, 2009; MacLeod & McNeill, 2014). O quadro 1 resume quatro das definições de SM mais comumente utilizadas segundo a National Centers for Environmental Prediction (NCEP), Organização Mundial da Saúde (OMS), European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) e International Diabetes Federation (IDF). A alta prevalência da SM tem implicações importantes para a saúde pública, pois contribui com o aumento dos riscos de desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doenças coronarianas e o consequente aumento da mortalidade atribuída a estas doenças (Cheng et al., 2014). Por essa razão, a SM tornou-se um tema de intensa investigação e debate no ambiente científico (Johnson et al., 2009; Stanhope & Havel, 2009; White, 2009). Nesse sentido, o aumento da prevalência de fatores de risco para a SM tem sido correlacionado com o aumento do consumo de frutose (Bray et al., 2004; Havel, 2005; White, 2009), que será destacado nesse estudo, uma vez que foi objeto de nossa investigação.

Nas últimas décadas, houve um aumento importante e progressivo no uso de frutose em bebidas açucaradas e alimentos processados (Bray et al., 2004; Marriott et al. 2009; Walker et al., 2014). O xarope de milho rico em frutose (HFCS - do inglês *High-fructose corn syrup*) é o adoçante calórico mais comum usado pela indústria de bebidas (Bray, 2008) e tem contribuído significativamente para o aumento do consumo de frutose. A frutose é um açúcar metabolizado no fígado, levando ao aumento da lipogênese hepática e ao desenvolvimento de dislipidemia e RI (Bray, 2007; Stanhope, 2016). O consumo humano de bebidas adoçadas com açúcar tem sido associado ao ganho de peso e ao risco de sobrepeso e obesidade, bem como ao desenvolvimento de SM e diabetes mellitus tipo (DM2) (Malik et al., 2013).

	NCEP: ATP III (atualização 2005)	OMS (1998)	EGIR (1999)	IDF (2005)
Requisitos obrigatórios	Nenhum	IR*	Hiperinsulinemia [£]	Obesidade central (PC) [¥] : ≥94cm (M), ≥80cm (F)
Critério	Quaisquer 3 dos 5 critérios abaixo	IR ou DM2, mais 2 dos 5 critérios	Hiperinsulinemia, mais 2 dos 4 critérios abaixo	Obesidade central mais 2 dos 4 critérios abaixo
Obesidade (visceral/central)	PC: >102 cm (M), >88 cm (F)	Razão cintura/anca: >0,90 cm (M), >0,85 cm (F); ou IMC > 30 Kg/m ²	PC: ≥94 cm (M), ≥80 cm (F)	Requisito obrigatório
Hiperglicemia	Glicose em jejum ≥ 100 ^θ mg/dl ou TF	IR é requisito obrigatório	IR é requisito obrigatório	Glicose em jejum ≥ 100 mg/dl
Dislipidemia	TAG ≥150 mg/dl ou TF	TAG ≥150 mg/dl ou HDL: <35 mg/dl (M), <39 mg/dl (F)	TAG ≥177 mg/dl ou HDL <39 mg/dl	TAG ≥150 mg/dl ou TF
Dislipidemia (critério separado)	HDL: <40 mg/dl (M), <50 mg/dl (F); ou TF	X	X	HDL: <40 mg/dl (M), <50 mg/dl (F); ou TF
Hipertensão	> 130 mmHg sistólica ou > 85 mmHg diastólica ou TF	≥140/90 mmHg	≥140/90 mmHg ou TF	> 130 mmHg sistólica ou > 85 mmHg diastólica ou TF
Outros critérios	X	Microalbuminúria ^ψ	X	X

Quadro 1. Definições de Síndrome Metabólica. Adaptado de Huang et al, (2009).

*Pode ser evidenciada pelo aumento de glicose em jejum, pela intolerância à glicose ou pelo próprio diagnóstico de DM2.

£ Valor de insulina em jejum superior ao percentil 75 entre indivíduos não diabéticos.

¥ PC - Perímetro da Cintura. Critérios específicos para cada população; os valores representados dizem respeito à população Europeia

θ O valor original era 110; em 2003 a American Diabetes Association mudou o critério de hiperglicemia para 100.

ψ Excreção urinária de albumina ≥ 20µg/min ou razão albumina/creatina ≥ 30 mg/g.

TF - Tratamento farmacológico. M – Sexo masculino; F – Sexo feminino.

Da mesma forma que os dados epidemiológicos sobre o impacto da ingestão de frutose elevada na saúde humana, os modelos animais de sobrecarga crônica de frutose mostraram desenvolvimento de resistência à insulina, obesidade, pressão arterial elevada, síndrome metabólica e DM2, dependente da dose e do tempo (Abdulla et al., 2011; Lírio et al., 2016). Evidenciando que o elevado consumo de frutose está associado com o desenvolvimento da SM (Tappy & Le, 2010; Tran et al., 2009; Tran et al., 2014). A ampla gama de tempo e a dose utilizada nestes estudos levam a achados distintos observados nos relatos científicos, evidenciando as etapas progressivas do

desenvolvimento do estado dismetabólico e da doença cardiometabólica (Lehnen et al., 2013), com alterações cardiovasculares que podem levar à hipertensão.

Em relação a ação da frutose e à função dos vasos, vários estudos relataram disfunção vascular induzida por este açúcar. Mahmoud et al. (2012) e El-Bassossy et al. (2014) mostraram que o tratamento crônico leva ao aumento da vasoconstrição induzida pela fenilefrina, bem como prejuízos no relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) em anéis de aorta. Kho et al. (2014) em anéis de artérias carótidas e Shaligram et al. (2015) em artérias mesentéricas também mostraram respostas vasculares reduzidas à ACh. Por outro lado, Almenara et al. (2015) demonstraram disfunção vascular em anéis aórticos de ratos com incubação aguda com frutose, bem como sobre a ativação de NADPH oxidase (NOX), a maior fonte vascular de espécies reativas de oxigênio (EROs) como ânion superóxido (O_2^-) que pode prejudicar a função vascular. Da mesma forma, Mahmoud et al. (2014) encontraram aumento da vasoconstrição, mas não no relaxamento, pela incubação de frutose em anéis aórticos. Além disso, alterações estruturais vasculares também foram relatadas na espessura da camada média e deposição de colágeno na matriz extracelular de aorta de ratos (El-Bassossy et al., 2014).

Diferente da sobrecarga crônica de frutose em longo prazo Navarro-Cid et al. (1995) não encontraram qualquer alteração na função vascular mesentérica de ratos após 4 semanas de tratamento. No entanto, é incerto o momento exato do início das alterações vasculares (Madero et al., 2011). Tornando-se de suma importância, verificar nesse modelo de sobrecarga crônica de frutose quando ocorre a disfunção vascular, em especial em vasos de resistência, que é um passo inicial do desenvolvimento da hipertensão induzida pela frutose. Neste sentido, o leito vascular mesentérico (LVM) tem uma contribuição importante para a resistência vascular periférica (Yousif, 2008). Assim, o estudo de reatividade do LVM fornece informações valiosas sobre o controle vascular da pressão sanguínea.

Apesar de muitos efeitos negativos relacionados ao alto consumo de frutose, demonstrados em modelos humanos e animais, os mecanismos iniciais pelos quais ocorrem as alterações cardiovasculares ainda não foram bem compreendidos, em especial no LVM. Dessa forma, hipotetizamos que a sobrecarga crônica de frutose, por

um curto prazo, mimetiza os estágios iniciais de SM levando a alterações vasculares iniciais.

1.1 ENDOTÉLIO VASCULAR E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

A participação do endotélio na dilatação vascular foi demonstrada a partir de experimentos utilizando a acetilcolina (ACh) na década de 80 (Furchgot & Zawadski, 1980). Antes disso, o endotélio vascular era considerado apenas uma barreira passiva sem funções fisiológicas vasculares específicas. A partir daí foram realizados muitos estudos nessa área e atualmente são descritas diversas funções para o endotélio, dentre elas destacam-se: a regulação da dilatação e da contração vascular seja em resposta a alterações do fluxo sanguíneo ou a agentes vasoativos, a manutenção da estrutura da parede vascular, o controle do tráfego de pequenas e grandes moléculas, a contribuição na formação do coágulo e a promoção do crescimento de novos vasos sanguíneos (Carvalho et al., 2001; Félétou & Vanhoutte, 2006; Félétou & Vanhoutte, 2009, Vanhoutte et al., 2017).

As células endoteliais vasculares participam na homeostase do sistema cardiovascular controlando a camada muscular subjacente por liberação de fatores vasodilatadores e vasoconstrictores. Dentre as substâncias vasoconstrictoras e agregadoras plaquetárias derivadas do endotélio podemos destacar as endotelinas, os endoperóxidos (prostaglandina H_2 e tromboxano A_2 - TXA_2), leucotrienos, angiotensina II (AngII) e espécies reativas de oxigênio (EROs) e entre as principais substâncias vasodilatadoras e antiplaquetárias estão o óxido nítrico (NO) produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), fator hiperpolarizante dependente do endotélio (EDHF) produzidos por diferentes fontes, prostaciclina (PGI_2) produzida pela enzima ciclooxigenase (COX), outras prostaglandinas e bradicinina. Esses fatores vão atuar regulando o tônus vascular basal e a resposta vasomotora a diferentes estímulos. (Furchgott & Vanhoutte, 1989; De Oliveira et al., 1998; Vasconcelos et al., 2007; Vanhoutte et al., 2017).

Conforme mostrado na figura 1 o endotélio íntegro (condições normais) é essencial para manutenção do tônus vascular, da estrutura dos vasos, do fluxo sanguíneo, da perfusão tissular e proteção contra espasmo, trombose e aterogênese e atua por meio do equilíbrio

entre forças vasoconstrictoras e vasodilatadoras. Condições que promovem o aumento do estresse oxidativo, hiperlipidemia, diabetes, hipertensão e inflamação levam à disfunção endotelial (Melo et al., 2004; Vanhoutte et al., 2017).

O termo disfunção endotelial refere-se a um desequilíbrio na produção endotelial de mediadores que regulam o tônus vascular, agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise, sendo o tônus vascular o aspecto mais estudado. A disfunção endotelial também é frequentemente referida como a condição onde há piora no relaxamento dependente do endotélio por síntese e/ou a bioatividade reduzida dos vasodilatadores, favorecendo o aumento de vasoconstrictores derivados do endotélio, processo que pode favorecer ao aumento das DCV (Melo et al., 2004; Félétou & Vanhoutte, 2006; Félétou & Vanhoutte, 2009; Vanhoutte et al., 2017). No entanto, a produção de outras substâncias vasoativas derivadas do endotélio, como a PGI₂, EDHF, endotelina 1 (ET-1), Ang II, TXA₂, também podem estar alteradas nestas condições (Mombouli & Vanhoute, 1999).

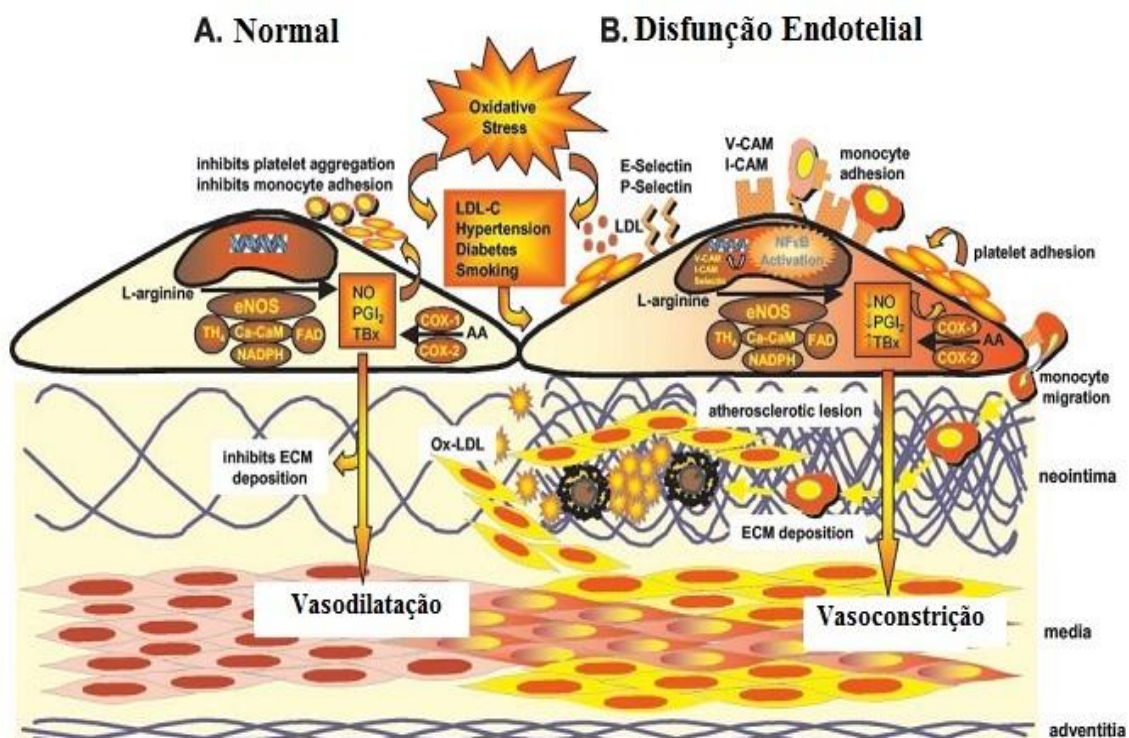


Figura 1: Fisiopatologia da disfunção endotelial. (A) Em condições normais e (B) Em disfunção endotelial. Fonte: Adaptado de Melo et. al (2004).

Várias condições, tais como a dislipidemia, hipertensão arterial, diabetes mellitus, estresse oxidativo, infarto agudo do miocárdio, deficiência de estrogênio na fase pós-menopausa, envelhecimento estão associados com disfunção endotelial. (Melo et al.,

2004, Caliman et al., 2013; Oliveira et al., 2014; Vanhoutte et al., 2017). As DCV mais comuns são acompanhadas por disfunção endotelial e devido o seu papel predominante na patogênese das DCV, o endotélio vascular é um alvo de estudos atraente.

Na literatura existem vários relatos associando a sobrecarga de frutose e a disfunção vascular. Estudos demonstram que o tratamento crônico com frutose leva ao aumento da vasoconstrição induzida pela fenilefrina, bem como a prejuízos no relaxamento induzido pela ACh em vasos de condutância (Mahmoud et al., 2012; El-Bassossy et al., 2014; Shaligram et al., 2015). Entretanto são necessários mais estudos para melhor esclarecer os mecanismos envolvidos nessas alterações, bem como melhor compreender as ações da frutose sobre a reatividade dos vasos de resistência, como nos vasos mesentéricos.

1.2 FRUTOSE

1.2.1 Características Gerais e Fontes Alimentares

A frutose é um importante carboidrato, foi isolada pela primeira vez em 1847 a partir da cana-de-açúcar (Wang & Van, 1981). Seu nome é originário da palavra latina *fructus*, já que as frutas são uma importante fonte de frutose. A frutose é um açúcar simples (monossacarídeo) que apresenta a fórmula química ($C_6H_{12}O_6$) igualmente a da glicose, diferindo dela apenas pela presença de um grupo cetônico na posição 2 da sua cadeia carbonada em comparação a um grupo aldeído na posição 1 da cadeia carbonada da glicose. É composta por seis átomos de carbono unidos em ligações covalentes simples, apresentando grupamentos hidroxila, formados por hidrogênio e oxigênio e um grupamento carbonila, formado por ligação dupla entre o carbono e o oxigênio. A frutose, contendo o grupamento carbonila no final da cadeia, quando hidrolisada, fornece a cetona, e é denominada ceto-hexose enquanto que a glicose, por sua vez, quando hidrolisada, dá origem ao aldeído, sendo chamada de aldohexose. Em equilíbrio, a frutose pode ser encontrada (70%) na forma frutopiranosose e (30%) na forma de frutofuranose (Figura 2).

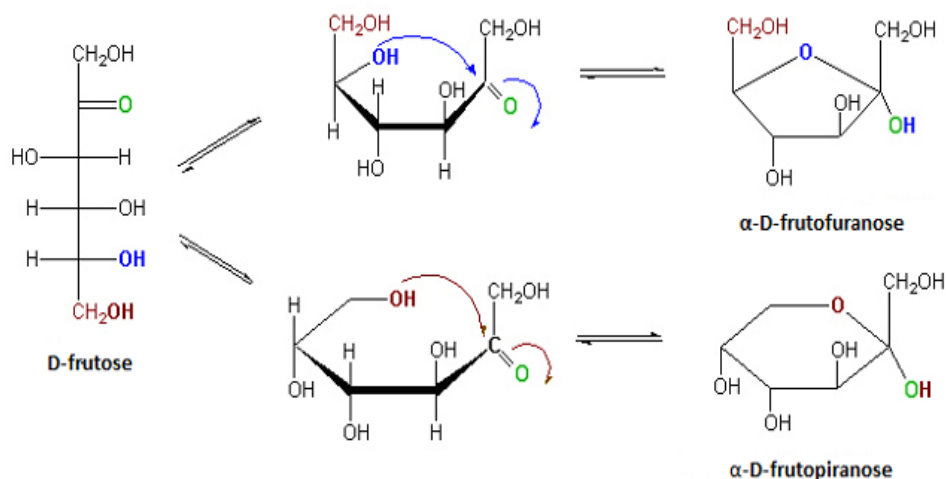


Figura 2: Formas isoméricas da frutose. Fonte: Pontis & Fischer (1963).

A frutose é encontrada de forma natural em alguns alimentos como as frutas, o mel e alguns vegetais (Barreiros et al., 2005), entretanto vem sendo tipicamente consumida como sacarose (açúcar de mesa) ou como componente do xarope de milho rico em frutose (HFCS - do inglês *High-fructose corn syrup*). A sacarose é um dissacarídeo composto por uma molécula de glicose e outra de frutose ligadas entre si por uma ligação α 1-2 glicosídica (Le & Tappy, 2006) já o HFCS é um adoçante nutritivo produzido por meio da isomerização de parte da glicose existente no xarope de milho em frutose. O HFCS vem sendo amplamente utilizado pelas indústrias em refrigerantes, produtos de padaria/pastelaria, frutas enlatadas, doces, geléias, compotas e laticínios pela facilidade do manuseio deste adoçante líquido e por seu baixo custo, o que contribuiu significativamente para que seu uso aumentasse em comparação com o da sacarose (Hanover et al, 1993)

Até os anos 60 a sacarose foi o adoçante quase exclusivo, a partir de então a indústria desenvolveu tecnologias que permitiram a extração do amido de milho e a sua transformação em adoçantes como o HFCS. A figura 3 mostra a evolução do consumo de sacarose e HFCS nos Estados Unidos da América (EUA), de acordo com o relatório do Departamento de Agricultura dos EUA (USDA) (Tappy & Le, 2010). A maioria da frutose na dieta americana não provém da fruta fresca, mas sim do HFCS e da sacarose que se encontra nos refrigerantes e doces (Bray et al., 2004).

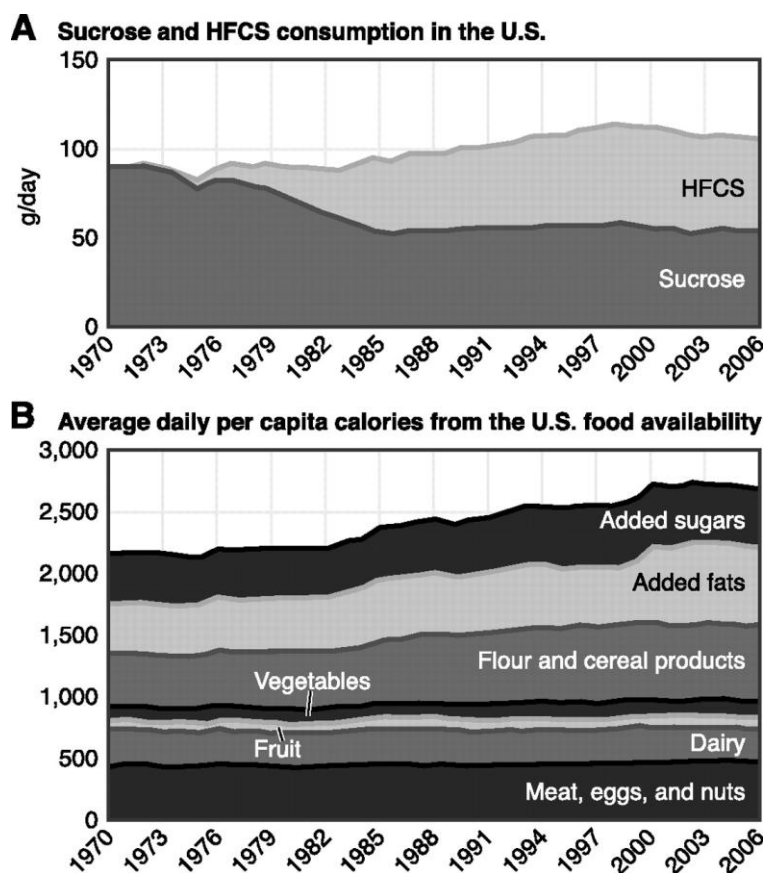


Figura 3: Evolução do consumo de xarope de milho rico em frutose (HFCS) e de sacarose nos Estados Unidos entre 1970 e 2006. Durante este período, não só o consumo total de açúcar, mas também a ingestão total de calorias e a ingestão total de gordura aumentaram significativamente. Fonte: Tappy & Le, 2010, USDA (<http://www.ers.usda.gov>).

O consumo humano de frutose era entre 16 a 20 gramas/dia, em grande parte pelo consumo de frutas frescas (Park & Yetley, 1993; Basciano et al., 2005), entretanto, nas últimas décadas a ingestão de sacarose e frutose vem aumentando, acentuadamente, em decorrência do maior consumo de produtos industrializados pela população (Bray et al., 2004). Essa ocidentalização da alimentação resultou em aumento significativo na frutose adicionada à dieta que pode atingir 60 a 100 gramas/dia e até 150 gramas/dia, se somada a frutose proveniente da sacarose (Park & Yetley, 1993; Basciano et al., 2005). Embora a ingestão de frutose não esteja bem estabelecida no Brasil, foi realizada uma estimativa baseada em dados estatísticos de consumo de produtos alimentares fornecidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), utilizando-se como fonte as pesquisas sobre orçamentos familiares. Dessa forma, foi estimado um

consumo médio de aproximadamente 4 gramas/dia de frutose livre, originária de frutas, hortaliças e outros vegetais, entretanto a quantidade de frutose advinda da sacarose é de aproximadamente 27,5 gramas/dia. Também analisando os dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009, é possível destacar um aumento considerável no consumo de refrigerantes (400%), se comparado ao consumo na década de 70 (IBGE, 2010). Monteiro et al. (2000) mostraram que a dieta do brasileiro vem sendo modificada com uma tendência de redução do consumo de alimentos naturais como frutas leguminosas e hortaliças e aumento do consumo alimentos industrializados, contribuindo assim com o aumento no consumo de açúcares simples e, conseqüentemente, de frutose, principalmente proveniente da sacarose (Monteiro et al., 2000).

Devido às características peculiares do seu metabolismo, a frutose pode induzir cada um dos fenômenos associados a SM como obesidade visceral, resistência a insulina, dislipidemia e hipertensão arterial.

1.2.2 Metabolismo da Frutose

Para melhor compreender a relação da frutose e a indução das características da SM é importante conhecer a forma como ela é metabolizada. A maior parte do metabolismo da frutose ocorre no fígado (50-75%), sendo a parte restante metabolizada principalmente pelos rins e adipócitos (Van, 1986; Froesch, 1972). A frutose é absorvida no intestino (jejuno) e transportada para o interior do enterócito por meio do transportador específico de frutose GLUT5 (transportador de glicose 5). Contrariamente à glicose, o metabolismo da frutose não requer hidrólise de ATP, é independente da absorção de sódio e não depende da estimulação pela insulina (Corpe et al., 1999; Cortez-Pinto et al., 1999; Douard & Ferraris, 2008; Tapy Lee, 2010) Após a absorção, a frutose é difundida, por meio dos vasos sanguíneos, da veia porta até o fígado sendo transportada pelo GLUT2 (Mayes, 1993; Tapy Lee, 2010).

No hepatócito, a frutose é rapidamente fosforilada no carbono 1, pela enzima frutoquinase, ou no carbono 6, pela hexoquinase. A hexoquinase tem maior afinidade com a glicose, sendo então a maior parte da frutose fosforilada no carbono 1 (Hallfrisch,

1990). A frutose-1 fosfato, a qual se acumula rapidamente no fígado é quebrada em duas trioses, diidroxiacetona e gliceraldeído-fosfato, em uma reação mediada pela aldolase B. Essas duas trioses poderão seguir três caminhos distintos, com finalidades diferentes:

- 1) Participar da via glicolítica fornecendo piruvato, que pode ser convertido para ácido láctico sob condições anaeróbicas ou entrar no ciclo do ácido cítrico como acetil coenzima A sob condições aeróbicas liberando energia (Hallfrisch, 1990);
- 2) A diidroxiconafosfato pode ser reduzida para glicerol-3-fosfato, necessário para a síntese de triacilglicerol (TAG), fosfolipídio e outros lipídios (Hallfrisch, 1990);
- 3) A diidroxiconona fosfato pode ser condensada pela aldolase até formar a frutose-1,6-bifosfato e formar glicose ou glicogênio. Dessa forma, dará origem ao piruvato, lipídios e ao glicogênio (Hallfrisch, 1990).

Na figura 4, estão apresentadas as vias metabólicas da frutose e da glicose e a inter-relação com o metabolismo lipídico e glicídico. Como o metabolismo da frutose não é afetado pelo passo regulador da glicólise, fosforilações da frutose podem levar à depleção de ATP e ao aumento na síntese de TAG.

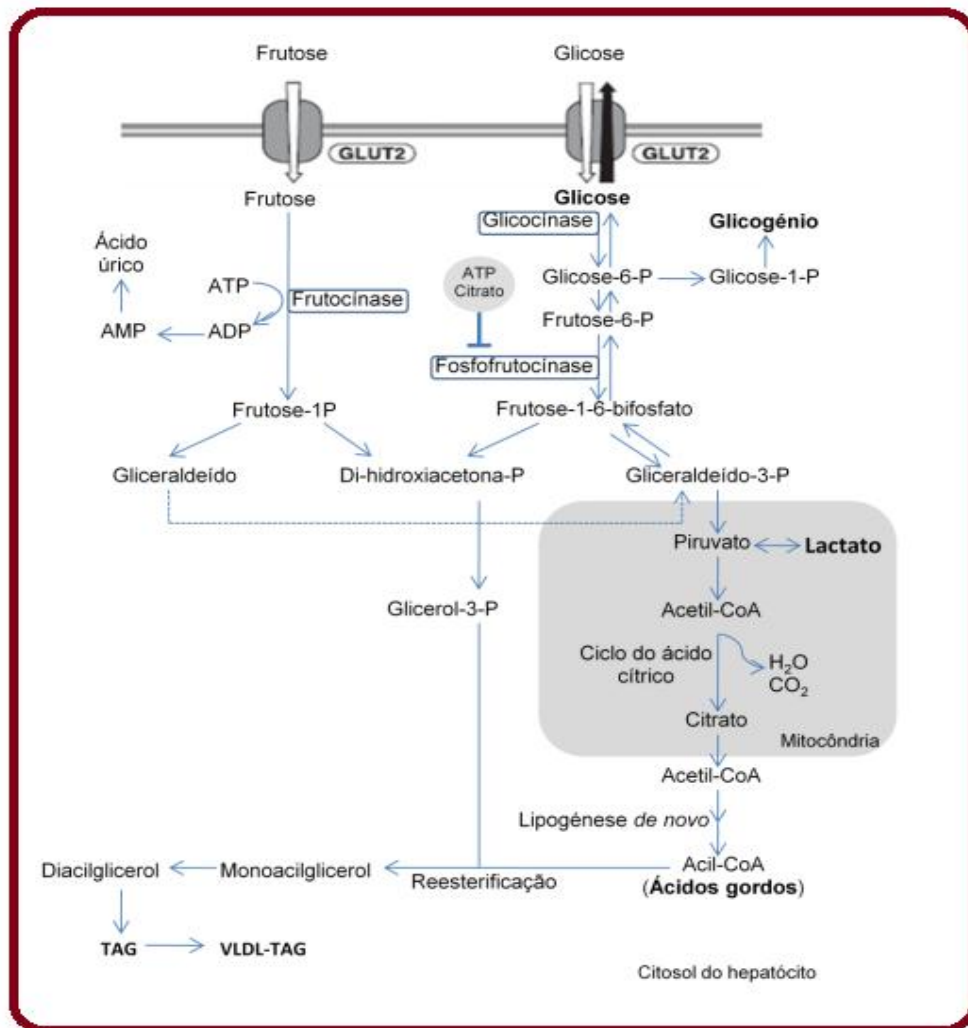


Figura 4: Metabolismo hepático da frutose. Fonte: Adaptado de Rutledge et al, 2007 e Tappy & Le, 2010.

1.2.3 Frutose na Disfunção Endotelial e Hipertensão

A disfunção endotelial pode ocorrer quando as respostas normais do endotélio são afetadas, por exemplo, pela hiperglicemia, resistência à insulina, estresse oxidativo, produtos finais de glicosilação avançada, ácidos graxos livres (AGL), citocinas inflamatórias ou adipocinas. A biodisponibilidade de NO reduzida nos vasos sanguíneos é uma característica comum da disfunção endotelial e pode resultar de uma produção reduzida de NO e/ou por aumento da sua inativação por EROs. Além disso, a

diminuição da fosforilação da eNOS parece ser um ponto comum para as diversas causas de disfunção endotelial (Melo et al., 2004; Vanhoutte et al., 2017).

Em ratos, a frutose também pode induzir aumento do ácido úrico o que pode contribuir com vários aspectos da SM, incluindo hipertrigliceridemia, hiperglicemia e hipertensão (Nakagawa et al., 2006; Sánchez-Lozada et al., 2007). Um dos mecanismos propostos é que a indução de resistência à insulina por ingestão excessiva de frutose ocorre por meio da inibição da eNOS pelo ácido úrico diminuindo assim os níveis plasmáticos de NO (Miller & Adeli, 2008). Em situações normais a insulina aumenta a biodisponibilidade endotelial de NO, promovendo a dilatação dos vasos sanguíneos e permitindo assim que a glicose chegue ao músculo com facilidade. Assim, quando há diminuição de NO, a captação de glicose diminui e mais insulina é segregada para compensar, ocorrendo hiperinsulinemia e RI (Heinig & Johnson, 2006; Nakagawa et al., 2005). O ácido úrico também pode induzir RI por seus efeitos diretos no adipócito como aumento do estresse oxidativo, resposta pró-inflamatória e a diminuição de adiponectina (Johnson et al., 2009). Portanto, disfunção endotelial induzida por ácido úrico com diminuição da produção de NO pode participar no desenvolvimento da RI em ratos alimentados com frutose, e a diminuição das concentrações de ácido úrico melhora função do endotélio (Butler et al., 2000; Doehner et al., 2002; Farquharson et al., 2002). Assim, tanto a frutose como o ácido úrico tem importante participação no desenvolvimento do fenótipo de SM.

Além disso, o aumento da adiposidade visceral, que também é observado em dietas com alta ingestão de frutose, pode causar disfunção endotelial por meio dos efeitos da resistina, IL-6 e TNF- α na diminuição da fosforilação da eNOS. Por sua vez o TNF- α pode aumentar a produção do ânion superóxido (O_2^-) que pode reagir com o NO para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), diminuindo assim a sua disponibilidade de NO nos vasos sanguíneos. Por outro lado, a adiponectina, que estimula a fosforilação da eNOS, está diminuída na SM. A frutose também pode elevar os níveis de AGL, que por sua vez contribuem para a disfunção endotelial por meio da diminuição da sinalização da via PI3K-Akt e aumento da produção de EROs e ET-1 (Huang, 2009).

Semelhantemente a resistência à insulina e a hiperlipidemia, muitos estudos mostram que uma dieta rica em frutose pode induzir hipertensão. Há diversos estudos relacionando em ratos o consumo excessivo de frutose e a hipertensão (Hwang et al

1987; Vasdev et al., 2002; 2007; Kim et al., 2010). Entretanto, há também outros relatos onde não foram observados aumento de pressão arterial nesse modelo (Bezerra et al., 2001; D'Angelo et al., 2005). Esse conflito vem sendo atribuído a componentes da dieta (Santuré et al., 2002; Nishimoto et al., 2002; Shapiro et al., 2008), diferentes linhagens e idade dos animais (Kotchen et al., 1997) , diferentes técnicas usadas para medir a pressão arterial (Brands et al., 1994; D'Angelo et al., 2005) bem como o tempo de exposição à frutose.

Apesar das incertezas quanto aos mecanismos pelo qual o consumo de frutose pode produzir elevação da pressão arterial foram propostas por Abdulla et al. (2011) diversas possibilidades (Figura 5), incluindo atenuação do baroreflexo e aumento da atividade do sistema nervoso simpático (DeAngelis, 2012), elevação de catecolaminas circulantes (Tran et al., 2009), elevação da atividade do sistema renina-angiotensina (Kobayashi et al., 1993), reabsorção de sódio aumentada (Baum, 1987), produção aumentada de ácido úrico (Nakagawa et al., 2006) e disfunção endotelial (Takagawa et al., 2002). Há evidência de que hiperinsulinemia, isoladamente, pode causar hipertensão, uma vez que administração de insulina pode elevar pressão sanguínea de ratos (Brands et al., 1991; 1992).

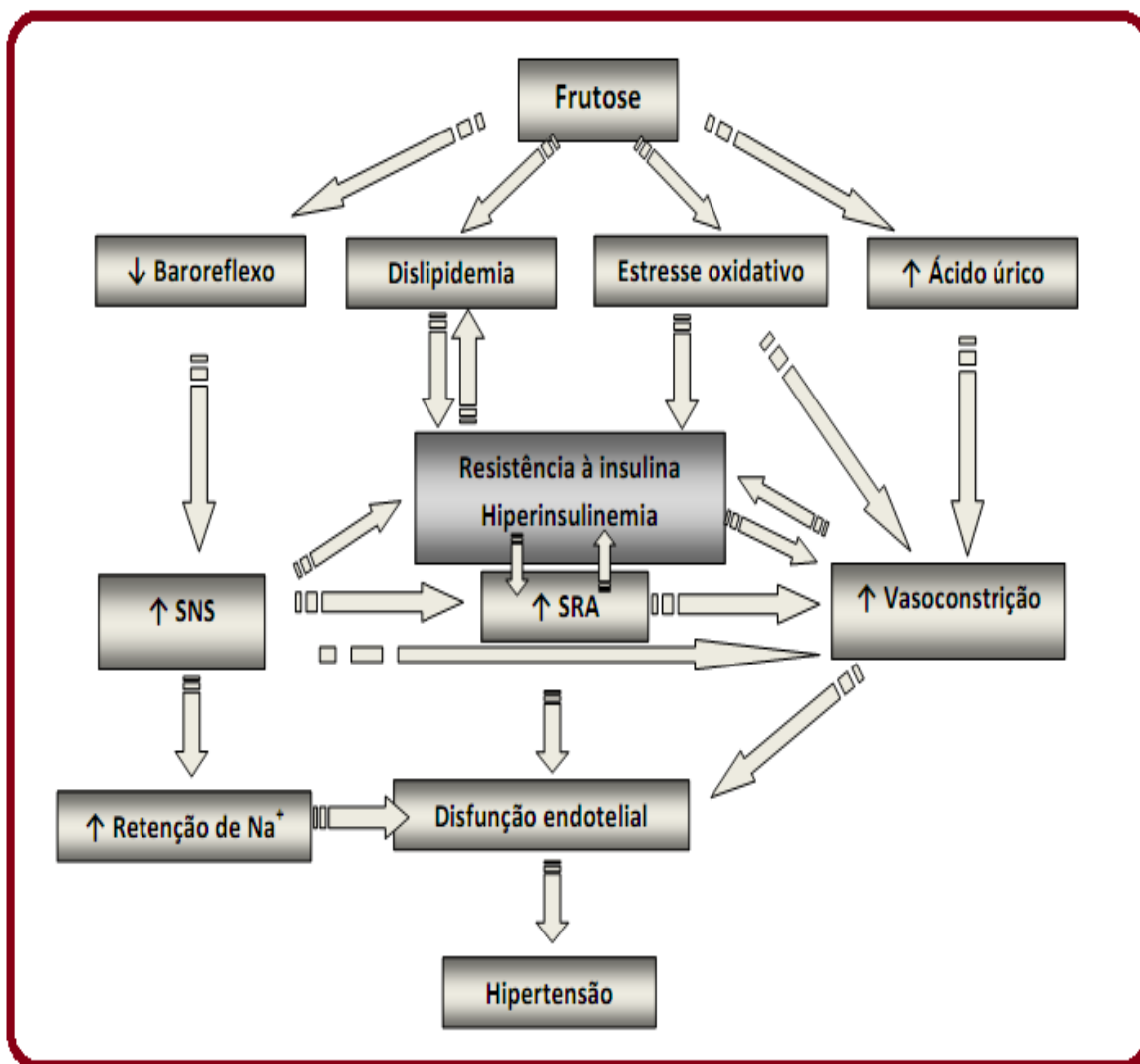


Figura 5: Mecanismo proposto da relação entre o consumo excessivo de frutose, disfunção endotelial e hipertensão. Sistema Nervoso Simpático (SNS); Sistema Renina Angiotensina (SRA). Fonte: adaptado de Abdulla et al.(2011).

Estudos mostram que a carga de açúcar contida em bebidas adoçadas pode levar à hiperglicemia, resistência à insulina, mudanças no perfil lipídico e aumento de pressão arterial que por sua vez podem desencadear respostas inflamatórias e a produção de radicais livres que afetam as funções vasculares (Malik, et al., 2013). No entanto, os mecanismos envolvidos nos efeitos cardiovasculares de uma dieta rica em frutose ainda não foram totalmente esclarecidos (Bouchard-Thomassim et al., 2011). Assim, o presente estudo tem como objetivo investigar potenciais vias e mediadores da relação entre o consumo excessivo de frutose e as alterações vasculares.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da alta ingestão de frutose por seis semanas sobre os parâmetros funcionais e estruturais dos vasos mesentéricos de ratos normotensos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da alta ingestão de frutose em ratos em relação:

- A parâmetros ponderais, glicemia de jejum, teste de tolerância a glicose e insulina;
- A resposta vascular de contração à noradrenalina (NOR) e de relaxamento à acetilcolina (ACh) e ao nitroprussiato de sódio (NPS) no leito vascular mesentérico;
- A participação da via do óxido nítrico, dos prostanóides derivados da ciclooxigenase e do endotélio nas respostas à NOR e ACh;
- A produção de ânions superóxido em artérias mesentéricas;
- A expressão de proteínas: eNOS, iNOS, Nox-2 e COX-2.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com 6 semanas de idade e peso corporal variando entre 160-180 gramas. Esses animais foram fornecidos pelo Biotério de Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Os experimentos foram aprovados pelo CEUA 045/2014 e conduzidos de acordo com e o "Guia para o cuidado e uso de animais de laboratório - 2011". Os animais foram mantidos em ambiente com iluminação artificial (ciclo claro-escuro de 12h) e temperatura de 25 °C de acordo com o recomendado para biotérios de pesquisa. As gaiolas permitiram o livre acesso dos animais à ingestão de água e ração (ração Probiotério, Moinho Primor, S.A).

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram separados aleatoriamente em 2 grupos experimentais:

- 1) CON: grupo controle, mantidos com água potável por seis semanas.
- 2) FRU: grupo frutose, mantidos por seis semanas com frutose 10% em água potável.

3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Os experimentos foram realizados seguindo-se o cronograma abaixo (figura 6):

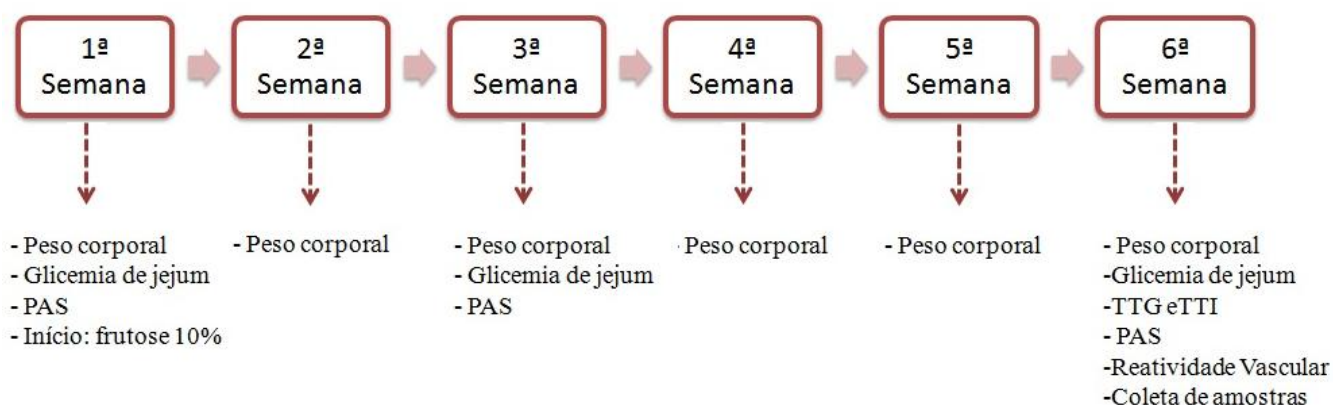


Figura 6: Organograma do Protocolo Experimental. PAS: pressão arterial sistólica; TTG: teste de tolerância à glicose; TTI: Teste de tolerância insulina.

3.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS

3.4.1 Evolução ponderal e coleta de amostras

Os animais foram pesados no início do protocolo experimental e separados aleatoriamente entre os grupos CON e FRU. Ao final de cada semana do protocolo experimental, o peso corporal dos animais foi verificado obtendo-se os valores de pesos de ambos os grupos ao longo das seis semanas do protocolo.

Ao final do estudo os animais foram anestesiados com associação ketamina/xilazina (100 / 10 mg.kg⁻¹, i.p.) e fígado, rins, gordura epididimal, gordura retroperitoneal, gordura mesentérica, músculo gastrocnêmio e ventrículos foram isolados, lavados com solução fisiológica e pesados utilizando uma balança analítica de precisão. A tibia também foi isolada, limpa e medida seu comprimento.

A massa dos órgãos foi estimada dividindo o peso do órgão (g) pelo comprimento da tibia (cm). Para obtenção do peso da gordura visceral, foi realizado o somatório do peso das gorduras epididimal, retroperitoneal e mesentérica.

3.4.2 Glicemia em Jejum, Teste de Tolerância à Insulina e Glicose

Para todos os testes, foram colhidas amostras de sangue da cauda e a glicemia medida pelo glicosímetro à base de tira (Accu-Chek Active, Roche, Alemanha). A glicemia de jejum foi avaliada na linha de base e após três e seis semanas de tratamento. Os animais foram submetidos ao jejum por um período de aproximadamente 12-14 horas antes da realização do teste.

Para realização do teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TTI) foi administrada insulina (1 UI / kg, ip) após 6 h de jejum, e as amostras de sangue foram recolhidas sequencialmente a intervalos de 0, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos. O teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTG) foi realizado após jejum de 12h. Injetou-se glicose (2 g / kg, ip) e foi realizada a aferição da glicemia basal e nos tempos 5, 10, 20, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose

3.4.3 Medidas de Pressão Arterial Sistólica (PAS)

A pressão arterial sistólica (PAS) foi avaliada na linha de base e após três e seis semanas do tratamento com frutose.

As medidas foram obtidas, nos animais acordados, por meio de método indireto não invasivo, pletismografia de cauda. Em um pletismógrafo, os animais foram acondicionados em uma câmara aquecida (38-39 °C), com um *cuff* de pulso pneumático acoplados na região proximal da cauda. Um esfigmomanômetro foi insuflado e desinsuflado automaticamente e o valor da pressão arterial sistólica (PAS) foi obtido por meio dos sinais do transdutor acoplado a um computador. Todos os animais foram adaptados ao procedimento antes da obtenção de registros. Foram realizadas três medidas testes e após verificar se todas as condições estavam adequadas (posição, adaptação e relaxamento do rato; temperatura e posição do *cuff*) foram feitas três medidas para o cálculo da média aritmética da PAS de cada animal.

3.5 PREPARAÇÃO DE LEITOS VASCULARES MESENTÉRICOS

O leito vascular mesentérico (LVM) foi isolado segundo descrição de McGregor (1965). Após a anestesia com associação ketamina/xilazina ($100/10 \text{ mg.kg}^{-1}$, i.p.), foi realizada laparotomia para permitir acessar a artéria mesentérica superior. Posteriormente a artéria mesentérica superior foi isolada (figura 7) e cateterizada com uma cânula de polietileno (PE50) em sua porção mais distal, e a porção-proximal foi armazenada para outras análises. Imediatamente, por meio de uma bomba peristáltica (Ismatec AS Laboratorium Technik, Switzerland), o leito foi perfundido num sistema *ex vivo* com fluxo de 4 mL.min^{-1} em solução fisiológica de Krebs-Henseleit modificada, gaseificada por borbulhamento com carbogênio (95% O_2 , 5% CO_2) para manter o $\text{pH}=7,4$ e mantida a 37°C . A solução fisiológica tinha a seguinte composição (mM): NaCl 130, KCl 4,7, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,17, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,6, KH_2PO_4 1,18, NaHCO_3 14,9 e glicose 11,1 mM. Então o leito como um todo foi cuidadosamente removido, liberado em sua borda dos intestinos, e colocado num banho de órgão isolado.

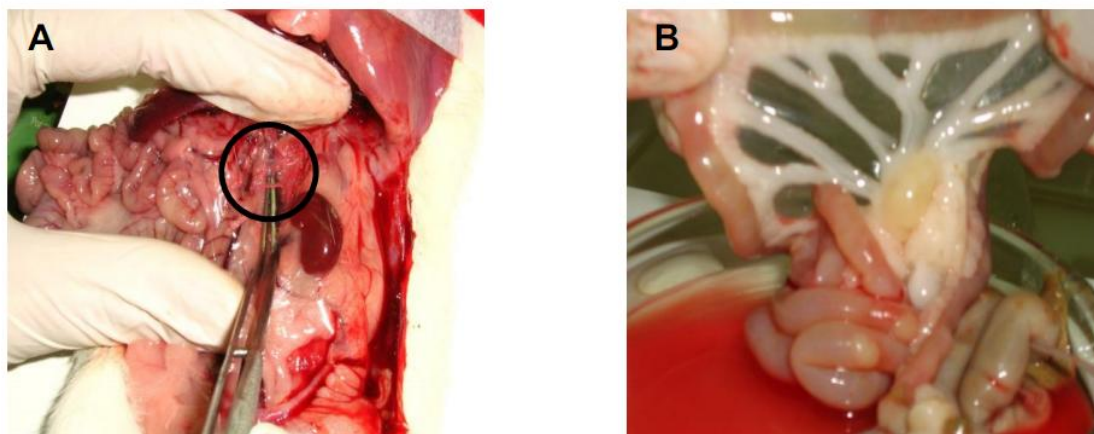


Figura 7: Fotografia da artéria mesentérica superior e do leito mesentérico. (A) artéria mesentérica superior. (B) leito mesentérico, após cateterização da artéria mesentérica, sendo perfundido pela solução nutritiva. Fonte: acervo do laboratório.

3.5.1 Reatividade vascular no LVM

Para a avaliação da reatividade vascular a pressão de perfusão (PP) dos LVMs foi medida por meio de um transdutor (TSD104A - Biopac® Systems, inc.) ligado a um sistema de aquisição de dados (MP100 - Biopac® Systems, inc.) e utilizando o software AcqKnowledge 3.9.1 (Biopac Software de Aquisição e Análise de Dados). Após 30 minutos de estabilização, foram obtidas curvas dose-resposta por injeções in bolus (0,1 ml, 10-10⁻² M) de noradrenalina (NOR - Hipolabor, Belo Horizonte, MG), acetilcolina (ACh - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e nitroprussiato de sódio (NPS - Hipolabor, Belo Horizonte, MG) diretamente na corrente de perfusão. Para ACh e NPS, o PP basal foi previamente elevado por vasoconstrição provocada com NOR (6-30 µM) adicionado na solução fisiológica. As respostas a NOR e ACh foram estudadas antes e após inibidores farmacológicos: N^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME: 100 µM - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), um inibidor da NOS; Indometacina (INDO: 10 µM- Farmácia Alquimia, Vitória, ES, Brasil), um inibidor de COX; E após remoção do endotélio por perfusão com 3-[(3-colamidopropil)-dimetil-amônio]-1-propano-sulfonato (CHAPS - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 0,3%.

3.5.2 Análise dos resultados de reatividade vascular

Para a análise de respostas de vasoconstrição induzida por fármaco, cada dose de fármaco administrada sob perfusão de pressão basal (P1) conduz a uma elevação na perfusão de pressão (P2). A resposta de vasoconstrição foi calculada como o ΔPP evocado, como se segue: $\Delta PP = P2 - P1$. Para a análise de respostas de relaxamento induzida por fármaco, a perfusão de pressão basal (P1) foi elevada (P2) constantemente pela adição de NOR na SF. Em cada dose de fármaco administrada, a pressão elevada anterior foi reduzida (P3). O relaxamento (%) foi calculado como queda percentual no PP pela administração do fármaco em relação à pré-contração prévia de NOR, como se segue: $\text{relaxamento (\%)} = 100 * (P2 - P3) / (P2 - P1)$. Para cada curva dose-resposta foi calculada a sensibilidade (pD2), área abaixo da curva (AUC) e diferença entre as AUCs (dAUC) em relação AUC da curva controle.

3.6 ESTUDO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS – DIHIDROETÍDEO (DHE)

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi determinada utilizando-se um método que envolve o dihidroetídeo (DHE), um precursor não fluorescente do brometo de etídeo, e que permite analisar a produção “in situ” de radicais livres. Na presença de EROs o hidretídeo é oxidado dentro da célula, produzindo os compostos fluorescentes etídeo (E) e 2-hidroxi etídeo (EHO) que tem afinidade pelo DNA nuclear. A formação do etídeo se deve principalmente a oxidação da DHE pelo ânion superóxido, enquanto o EHO é formado pela oxidação da DHE por outras EROs como o peróxido de hidrogênio. Os ratos foram anestesiados, a artéria mesentérica superior foi rapidamente dissecada e imersa em solução de Krebs (8 mM HEPES, 2mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 130mM NaCl, 5mM KCl, 2,45mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 11,1mM glicose, pH 7,4) por um período de 2:00 hs. Após, estas foram congeladas em meio de inclusão para congelamento (Tissue-Tek OCT Compound, Sakura) e mantidas a -80°C até o momento da análise. Utilizando-se um criostato (CM 1850, Leica Microsystems, Alemanha), cortes transversais das artérias (8 μm) foram obtidos e colocados em lâminas gelatinizadas e secos em estufa a 37°C por 20 minutos. Após, as lâminas contendo os cortes foram lavadas e incubadas com Krebs por 30 minutos a 37°C . Decorrido o tempo, as lâminas tiveram o excesso de líquido removido e, em seguida, foi realizada a incubação DHE 2 μM (30 minutos, 37°C) em câmara úmida e protegidos da luz (Camporez et al., 2011). A fluorescência emitida foi visualizada em microscópio de fluorescência invertido (DM 2500, Leica Microsystems, Alemanha) equipado com câmera fotográfica, utilizando uma objetiva de fluorescência com aumento de 100X e 400X. As imagens foram quantificadas pelo programa Image Pro Plus, sendo o resultado expresso como intensidade de fluorescência, normalizado pela intensidade do background e posteriormente convertido e apresentado como percentual do valor controle. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Histologia Molecular e Imunohistoquímica - LHMI da UFES.

3.7 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PROTEICOS POR *WESTERN BLOT*

Para análise da expressão de eNOs, iNOS, COX2 e Nox2 a técnica utilizada foi a de a de *western blot*, sendo utilizado o sistema descrito por Laemmli (1970).

3.7.1 Extração das proteínas

Os LVMs de ratos anestesiados foram isolados e a árvore mesentérica foi dissecada e separada de seus tecidos conectivos, de forma que as os ramos de primeira, segunda, terceira e quarta ordem fossem representativos entre as amostras. Posteriormente as amostras foram armazenadas no freezer -80°C e mantidas até o momento da homogeneização, que foi em 150 μL tampão de extração [Tris-HCL pH 7,4 (10 mM), PMSF (1 mM), NaVO_3 (1 mM), SDS (1%), DTT (0,5 mM), EDTA (5 mM) e coquetel de inibidor de protease Diluição 1: 100]. A homogeneização foi realizada utilizando-se um banho ultra-sônico, sendo seguida de centrifugação a 6000 rpm, 4°C por 10 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados em alíquotas a -80°C . Este extrato total foi utilizado para realização da expressão de eNOS, iNOS, COX-2 Nox-2.

3.7.2 Dosagem das proteínas

A determinação do conteúdo de proteína total nos ramos mesentéricos foi realizada por meio do método descrito por Bradford (1976). O ensaio de Bradford foi realizado em placa de ELISA, consistindo num volume final de 200 μL para cada poço da placa. A solução padrão foi obtida a partir de diluições de albumina do soro bovino (BSA) em água destilada com concentração estoque final de 1mg/mL. Essa solução foi diluída para a obtenção da curva padrão com as seguintes concentrações de BSA: 0,10 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,75 mg/mL; 1,0 mg/mL; além do branco (somente água destilada). Alíquotas dos homogenatos dos ramos mesentéricos foram utilizadas como amostras. Aplicou-se 5 μL das amostras de proteína em cada placa e adicionou-se 195 μL de reagente Bradford. Após 5 minutos foi efetuada a leitura da absorbância no

comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro. Todas as amostras foram feitas em duplicata.

3.7.3 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)

Foram realizados testes preliminares de forma a alcançar e estabelecer as melhores condições de separação, qualidade da banda e diluições do anticorpo e assim obter uma melhor otimização das condições do *western blot*. Assim, foram utilizadas diferentes quantidades de extratos proteicos dependendo da proteína. Foi feita a eletroforese em gel (acrilamida/bisacrilamida 30%), com gel de separação a 10% nos extratos proteicos (25 µg para eNOS e Nox-2; 50 µg iNOS e COX-2). O gel de separação foi preparado em tampão contendo 1,5 M tris-HCl pH 8,6 e 0,1% de SDS e o gel de empacotamento a 4% em tampão 0,5 M tris-HCl pH 6,8 e 0,1% de SDS. As amostras foram aplicadas nos géis na presença de tampão de amostra (Tris-HCl, SDS, DTT e azul de bromofenol). Antes da aplicação no gel as amostras foram aquecidas a 100 °C durante 5 min. A eletroforese foi realizada utilizando-se o tampão de eletroforese (25 mM de tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS), sendo esta realizada inicialmente em 60 volts por 30 minutos e posteriormente em 150 volts até a finalização da separação.

3.7.4 Transferência das proteínas

Após a separação das proteínas por eletroforese, foi realizada a transferência das proteínas eNOS, iNOS, Nox-2 e COX-2 para uma membrana de nitrocelulose em cuba molhada (Biorad) na presença do tampão de transferência constituído por 25 mM de tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glicina e 20% (v/v) de metanol, overnight, 0,25 A à 4°C.

3.7.5 Incubação dos anticorpos

Após a transferência das bandas de proteínas, as membranas de nitrocelulose, foram incubadas por 4 h em uma solução de leite livre de gorduras (5%) em tampão TBS-tween 0,1% (20 mM de tris-HCl pH 7,4 e 150 mM de NaCl), 4 °C sob agitação leve para realização do bloqueio de sítios inespecíficos. Em seguida, foi realizada a incubação com os seguintes anticorpos primários: anti-eNOS, anti-iNOS (1: 2000, 1: 2000, 1: 500, BD Transduction Laboratories); Anti-gp91phox (Nox2), anti-COX-2 (1: 200, Cayman Chemical); e anti-GAPDH (1: 4000, Merck Millipore) overnight à 4 °C sob agitação leve.

Após este período, as membranas foram lavadas em tampão TBS-tween 0,1%, sob agitação leve em temperatura ambiente e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1: 5000, Abcam Inc) por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação suave, seguida de lavagem com tampão TBS-tween 0,1%, e posteriormente com tampão TBS. Para a detecção da ligação proteína-anticorpo foi realizada a incubação das membranas com ECL para geração de sinal fluorescência enzimática e depois foram analisadas em ChemiDoc Imaging Systems (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Os sinais de imunoblot foram quantificados utilizando o software Bio-Rad Image Lab 5.2.1 e os níveis de expressão das proteínas foram normalizados para GAPDH. Os dados são de dois experimentos independentes (Géis).

3.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Amostras típicas de artéria mesentérica superior foram fixadas na solução de Karnovisk (Glutaraldeído 2,5% + Paraformaldeído 2% em Tampão Cacodilato 0,1 M a pH 7,2) por 24 horas. Após-fixação foi realizada com ferrocianeto de potássio 1,25% e Tetróxido de Ósmio 1,0% (Tampão Caco 0,1 M; pH 7,2) por uma hora a temperatura ambiente. Após esta etapa, o material foi desidratado em gradiente crescente de etanol (30, 50, 70, 90, 100 %) e levadas para secagem em ponto crítico (Autosandri-815, Tousimis). A cobertura de ouro foi realizada em metalizador (Desk V, Denton Vacuum) e posteriormente as amostras foram levadas para observação em um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM6610 LV) operado a 20 KV com filamento de

tungstênio. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins - LUCCAR da UFES.

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). Para análise das curvas dose-resposta foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias e para as demais comparações foi utilizado o teste *t*, ambos seguidos pelo *post hoc* de Bonferroni. As análises foram realizadas utilizando o GraphPad Prism (versão 7.02, EUA). $P < 0,05$ foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

4.1 PRESSÃO ARTERIAL, PARÂMETROS PONDERAIS E METABÓLICOS

Os animais iniciaram o protocolo experimental com peso corporal semelhante e não houve diferenças entre os grupos ao longo das seis semanas de tratamento, contudo, a frutose elevou a glicemia de jejum a partir da terceira semana (Figura 8 A).

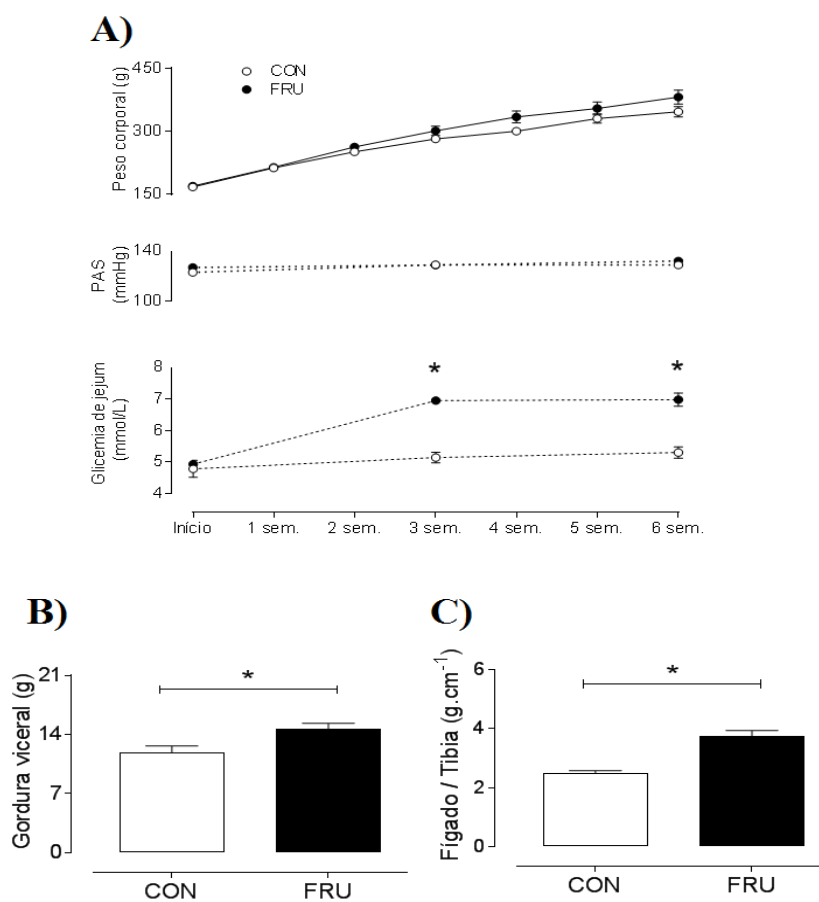


Figura 8: Pressão arterial sistólica (PAS), parâmetros ponderais e metabólicos ao longo de 6 semanas de tratamento nos grupos (○) CON e (●) FRU. Os dados foram expressos como média \pm EPM, n= (10) por grupo. * $p < 0,05$ vs. CON.

Por outro lado, em nosso estudo não houve alterações nos valores da pressão arterial (Figura 8A), peso do rim, peso do músculo gastrocnêmio e peso dos ventrículos (Tabela 1). Além disso, a frutose induziu aumento da gordura visceral (Figura 8B) e do peso do fígado (Figura 8C; Tabela 1). Mostrando que apesar de não haver diferenças no peso corporal dos animais, a frutose foi capaz de promover acúmulo de gordura abdominal e não houve alterações da massa magra.

Tabela 1: Peso de órgãos em gramas (g) e razão destes com o comprimento da tíbia em centímetros (cm) nos grupos CON, FRU

	Grupos (n=10)	
	CON	FRU
Comprimento da tíbia (cm)	4,24 ± 0,05	4,17 ± 0,06
Ventrículos (g)	0,86 ± 0,05	0,90 ± 0,05
Rim (g)	1,11 ± 0,06	1,15 ± 0,08
Fígado (g)	10,95 ± 0,60	15,69 ± 0,95 *
Gastrocnêmio (g)	1,99 ± 0,09	2,01 ± 0,08
Ventrículos / tíbia (g/cm)	0,20 ± 0,01	0,22 ± 0,01
Rim / tíbia (g/cm)	0,26 ± 0,01	0,28 ± 0,02
Fígado/ tíbia (g/cm)	2,58 ± 0,12	3,75 ± 0,19 *
Gastrocnêmio/ tíbia (g/cm)	0,47 ± 0,02	0,48 ± 0,02

Dados expressos como média ± EPM, n= (10) por grupo. * p<0,05 vs. CON.

4.2 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA E GLICOSE

Para avaliar a tolerância à insulina foi realizado o monitoramento dos níveis de glicose no sangue após a injeção de insulina exógena (1U/kg, *ip*). A AUC está aumentada no grupo FRU mostrando uma menor capacidade deste grupo em reduzir a glicose no sangue mesmo após a ingestão de insulina o que demonstra que a tolerância à insulina foi reduzida no grupo FRU (Figura 9).

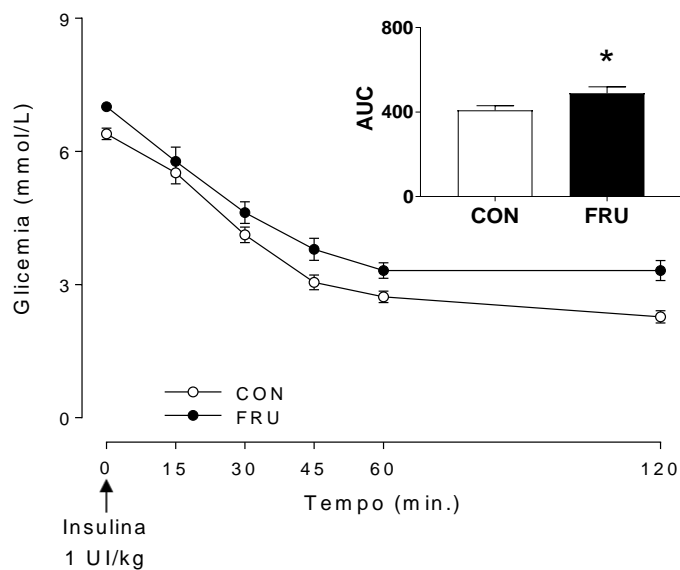


Figura 9: Teste de tolerância a insulina nos grupos (○) CON e (●) FRU. Curva e AUC do teste. Dados foram expressos como média \pm EPM, n= 10 por grupo. * $p < 0,05$ vs. CON.

Além disso, injetou-se uma solução com alta concentração de glicose (2g/kg, *ip*) e foi realizada a aferição da glicemia basal ao longo do tempo. A figura 10 mostra o decurso no tempo da glicose no sangue depois da injeção da solução. A AUC está aumentada no grupo FRU mostrando uma menor capacidade deste grupo em reduzir a glicose no sangue no decorrer do tempo após a ingestão de glicose o que mostra que a tolerância à glicose foi reduzida no grupo FRU (Figura 10).

Tomados em conjunto estes dados mostraram que a frutose promoveu aumento na AUC dos testes de tolerância à insulina e glicose (Figura 9 e 10) indicando resistência à insulina.

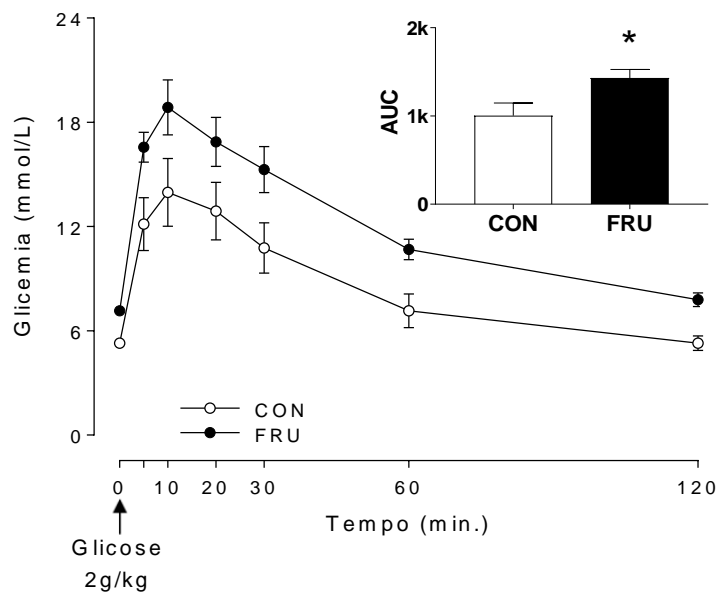


Figura 10: Teste de tolerância a glicose nos grupos (○) CON e (●) FRU. Curva e AUC do teste. Dados foram expressos como média \pm EPM, $n=10$ por grupo. * $p<0,05$ vs. CON.

4.3 REATIVIDADE VASCULAR DO LEITO MESENTÉRICO

4.3.1 Reatividade Vascular em resposta à NOR

A resposta mediada pela NOR (Figura 11) produziu contração no LVM dependente da concentração da droga em todos os grupos estudados. O tratamento com frutose resultou no aumento da resposta de vasoconstrição induzida por NOR no LVM, conforme observado (Figura 11A-B) pelo desvio da curva para esquerda e no maior valor da área abaixo da curva (AUC), no entanto, não houve alterações na sensibilidade a droga (pD₂ - CON $3,74 \pm 0,09$ vs. FRU: $3,97 \pm 0,14$).

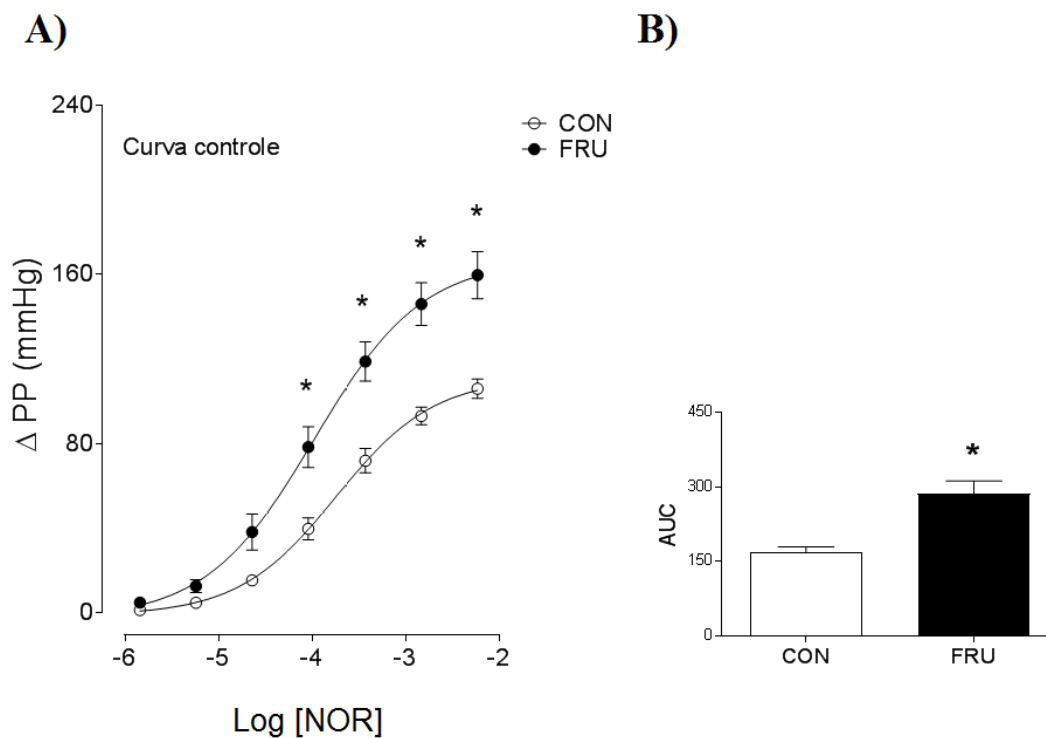


Figura 11: Efeitos do tratamento com frutose na curva dose-resposta de vasoconstrição induzida por NOR no leito vascular mesentérico dos grupos (○) CON e (●) FRU na ausência de inibidores. (A) Curva controle de NOR. (B) Área abaixo da curva (AUC) da curva controle de NOR. Dados foram expressos como média \pm EPM, n= 15 por grupo, *p<0,05 vs. CON.

A incubação com o inibidor L-NAME conduz a maior resposta de NOR em ambos os grupos quando comparados as curvas na ausência do inibidor (Figura 12A-B). Além disso, podemos observar que este aumento na contração evocado pelo bloqueio com L-NAME apresenta uma magnitude semelhante nos grupos e as diferenças existentes entre os grupos na curva controle (na ausência do inibidor) permanecem existindo após o uso do L-NAME (Figura 12A-B).

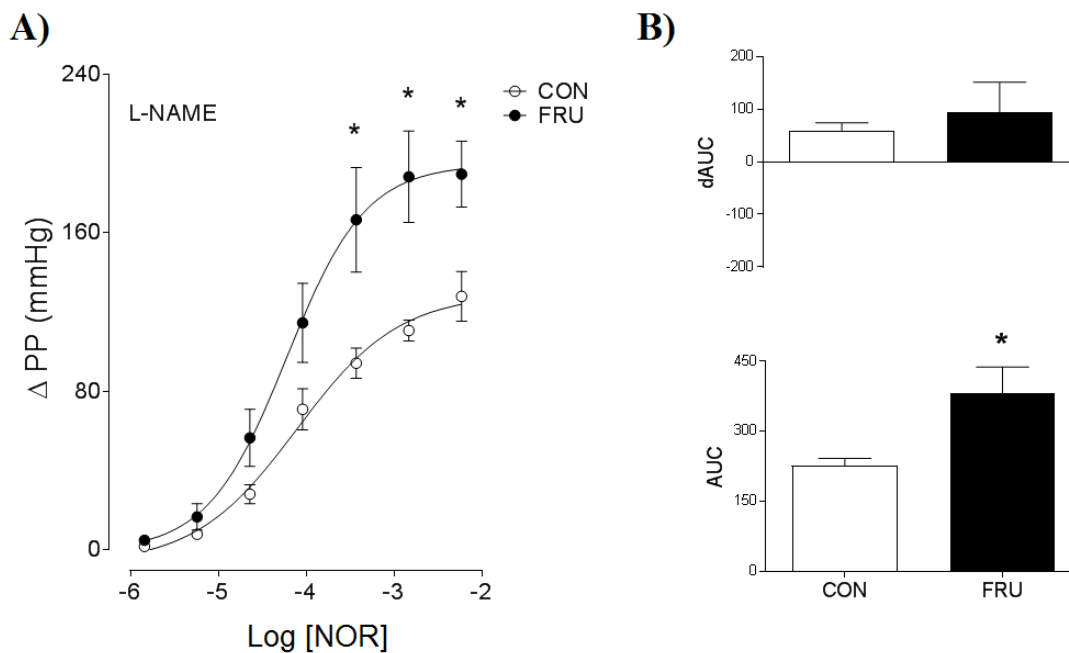


Figura 12: Efeitos do tratamento com frutose na curva dose-resposta de vasoconstrição induzida por NOR no leito vascular mesentérico dos grupos (○) CON e (●) FRU na presença de L-NAME. (A) Curva de NOR na presença de L-NAME. (B) Diferença de área abaixo da curva (dAUC) antes e depois da presença de L-NAME e área abaixo da curva (AUC) dos grupos após inibição com L-NAME. Dados foram expressos como média \pm EPM, $n=5$ por grupo. * $p<0,05$ vs. CON.

Por outro lado, a inibição da COX por incubação com INDO leva à redução das respostas de vasoconstrição, que foi maior no grupo FRU (Figura 13A-B). Além disso, podemos observar que após o bloqueio da COX as respostas entre os grupos se igualam sugerindo que, ao menos em parte, as diferenças antes observadas, podem estar relacionadas a esta via específica (Figura 13A-B).

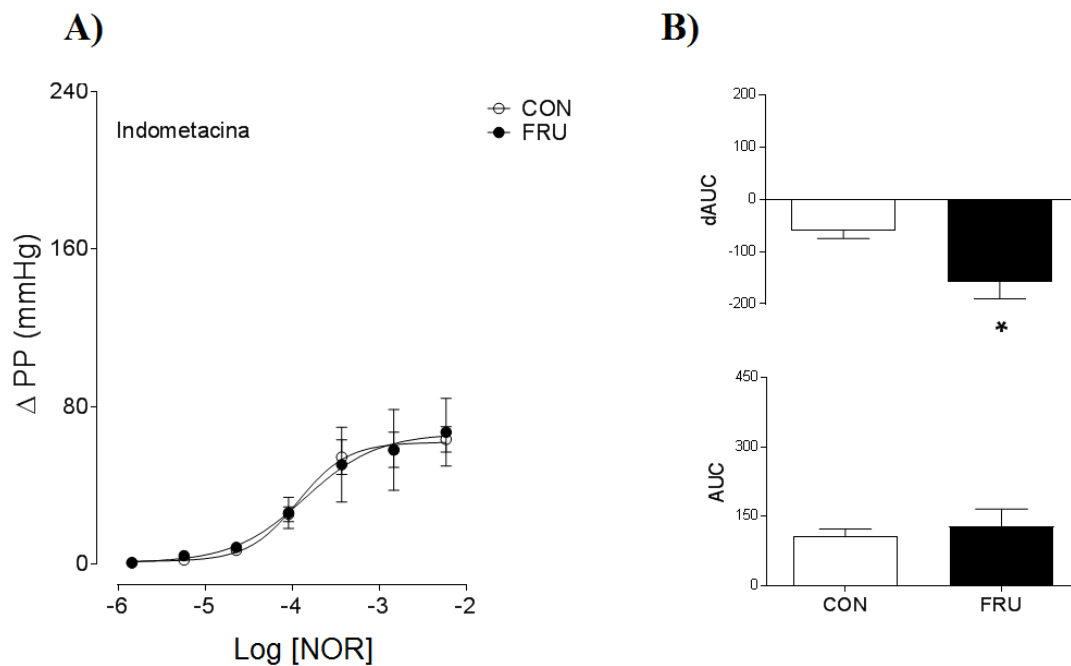


Figura 13: Efeitos do tratamento com frutose na curva dose-resposta de vasoconstrição induzida por NOR no leito vascular mesentérico dos grupos (○) CON e (●) FRU na presença de indometacina (INDO). (A) Curva de NOR na presença de INDO. (B) Diferença de área abaixo da curva (dAUC) antes e depois da presença de INDO e área abaixo da curva (AUC) dos grupos após inibição INDO. Dados foram expressos como média ± EPM, n= 5 por grupo. *p<0,05 vs. CON.

Além dos bloqueios farmacológicos foi realizada a remoção do endotélio por meio de perfusão do LVM com CHAPS para melhor investigar a participação do endotélio nas repostas obtidas. A remoção do endotélio aumentou a resposta à NOR no grupo CON enquanto reduziu no grupo FRU, extinguindo as diferenças entre os grupos (Figura 14A-B).

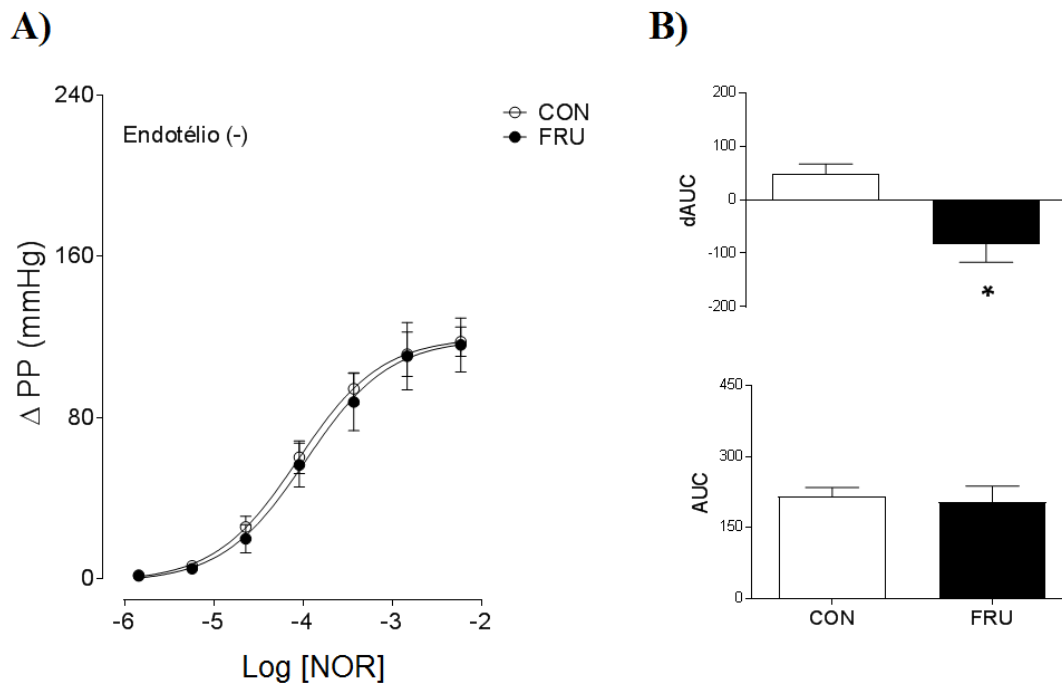


Figura 14: Efeitos do tratamento com frutose na curva dose-resposta de vasoconstrição induzida por NOR no leito vascular mesentérico dos grupos (○) CON e (●) FRU após remoção do endotélio com CHAPS. (A) Curva de NOR após remoção do endotélio. (B) Diferença de área abaixo da curva (dAUC) antes e após remoção do endotélio e área abaixo da curva (AUC) dos grupos após remoção do endotélio. Dados foram expressos como média \pm EPM, n= 5 por grupo. *p<0,05 vs. CON.

4.3.2 Reatividade vascular em resposta a ACh

A resposta vascular de relaxamento induzida pela ACh produziu um relaxamento no LVM dependente da concentração da droga em todos os grupos estudados e não foi alterada pelo tratamento com frutose (Figura 15A-B) assim como a sensibilidade (pD₂ - CON $6,04 \pm 0,13$ vs. FRU: $6,11 \pm 0,23$).

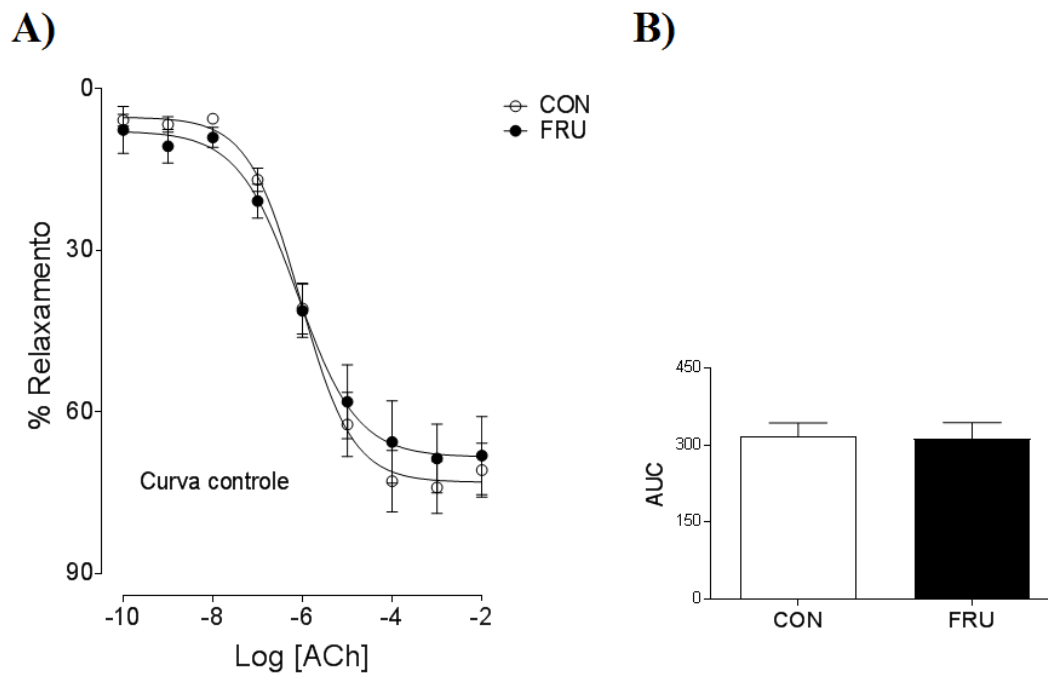


Figura 15: Efeitos do tratamento com frutose na curva dose-resposta de relaxamento induzido por ACh no leito vascular mesentérico dos grupos (○) CON e (●) FRU na ausência de inibidores. (A) Curva controle de ACh. (B) Área abaixo da curva (AUC) da curva controle de ACh. Dados foram expressos como média \pm EPM, n= 10 por grupo.

A incubação com L-NAME reduziu acentuadamente o relaxamento induzido por ACh em ambos os grupos, mas com maior magnitude na FRU (Figura 16A-B) demonstrando a participação da via do NO no relaxamento do LVM dos grupos estudados.

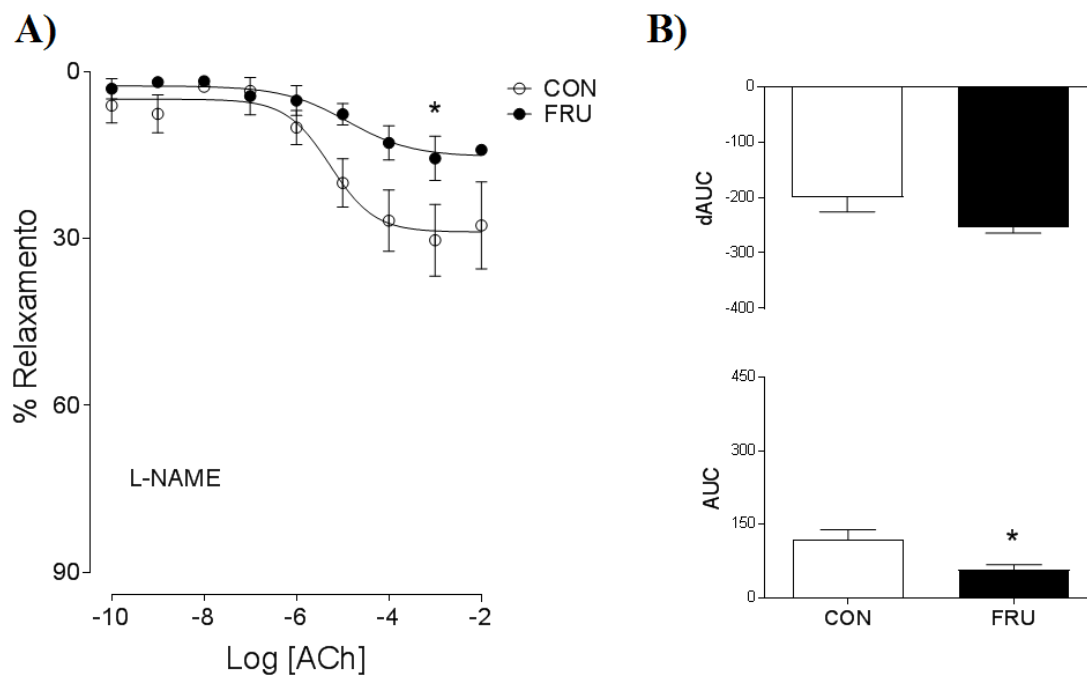


Figura 16: Efeitos do tratamento com frutose na curva dose-resposta de relaxamento induzido por ACh no leito vascular mesentérico dos grupos (○) CON e (●) FRU na presença de L-NAME. (A) Curva de ACh na presença de L-NAME. (B) Diferença de área abaixo da curva (dAUC) antes e depois da presença de L-NAME e área abaixo da curva (AUC) dos grupos após inibição com L-NAME. Dados foram expressos como média \pm EPM, $n=5$ por grupo. * $p<0,05$ vs. CON.

Após o bloqueio com INDO não houve diferença entre os grupos (Figura 17A-B) no relaxamento induzido por ACh.

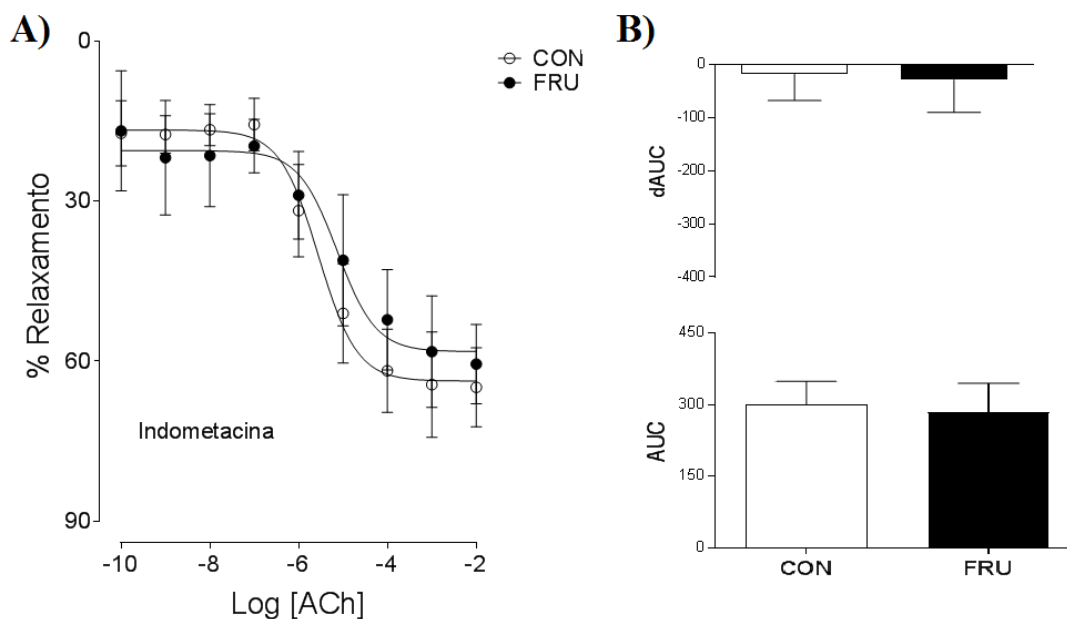


Figura 17: Efeitos do tratamento com frutose na curva dose-resposta de relaxamento induzido por ACh no leito vascular mesentérico dos grupos (○) CON e (●) FRU na presença de indometacina (INDO). (A) Curva de ACh na presença de INDO. (B) Diferença de área abaixo da curva (dAUC) antes e depois da presença de INDO e área abaixo da curva (AUC) dos grupos após inibição com INDO. Dados foram expressos como média \pm EPM, n= 5 por grupo.

4.3.3 Reatividade vascular em resposta ao NPS

As respostas de relaxamento evocadas pelo NPS foram expressas como porcentagem de relaxamento à pré-contração obtida por adição de noradrenalina na solução fisiológica.

A resposta de relaxamento induzida por NPS não foi afetada pelo tratamento com frutose (Figura 18 A-B) assim como a sensibilidade (pD₂ - CON $4,33 \pm 0,21$ vs FRU: $4,66 \pm 0,20$).

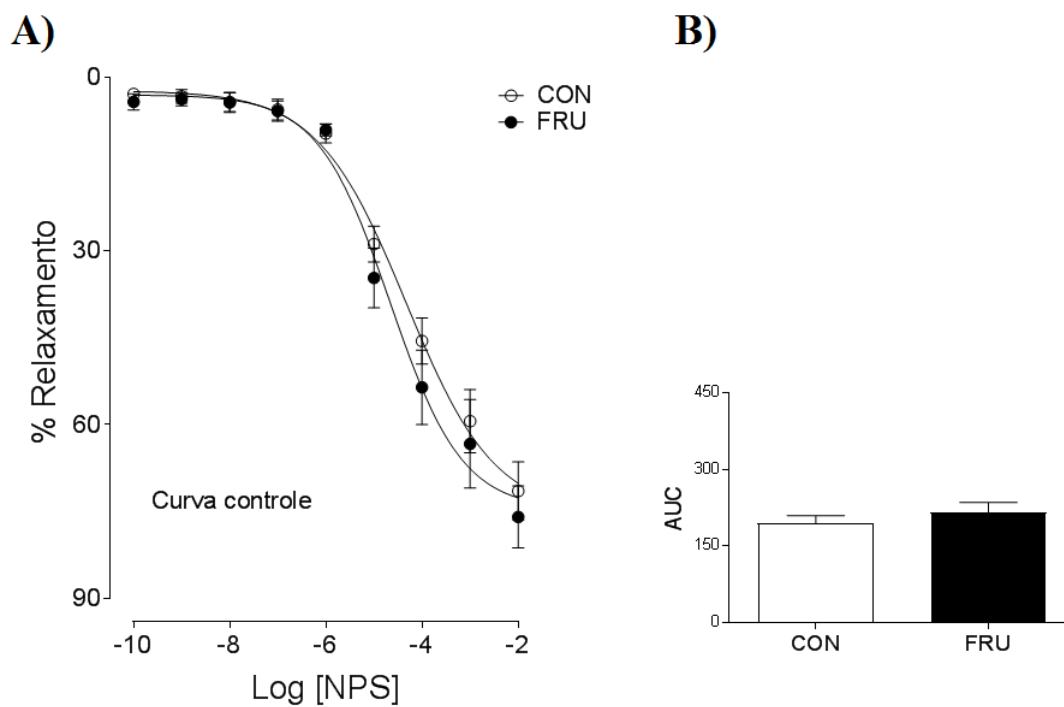


Figura 18: Efeitos do tratamento com frutose na curva dose-resposta de relaxamento induzido por NPS no leito vascular mesentérico dos grupos (○) CON e (●) FRU na ausência de inibidores. (A) Curva controle de NPS. (B) Área abaixo da curva (AUC) da curva controle de NPS. Dados foram expressos como média \pm EPM, n= 10 por grupo.

4.4 ANÁLISE POR WESTERN BLOT DE eNOS, iNOS, COX-2 E Nox2

O tratamento com sobrecarga de frutose por seis semanas promoveu aumento da expressão da isoforma da NOS induzida, iNOS, ao passo que a eNOS não foi alterada, (Figura 19 A-B).

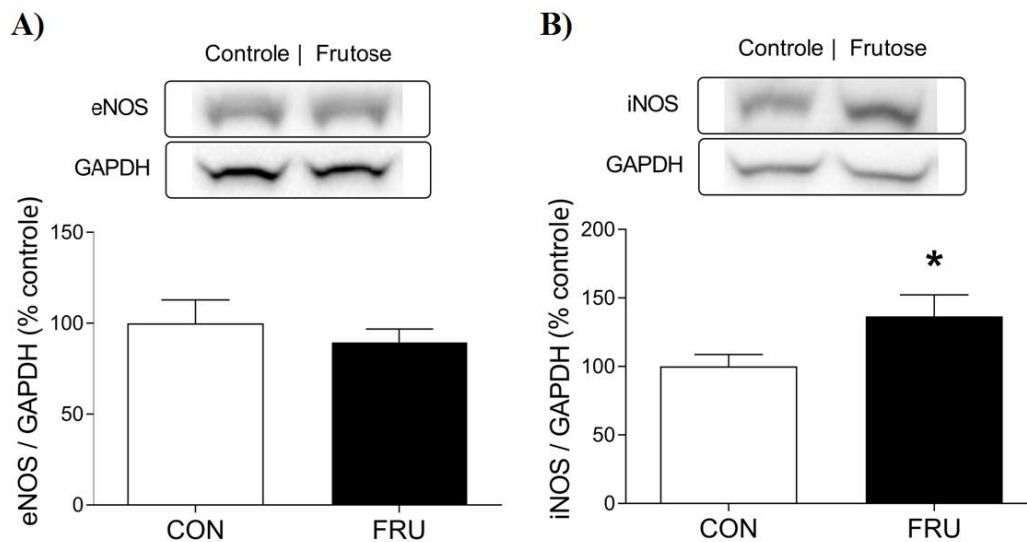


Figura 19: Análise por *Western blot* em ramos vasculares mesentéricos nos grupos CON e FRU. Efeitos do tratamento com frutose na expressão das proteínas (A) eNOS, (B) iNOS. Os dados foram expressos como média \pm EPM, n= 8 por grupo. * $p < 0,05$ vs. CON.

Na avaliação da expressão proteica da Nox2 (gp91phox), a frutose não promoveu alterações, semelhantemente a expressão de COX-2 (Figura 20 A-B)

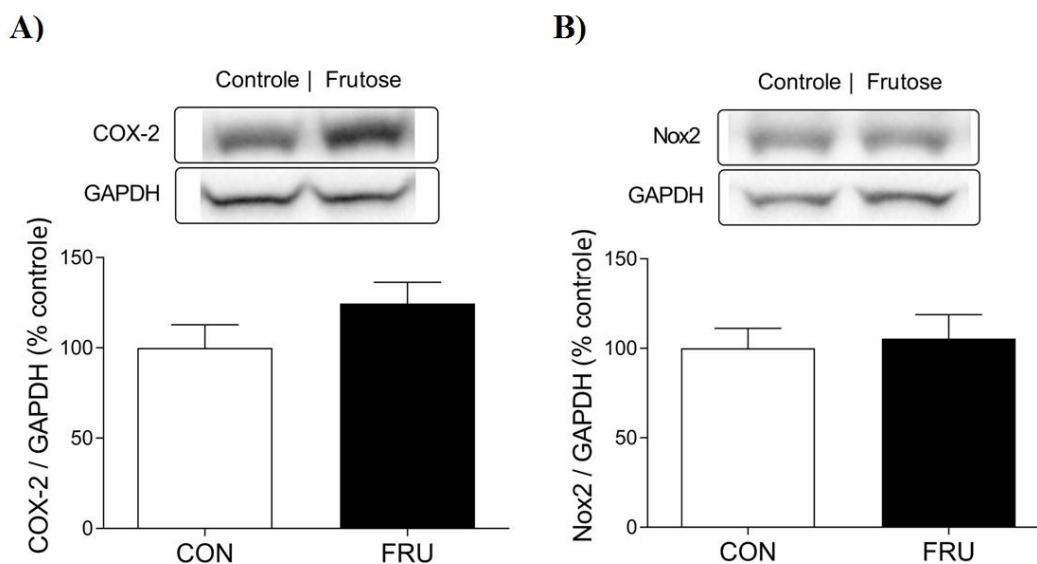


Figura 20: Análise por *Western blot* em ramos vasculares mesentéricos nos grupos CON e FRU. Efeitos do tratamento com frutose na expressão das proteínas (A) COX-2, (B) Nox2. Os dados foram expressos como média \pm EPM, n= 8 por grupo.

4.5 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs) NA ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR

O tratamento crônico com frutose não alterou a produção de EROs na artéria mesentérica superior, a coloração por DHE que evidencia a produção “*in situ*” de ânions superóxido mostrou valores semelhantes entre os grupos (Figura 21).

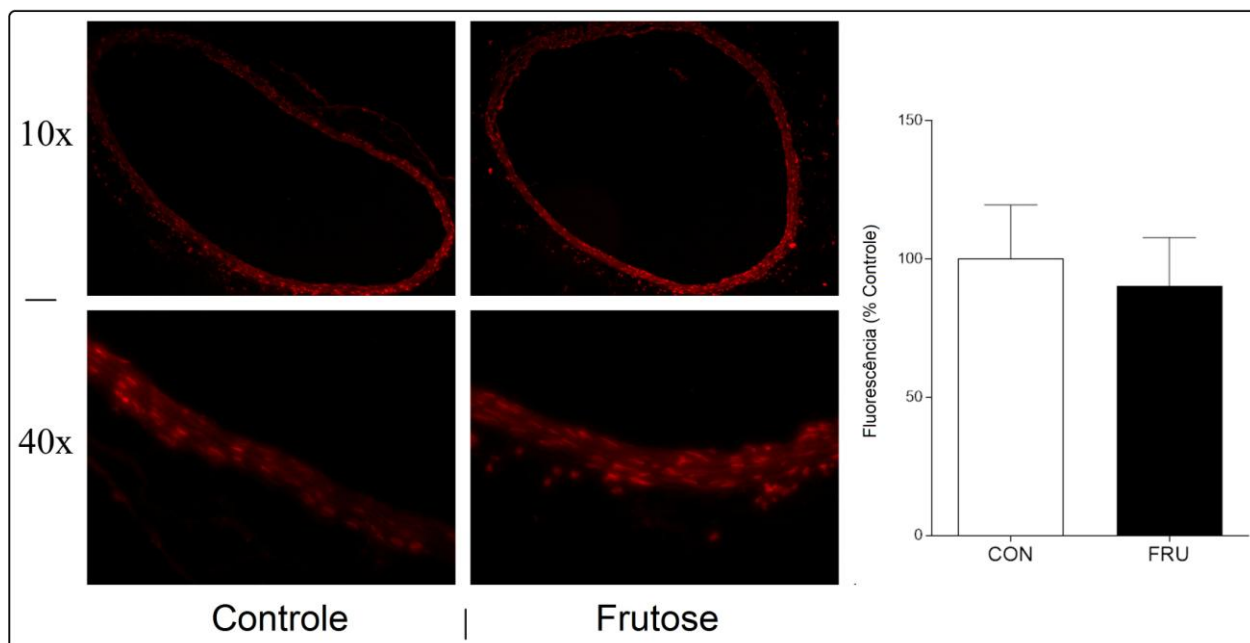


Figura 21. Coloração com DHE para avaliação da produção de EROs na artéria mesentérica superior. Imagens representativas em amplificação de magnitude 10x e 40x. n = 5 por grupo. Os dados foram expressos como média ± EPM.

4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DA ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR

A análise qualitativa por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da ultraestrutura dos vasos não apresenta alterações importantes, no entanto, a observação de uma ligeira desordem na superfície da camada do endotélio é sugestiva de algum desarranjo da camada íntima com mudança da forma e disposição das células endoteliais (Figura 22)

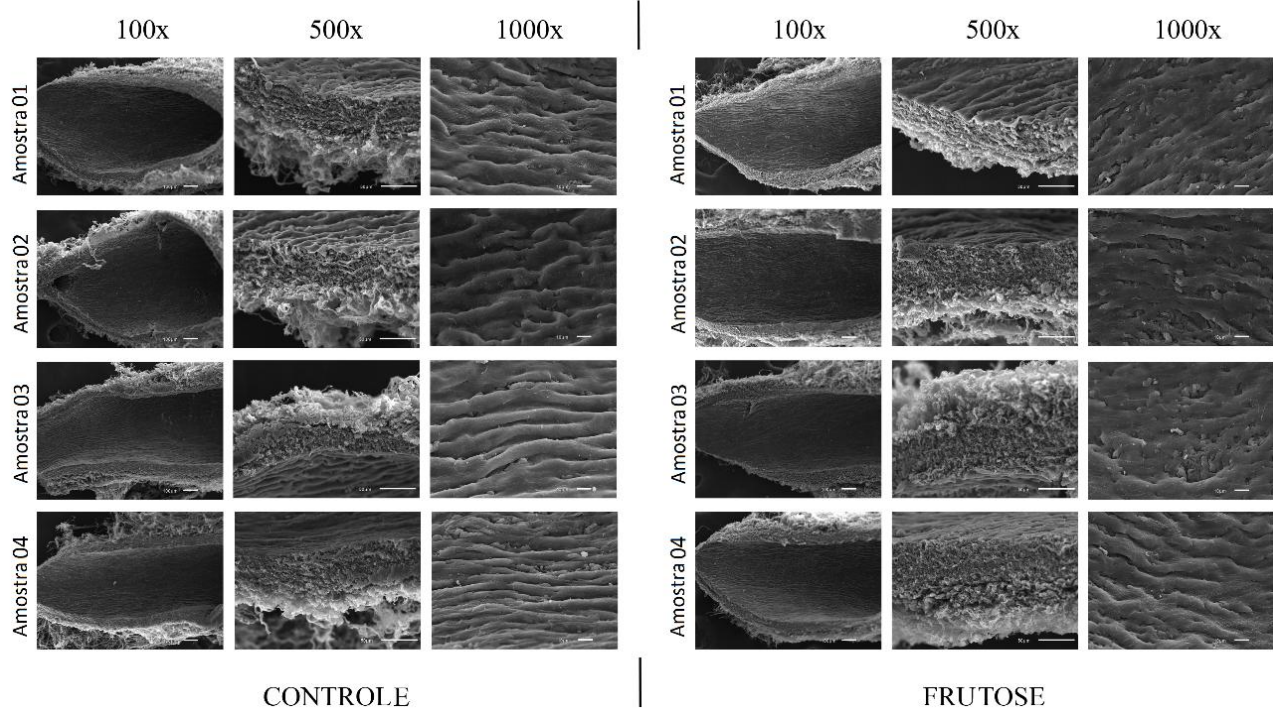


Figura 22: Microscopia eletrônica de varredura da artéria mesentérica superior. Imagens da ultraestrutura dos vasos em três progressivos aumentos. 100x mostrou corte oblíquo, 500x mostrou aproximação na parede do vaso, 1000X mostrou aproximação na superfície da camada de endotélio. Imagens de quatro experimentos independentes de quatro amostras por grupo.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo explorou os efeitos da alta ingestão de frutose durante 6 semanas, para mimetizar os estágios iniciais da síndrome metabólica, sobre a reatividade vascular de vasos mesentéricos. Os resultados evidenciam pela primeira vez no leito vascular mesentérico a influência do tratamento crônico com frutose por 6 semanas sobre o aumento da vasoconstrição induzida por NOR, que foi abolida tanto pela inibição farmacológica da COX por indometacina, bem como pela remoção do endotélio. O relaxamento induzido por ACh foi preservado, mas o bloqueio com L-NAME mostrou que houve um aumento no relaxamento mediado por NO, o qual estava associado a níveis aumentados de iNOS. Além disso, observamos uma ligeira desordem na superfície da camada do endotélio que é sugestiva de alguma perturbação subendotelial.

A ingestão crônica de frutose é conhecida por promover distúrbio cardiovascular e metabólico progressivo, levando à resistência à insulina e MS (Abdulla et al., 2011). No entanto, o curso do tempo preciso desses efeitos ainda não é totalmente esclarecido e parece ser dependente do tempo e da quantidade de ingestão de frutose. Em nosso estudo, a ingestão de frutose 10% na água de beber não aumentou a pressão arterial após 6 semanas de acompanhamento. Dados semelhantes foram relatados por alguns autores (Bezerra et al., 2001, D'angelo et al., 2005, Lirio et al.; 2016;), enquanto outros relataram um ligeiro aumento nos níveis de pressão arterial (Guo et al., 2012, Klein et al., 2015). Esta divergência sobre a alta ingestão de frutose e seus efeitos na pressão arterial pode ser devido ao curto período de exposição à frutose. Na realidade, 6 semanas de alta ingestão de frutose em ratos parece ser o ponto em que a pressão arterial começa a aumentar.

Detectamos aumento da massa hepática e acúmulo de gordura visceral nos animais submetidos à dieta com alto teor de frutose, mesmo sem alterações na massa corporal durante o período de acompanhamento. Estes efeitos foram recentemente relatados pelo nosso grupo e também foi evidenciado aumento nos níveis de triglicerídeos (Lirio et al., 2016). Além disso, os parâmetros glicêmicos também foram alterados, com aumento da glicemia de jejum a partir da terceira semana de tratamento e o estabelecimento da resistência à insulina que foi confirmado pelo teste de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina prejudicada. Estes efeitos metabólicos são amplamente relatados

em outros estudos (Rizkalla et al., 2010; Tappy e Le, 2010; Lirio et al., 2016) e são consistentes com o metabolismo hepático da frutose que pode aumentar a lipogênese hepática e aumentar os níveis de triglicerídeos, dislipidemia, resistência à insulina e síndrome metabólica (Bray, 2007; Stanhope, 2016).

As alterações vasculares induzidas pela alta ingestão de frutose têm sido exploradas em diferentes vasos e tempos de exposição. Estudando anéis aórticos isolados de ratos após 9 semanas de alta ingestão de frutose, Oudot et al. (2009) observaram aumento resposta vasoconstrictora a NOR que foi anulada pela inibição de COX com indometacina. Além disso, também em anéis de aorta, foi relatado que mesmo com um aumento significativo na resposta vasoconstrictora em ratos após 6 semanas de alta ingestão de frutose, esse efeito foi mais claro após 12 semanas de ingestão de frutose (El-Bassossy et al., 2014). Nossos resultados mostraram que 6 semanas de ingestão de frutose aumentaram a resposta do leito vascular mesentérico a NOR, o que foi anulado pela inibição farmacológica da COX e remoção do endotélio, sugerindo disfunção endotelial causada pela desregulação da via prostanoídes. Curiosamente, Almenara et al. (2015) também encontram uma resposta vasoconstrictora aumentada por incubação aguda com frutose. Por outro lado, Navarro-Cid et al. (1995) não detectaram alterações na função vascular mesentérica após 4 semanas de alta ingestão de frutose em ratos. Estas divergências apontam para efeitos da frutose dependendo do tecido estudado e da duração do tratamento. Tomados em conjunto, estes dados sugerem que os efeitos vasculares observados após 6 semanas de consumo elevado de frutose podem representar o ponto de partida entre os efeitos agudos e o estabelecimento da doença vascular crônica.

A liberação de prostanoídes pela aorta e LVM após ingestão de frutose em ratos foi estudada por Peredo et al. (2006) na incubação aguda de frutose e em diferentes períodos de tratamento crônico. Os autores relataram alterações menores após 4 semanas, mas maior desregulação dos prostanoídes após 22 semanas de ingestão de frutose, incluindo aumento de prostaglandinas vasoconstrictoras como $\text{PGF2}\alpha$ e TXA2 (Peredo et al., 2006). Puyó et al. (2012) também mostram que 9 semanas de frutose reduziram a razão de liberação de prostaciclina / tromboxano. Nossos dados mostraram que o aumento da resposta vasoconstrictora a NOR no LVM é parcialmente mediado por prostanoídes derivados de COX mesmo na ausência de alterações detectáveis na proteína COX-2. Corroborando nossos dados, Vasudevan et al. (2010) também observaram que os prostanoídes derivados de COX-2 podem mediar a vasoconstrição

aórtica após 9 semanas de alta ingestão de frutose sem alterações nos níveis de proteína COX-2. No entanto, outros autores relataram aumento da expressão da proteína (Jiang et al., 2007) e gene (Song et al., 2004) em aorta e vasos mesentéricos após 8 semanas de dieta com alto teor de frutose. Embora nossos resultados não tenham mostrado uma diferença significativa na expressão da proteína COX-2 após 6 semanas, acreditamos que seja necessário período de tratamento mais longo para mostrar aumento consistente. Também acreditamos que a disfunção vascular induzida por prostanóides desequilibrados pode ocorrer independentemente de alterações na expressão de COX-2.

A ingestão elevada de frutose tem sido relacionada com prejuízos na resposta de relaxamento à ACh em anéis aórticos isolados. El-Bassossy et al. (2014) mostraram resposta reduzida à ACh em anéis de aorta após 6 semanas de ingestão de frutose em ratos. Além disso, este efeito foi exacerbado após 12 semanas de ingestão de frutose (El-Bassossy et al., 2014). No LVM, contudo, não detectamos alterações no relaxamento induzido por ACh após 6 semanas de seguimento. Mahmoud et al. (2014) também observaram que a incubação de anéis aórticos com frutose aguda não alterou resposta ACh. Além disso, semelhante ao relatado em outros vasos (Mahmoud et al., 2012, Kho, et al., 2014) a resposta vascular ao NPS não foi alterada no LVM. Almenara et al. (2015) também mostraram uma resposta prejudicada à ACh e nenhuma diferença significativa nas respostas ao NPS em anéis de aorta incubados agudamente com frutose, no entanto, Shaligram et al. (2015) observaram respostas prejudicadas à ACh, bradicinina e ao NPS após 8 semanas de frutose 20%. Estudos em outros modelos de resistência à insulina também encontraram alterações semelhantes (Viswanad et al., 2006). Conforme observado, a frutose parece ter efeitos diferentes dependendo do tecido, da dose e do tempo de tratamento.

A resposta vascular a ACh foi reduzida em ambos os grupos após a incubação com L-NAME, mas com maior intensidade no grupo FRU. Estes dados apontam para uma maior participação de NO na resposta induzida por ACh e conseqüentemente um maior relaxamento mediado por NO. Embora não detectamos alterações na proteína eNOS, esse efeito pode estar associado à expressão aumentada de iNOS uma fonte de NO que é induzida em condições inflamatórias. Similar aos nossos resultados, Takagawa et al. (2001) encontraram uma maior contribuição de NO no relaxamento induzido por ACh em ratos após 40 semanas de alimentação com frutose. No entanto, Zemančíková et al. (2014) encontraram um comprometimento da via NO pelo tratamento com frutose.

Pektas et al. (2016) mostraram aumento de iNOS além de outras proteínas pró-inflamatórias em tecido adiposo de ratos após 24 semanas de frutose. Por outro lado, outros estudos mostraram expressão de eNOS vascular reduzida após alta ingestão de frutose (Kho et al., 2014; Stanišić et al., 2016). Além disso, Babacanoglu et al. (2013) não mostraram alterações na expressão do mRNA e proteína da eNOS com uso de HFCS 10% por 12 semanas, mas houve redução da eNOS com uso de HFCS 20%, enquanto que a iNOS foi aumentada em ambas as concentrações de xarope de milho rico em frutose usadas no estudo (Babacanoglu et al., 2013).

Embora diversos autores tenham relatado aumento da produção de ânions superóxido, bem como o aumento da expressão de NOX em artérias de ratos após alta ingestão de frutose (Al-Awwadi et al., 2005; Romanko et al., 2009; Akar et al., 2012), não detectamos diferença na produção de ânion superóxido e nem na expressão de Nox2 no LVM, o que nestas condições exclui uma redução da biodisponibilidade de NO mediada pelas EROs e está em consistência com as respostas observadas por meio do NPS. Nossos dados corroboram um estudo de Lozano et al. que não relataram alterações significativas na coloração por DHE de vasos mesentéricos após 8 meses de alta ingestão de frutose (Lozano et al., 2016).

Alguns estudos mostraram aumento e/ou redução da produção de prostaglandinas vasodilatadoras pela frutose. Richey et al. (1997) testaram os efeitos da frutose aguda e crônica no LVM e encontraram diminuição do relaxamento à ACh, que foi associado a via prostanóides usando o inibidor indometacina. Entretanto, nossos resultados não indicaram diferenças entre os grupos no relaxamento à ACh após o bloqueio farmacológico da COX. Além disso, Peredo et al. (2006, 2013) avaliaram os prostanóides na aorta e no LVM após incubação de frutose e tratamento crônico de ratos em diferentes tempos e encontraram resultados variáveis com pequenas alterações após 4 semanas de frutose e maior desregulação após 22 semanas e na incubação aguda, incluindo diminuição das prostaglandinas vasodilatadoras como PGI₂ e PGE₂ sendo um dos efeitos negativos da alta ingestão de frutose que poderá contribuir para o desenvolvimento da SM.

Além das alterações funcionais observadas no LVM, foi realizada uma análise qualitativa por microscopia eletrônica de varredura da ultraestrutura dos vasos, para avaliar um possível dano endotelial devido à alta ingestão de frutose. As imagens

mostram uma ligeira desordem na superfície da camada do endotélio que é sugestiva de algum desarranjo da camada íntima com mudança da forma e disposição das células endoteliais. As alterações dos componentes da matriz extracelular e a migração celular levam a alterações estruturais na parede do vaso. El-Bassossy et al. (2014) mostraram aumento do colágeno na aorta de ratos após 12 semanas de alta ingestão de frutose. Além disso, Cannizzo et al. (2012) não mostraram diferenças na camada média da aorta e artérias mesentéricas de camundongos do tipo selvagem. Por outro lado, Puyó et al. (2004) encontraram aumento na espessura e área da camada média sem alterações no diâmetro do lúmen. Assim, é possível observar que alterações estruturais podem estar se iniciando no período de tratamento do nosso estudo.

Sumariando nossos resultados, 6 semanas de alta ingestão de frutose leva ao estado de distúrbio metabólico associado à resistência à insulina e aumento de gordura visceral, sem hipertensão, semelhante aos estágios iniciais da SM. A frutose promoveu disfunção vascular leve no LVM com vasoconstrição aumentada associada ao desequilíbrio dos prostanoídeos derivados do endotélio sem indução significativa de COX-2. O relaxamento induzido por ACh foi preservado, entretanto foi observado um pequeno, mas significativo aumento no relaxamento mediado por NO associado a sobreexpressão de iNOS. Não houve alterações detectáveis na expressão das proteínas eNOS, Nox2 e COX-2, apesar da tendência de redução de eNOS e aumento de COX-2 no grupo FRU. Também não foram mostradas alterações na produção dos ânions superóxido nos vasos mesentéricos.

Além disso, imagens ultraestruturais mostram um desarranjo da camada íntima com mudança da forma e disposição das células endoteliais mostrando que as alterações estruturais podem estar se iniciando no período de tratamento do estudo. Parece haver um discreto espessamento da camada média, que será analisado em estudos futuros por meio da medida da espessura das camadas para que seja confirmado este resultado. Acreditamos que alterações mais consistentes possam ser observadas em períodos de tratamento mais longo, o que pretendemos analisar em projetos futuros, assim como outras análises estruturais referentes à medida da espessura das camadas vasculares e a quantificação de colágeno que irão complementar nossos estudos.

6 CONCLUSÕES

Nosso estudo fornece uma contribuição importante para melhor compreender os distúrbios metabólicos que ocorrem nos estágios iniciais da síndrome metabólica, uma vez que, mesmo com período de tratamento relativamente curto, foi possível observar alterações compatíveis com as fases iniciais da doença. Nosso estudo mostrou efeitos cardiovasculares prejudiciais iniciais após alta ingestão de frutose. Foi mostrado que a alta ingestão de frutose promoveu disfunção vascular leve no leito vascular mesentérico com vasoconstrição aumentada associada ao desequilíbrio na via dos prostanoídeos endoteliais. Acreditamos que o aumento no relaxamento mediado por NO associado à sobreexpressão de iNOS possa ser devido ao processo inflamatório que pode estar relacionado a formação de complexos glicosados que induzem a disfunção endotelial. Nossos estudos colaboraram para melhor esclarecer o tempo decorrido dos eventos relacionados à doença cardiometabólica nas diferentes etapas do seu desenvolvimento. No entanto, observamos que são necessários mais estudos, utilizando uma metodologia correspondente para evitar divergências de resultados, avaliando diferentes períodos de tratamento, a fim de esclarecer completamente esta cascata de eventos. Finalmente, nossos dados estendem perspectivas futuras para entender a progressão da doença e os mecanismos envolvidos e assim possibilitar o desenvolvimento de melhores abordagens clínicas e novas propostas de tratamento nos estágios iniciais da doença.

REFERÊNCIAS

- Abdulla MH, Sattar MA, Johns EJ. The relation between fructose-induced metabolic syndrome and altered renal haemodynamic and excretory function in the rat. *Int J Nephrol*. 2011, 2011:934659.
- Akar F, Uludağ O, Aydın A et al. High-fructose corn syrup causes vascular dysfunction associated with metabolic disturbance in rats: protective effect of resveratrol. *Food Chem Toxicol*. 2012, 50(6):2135-2141.
- Al-Awwadi NA, Araiz C, Bornet A et al. Extracts enriched in different polyphenolic families normalize increased cardiac NADPH oxidase expression while having differential effects on insulin resistance, hypertension, and cardiac hypertrophy in high-fructose-fed rats. *J Agric Food Chem*. 2005, 12;53(1):151-157.
- Almenara CP, Mill JG, Vassallo DV, Baldo MP, Padilha AS. In vitro fructose exposure overactivates NADPH oxidase and causes oxidative stress in the isolated rat aorta. *Toxicology in Vitro*. 2015, 29(8):2030-2037.
- Babacanoglu C, Yildirim N, Sadi G, Pektas MB, Akar F. Resveratrol prevents high-fructose corn syrup-induced vascular insulin resistance and dysfunction in rats. *Food Chem Toxicol*. 2013, 60:160-167.
- Barreiros RC, Bossolan G, Trindade CEP. Fructose in humans: metabolic effects, clinical utilization, and associated inherent errors. *Rev. Nutr*. 2005, 18(3):377-389.
- Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab. (Lond)*. 2005, 21;2(1):5.
- Baum, M. Insulin stimulates volume absorption in the rabbit proximal convoluted tubule. *J Clin Invest*. 1987, 79:1104-1109.
- Bezerra RM, Ueno M, Silva MS. A high-fructose diet induces insulin resistance but not blood pressure changes in normotensive rats. *Braz J Med Biol Res*. 2001, 34(9):1155-60.
- Bouchard-thomassim AA, Lachance D, Drolet MC, Couet J, Arsenault M. A high-fructose diet worsens eccentric left ventricular hypertrophy in experimental volume overload. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2011, 300(1):H125-34.
- Bradford MM. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye Binding. *Anal Biochem*. 1976, 7;72:248-254.

Brands MH, Hildebrandt DA, Mizelle HL, Hall JE. Hypertension during chronic hyperinsulinemia in rats is not salt-sensitive. *Hypertension*. 1992, 19:183-189.

Brands MW, Garrity CA, Holman MG, Keen HL. Alonso-Galicia, M.; Hall, J.E. High-fructose diet does not raise 24-hour mean arterial pressure in rats. *Am J Hypertens*. 1994, 7:104-109.

Brands MW, Hildebrandt DA, Mizelle HL, Hall JE. Sustained hyperinsulinemia increases arterial pressure in conscious rats. *Am J Physiol*. 1991, 260:R764-R768.

Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr*. 2004, 79, 537–543.

Bray GA. Fructose: should we worry? *Int J Obes*. 2008, 32:S127–S131.

Bray GA. How bad is fructose? *Am J Clin Nutr*. 2007, 86:895–896.

Butler R, Morris AD, Belch JJ, Hill A, Struthers AD. Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension. *Hypertension*. 2000, 35:746-751.

Caliman IF, Lamas AZ, Dalpiaz PLM et al. Endothelial relaxation mechanisms and oxidative stress are restored by atorvastatin therapy in ovariectomized rats. *PLoS One*. 2013,8(11): e80892.

Camporez JPG, Akamine EH, Davel AP, Franci CR, Rossoni LV, Carvalho RO. Dehydroepiandrosterone protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in ovariectomized rats. *J Physiol*. 2011, 10: 2585–2596.

Cannizzo B, Luján A, Estrella N, Lembo C, Cruzado M, Castro C. Insulin resistance promotes early atherosclerosis via increased proinflammatory proteins and oxidative stress in fructose-fed ApoE-KO mice. *Exp Diabetes Res*. 2012, 2012: 941304.

Carvalho MHC, Nigro D, Lemos VS. Tostes, R.C.A.; Fortes, Z.B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Rev Bras Hipertens*. 2001, 8(1):76-78.

Cheng SM, Cheng YJ, Wu LY et al. Activated apoptotic and anti-survival effects on rat hearts with fructose induced metabolic syndrome. *Cell Biochemistry and Function*. 2014, 32(2), 133–141.

Corpe CP, Burant CF, Hoekstra JH. Intestinal fructose absorption: clinical and molecular aspects. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999, 28: 364–374.

Cortez-Pinto H, Chatham J, Chacko VP, Arnold C, Rashid A, Diehl AM. Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *JAMA*. 1999, 282: 1659–1664.

D'Angelo G, Elmarakby AA, Pollock DM, Stepp DW. Fructose feeding increases insulin resistance but not blood pressure in Sprague-Dawley rats. *Hypertension*. 2005, 46(4):806-811.

De Oliveira SF, Da Luz PL, Ramires JAF. Disfunção vascular no diabete melito. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 1998, 8(5):892-901.

DeAngelis K, Senador DD, Mostarda C, Irigoyen MC, Morris M. Sympathetic overactivity precedes metabolic dysfunction in a fructose model of glucose intolerance in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012, 302:R950-R957.

Doehner W, Schoene N, Rauchhaus M et al. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol on endothelial function and peripheral blood flow in hyperuricemic patients with chronic heart failure: results from 2 placebo-controlled studies. *Circulation*. 2002, 105:2619-2624.

Douard V & Ferraris RP. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008, 295: E227–E237.

Egger G & Dixon J. Beyond obesity and lifestyle: a review of 21st century chronic disease determinants. *Biomed Res Int*. 2014, 2014:731685.

El-Bassossy HM, Dsokey N, Fahmy A. Characterization of vascular complications in experimental model of fructose-induced metabolic syndrome. *Toxicol Mech Methods*. 2014, 24(8):536-543.

Farquharson CA, Butler R, Hill A, Belch JJ, Struthers AD. Allopurinol improves endothelial dysfunction in chronic heart failure. *Circulation*. 2002, 106:221-226.

Féltou M. & Vanhoutte P.M. EDHF: an update. *Clinical Science*. 2009, 117(4):139–155.

Féltou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2006, 291:H985–H1002.

Froesch ER. Fructose metabolism in adipose tissue. *Acta Med Scand Suppl*. 1972, 542:37-46.

Furchgott RT, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980, 288(5789):373-376.

Guo Q, Mori T, Jiang Y et al. Losartan modulates muscular capillary density and reverses thiazide diuretic-exacerbated insulin resistance in fructose-fed rats. *Hypertens Res*. 2012, 35 (1):48-54.

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

Hanover LM, White JS. Manufacturing, composition, and applications of fructose. *Am J Clin Nutr*. 1993, 58(5 Suppl):724S-732S.

Havel PJ. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev*. 2005, 63, 133–157.

Heinig M, Johnson RJ. Role of uric acid in hypertension, renal disease, and metabolic syndrome. *Cleve Clin J Med*. 2006, 73(12):1059-1064.

Huang PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech*. 2009, 2(5-6): 231–237.

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

Inoue S, Aiba T, Masaoka Y et al. Pharmacodynamic characterization of nitric oxide-mediated vasodilatory activity in isolated perfused rat mesenteric artery bed. *Biol Pharm Bull.* 2011, 34(9):1487-1492.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: aquisição alimentar domiciliar *per capita* – Brasil e grandes regiões. 2010, Rio de Janeiro: IBGE.

Jiang J, Tran L, Vasudevan H, Xia Z, Yuen VG, McNeill JH. Endothelin-1 blockade prevents COX2 induction and TXA2 production in the fructose hypertensive rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007, 85(3-4):422-429.

Johnson RJ, Perez-Pozo SE, Sautin YY et al. Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocr Rev.* 2009, 30, 96–116.

Kho MC, Lee YJ, Cha JD, Choi KM, Kang DG, Lee HS. Gastrodia elata ameliorates high-Fructose diet-induced lipid metabolism and endothelial dysfunction. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014, 2014:101624.

Kim HY, Okubo T, Juneja LR, Yokozawa T. The protective role of amla (*Emblca officinalis* Gaertn.) against fructose-induced metabolic syndrome in a rat model. *Br J Nutr.* 2010, 103:502-512.

Klein AV, Kiat H. The mechanisms underlying fructose-induced hypertension: a review. *J Hypertens.* 2015, 33(5):912-920.

Kobayashi R, Nagano M, Nakamura F et al. Role of angiotensin II in high fructose-induced left ventricular hypertrophy in rats. *Hypertension.* 1993, 21:1051-1055.

Kotchen TA, Kotchen JM. Dietary sodium and blood pressure: interactions with other nutrients. *Am J Clin Nutr.* 1997, 65:708S-711S.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970, 227(5259):680-685.

Le KA, Tappy L. Metabolic effects of fructose. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006, 9(4):469-475.

Lee Y, Yu X, Gonzales F et al. PPAR alpha is necessary for the lipopenic action of hyperleptinemia on white adipose and liver tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002, 99:11848-11853.

Lehnen AM, Rodrigues B, Irigoyen MC, De Angelis K, Schaan BD. Cardiovascular changes in animal models of metabolic syndrome. *J Diabetes Res*. 2013, 2013:761314.

Lírio LM, Forechi L, Zanardo TC et al. Chronic fructose intake accelerates non-alcoholic fatty liver disease in the presence of essential hypertension. *J Diabetes Complications*. 2016, 30(1):85-92.

Lozano I, Van der Werf R, Bietiger W et al. High-fructose and high-fat diet induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. *Nutr Metab (Lond)*. 2016, 25:13:15.

Madero M, Perez-Pozo SE, Jalal D, Johnson RJ, Sánchez-Lozada LG. Dietary fructose and hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2011, 13(1):29-35.

Mahmoud MF, El Bassossy HM. Curcumin attenuates fructose-induced vascular dysfunction of isolated rat thoracic aorta rings. *Pharm Biol*. 2014, 52(8):972-977.

Mahmoud MF, El-Nagar M, El-Bassossy HM. Anti-inflammatory effect of atorvastatin on vascular reactivity and insulin resistance in fructose fed rats. *Arch Pharm Res*. 2012, 35(1):155-162.

Malik VS, Pan A, Willett WC, Hu FB. Sugar-sweetened beverages and weight gain in children and adults: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 2013, 98(4):1084–1102.

Marriott BP, Cole N, Lee E. National estimates of dietary fructose intake increased from 1977 to 2004 in the United States. *J Nutr*. 2009, 139(6): 1228S–1235S.

Mayes PA. Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr*. 1993, 58:754S-765S.

McGregor DD. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor response in the perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J. Physiol*. 1965, 177:21-30.

Melo LG, Gnechi M, Pachori AS et al. Endothelium-targeted gene and cell-based therapies for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004, 24(10):1761-1774.

Miller A, Adeli K. Dietary fructose and the metabolic syndrome. *Curr Opin Gastroenterol.* 2008, 24(2):204-209.

Mombouli J, Vanhoute PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol.* 1999, 31:61-74.

Monteiro CA, Mondini I, Costa RBL. Mudanças na composição e adequação nutricional da dieta familiar nas áreas metropolitanas do Brasil (1988-1996). *Rev Saúde Pública.* 2000, 34: 251-258.

Nakagawa T, Hu H, Zharikov S et al. A causal role for uric acid in fructose induced metabolic syndrome. *Am J Physiol.* 2006, 290:F625-F631.

Nakagawa T, Tuttle KR, Short RA, Johnson RJ. Hypothesis: fructose-induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2005, 1(2):80-86.

Navarro-Cid J, Maeso R, Perez-Vizcaino F et al. Effects of losartan on blood pressure, metabolic alterations, and vascular reactivity in the fructose-induced hypertensive rat. *Hypertension.* 1995, 26(6 Pt 2):1074-1078.

Nishimoto Y, Tomida T, Matsui H, Ito T, Okumura K. Decrease in renal medullary endothelial nitric oxide synthase of fructose-fed, salt-sensitive hypertensive rats. *Hypertension.* 2002, 40:190-194.

Oliveira PWC, Sousa GJ, Caliman IF et al. Metformin ameliorates ovariectomy-induced vascular dysfunction in non-diabetic Wistar rats. *Clinical Science.* 2014, 127(4):265-275.

Oudot A, Behr-Roussel D, Compagnie S et al. Endothelial dysfunction in insulin-resistant rats is associated with oxidative stress and COX pathway dysregulation. *Physiol Res.* 2009, 58(4):499-509.

Park YK & Yetley EA. Intakes and food sources of fructose in the United States. *Am J Clin Nutr.* 1993, 58(5 Suppl):737S-747S.

Pektas MB, Koca HB, Sadi G, Akar F. Dietary fructose activates insulin signaling and inflammation in adipose tissue: modulatory role of resveratrol. *Biomed Res Int.* 2016, 2016:8014252.

Peredo HA, Andrade V, Donoso AS, Lee HJ, Puyó AM. Sodium molybdate prevents hypertension and vascular prostanoid imbalance in fructose-overloaded rats. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2013, 33(3-4):43-48.

Peredo HA, Mayer MA, Rodríguez Fermepín M, Grinspon D, Puyó AM. Oral treatment and in vitro incubation with fructose modify vascular prostanoid production in the rat. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2006, 26(1):15-20.

Pontis HG & Fischer CL. Synthesis of D-fructopyranose 2-phosphate and D-fructofuranose 2-phosphate. *Biochem J.* 1963, 89:452-459.

Puyó AM, Borroni JS, Boudou S et al. Metformin reduces vascular production of vasoconstrictor prostanoids in fructose overloaded rats. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2012, 32(1 Pt 2):9-14.

Puyó AM, Mayer MA, Cavallero S, Donoso AS, Peredo HÁ. Fructose overload modifies vascular morphology and prostaglandin production in rats. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2004, 24(2):29-35.

Richey JM, Si X, Halter JB, Webb RC. Fructose perfusion in rat mesenteric arteries impairs endothelium-dependent vasodilation. *Life Sci.* 1997, 62(4):PL55-62.

Rizkalla SW. Health implications of fructose consumption: A review of recent data. *Nutr Metab (Lond).* 2010, 4:7:82.

Romanko OP, Ali MI, Mintz JD, Stepp DW. Insulin resistance impairs endothelial function but not adrenergic reactivity or vascular structure in fructose-fed rats. *Microcirculation.* 2009, 16(5):414-423.

Rutledge AC & Adeli K. Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms. *Nutr Rev.* 2007, 65:S13-23.

Sánchez-Lozada LG, Tapia E, Jiménez A et al. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007, 292(1):F423-F429.

Santuré M, Pitre M, Marette A et al. Induction of insulin resistance by high-sucrose feeding does not raise mean arterial blood pressure but impairs haemodynamic responses to insulin in rats. *Br J Pharmacol*. 2002, 137:185-196.

Shaligram S, Sangüesa G, Akther F, Alegret M, Laguna J, Rahimian R. Comparison of high fructose and glucose consumption on the impairment of mesenteric arterial function in female rats. *FASEB J*. 2015, 29: 782-787.

Shapiro A, Mu W, Roncal C, Cheng KY, Johnson RJ, Scarpace PJ. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008, 295:R1370-1375.

Song D, Arikawa E, Galipeau D, Battell M, McNeill JH. Androgens are necessary for the development of fructose-induced hypertension. *Hypertension*. 2004, 43(3):667-672.

Stanhope KL & Havel PJ. Fructose consumption: considerations for future research on its effects on adipose distribution, lipid metabolism, and insulin sensitivity in humans. *J Nutr*. 2009, 139,1236S–1241S.

Stanhope KL. Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2016, 53(1):52-67.

Stanišić J, Korićanac G, Čulafić T et al. Low intensity exercise prevents disturbances in rat cardiac insulin signaling and endothelial nitric oxide synthase induced by high fructose diet. *Mol Cell Endocrinol*. 2016, 15;420:97-104.

Takagawa Y, Berger ME, Hori MT, Tuck ML, Golub MS. Long term fructose feeding impairs vascular relaxation in rat mesenteric arteries. *Am J Hypertens*. 2001, 14(8 Pt 1):811-817.

Takagawa Y, Berger ME, Tuck ML, Golub MS. Impaired endothelial alpha-2 adrenergic receptor-mediated vascular relaxation in the fructose-fed rat. *Hypertens Res*. 2002, 25:197-202.

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

Tran LT, MacLeod KM, McNeill JH. Selective alpha(1)-adrenoceptor blockade prevents fructose-induced hypertension. *Mol Cell Biochem.* 2014, 392(1-2), 205–211.

Tran LT, Yuen VG, McNeill JH. The fructose-fed rat: A review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem.* 2009, 332(1-2), 145–159.

Van Schaftingen E. The discovery and role of fructose-2,6-bisphosphate. *Acta Gastroenterol Belg.* 1988, 51:141-146.

Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EH. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol (Oxf).* 2017, 219(1):22-96.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Da Silva MAM, Gomes ACM. Hipótese oxidativa da hipertensão arterial: uma minirrevisão. *Rev Bras Hipertens.* 2007, 14(4):269-274.

Vasdev S, Gill V, Parai S, Gadag V. Fructose induced hypertension in Wistar-Kyoto rats: interaction with moderately high dietary salt. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007, 85:413-421.

Vasdev S, Gill V, Parai S, Longerich L, Gadag V. Dietary vitamin E and C supplementation prevents fructose induced hypertension in rats. *Mol Cell Biochem.* 2002, 241:107-114.

Vasudevan H, Lau S, Jiang J, McNeill JH. Effects of insulin resistance and testosterone on the participation of cyclooxygenase isoforms in vascular reactivity. *J Exp Pharmacol.* 2010, 2:169-179.

Viswanad B, Srinivasan K, Kaul CL, Ramarao P. Effect of tempol on altered angiotensin II and acetylcholine-mediated vascular responses in thoracic aorta isolated from rats with insulin resistance. *Pharmacol Res.* 2006, 53(3):209-215.

Walker RW, Dumke KA, Goran MI. Fructose content in popular beverages made with and without high-fructose corn syrup. *Nutrition.* 2014, 30(7-8), 928–935.

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

White JS. Misconceptions about high-fructose corn syrup: is it uniquely responsible for obesity, reactive dicarbonyl compounds, and advanced glycation endproducts? *J Nutr.* 2009, 139(6):1219S–1227S.

Yousif MH. Phosphoinositide 3-kinase contributes to diabetes-induced abnormal vascular reactivity in rat perfused mesenteric bed. *Cell Biochem Funct.* 2008, 26(4):451-8.

Zemančíková A, Török J. Cardiovascular effects of high-fructose intake in rats with nitric oxide deficiency. *Interdiscip Toxicol.* 2014, 7(3): 159–164.