

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

Gilson Brás Broseghini Filho

**EFEITOS DE 4 DIAS DE SOBRECARGA DE FRUTOSE SOBRE A
REATIVIDADE VASCULAR DE RATOS MACHOS E FÊMEAS**

Vitória, junho de 2019

**EFEITOS DE 4 DIAS DE SOBRECARGA DE FRUTOSE SOBRE A REATIVIDADE
VASCULAR DE RATOS MACHOS E FÊMEAS**

Gilson Brás Broseghini Filho

**Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do
Espírito Santo como requisito para a obtenção do grau
de Doutor em Ciências Fisiológicas.**

Prof^a. Dr^a. Alessandra Simão Padilha – orientadora
Universidade Federal do Espírito Santo

Dr^a. Camila Almenara Cruz Pereira – coorientadora
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a. Dr^a. Érica Aguiar Moraes – membro externo
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Marcelo Perim Baldo – membro externo
Universidade Estadual de Montes Claros

Prof^a. Dr^a. Suely Gomes de Figueiredo – membro interno
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Leonardo dos Santos – membro interno
Universidade Federal do Espírito Santo

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, 2019

Ficha catalográfica

A quem fica bem de amarelo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelos dons que nem sempre fiz por merecer, mas, mesmo assim, a mim foram concedidos.

À CAPES, FAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Ao “team” Padilha e apêndice. Marito, Dieli, Thiago, Kevin e Alessandra, mais que colegas nessa jornada, vocês são meus amigos. Renata, você vai além.

Aos professores do Departamento de Ciências Fisiológicas, por compartilharem os seus conhecimentos e por se dedicarem à formação de seus alunos. Foi uma honra aprender com tantos “ases”. Que em tempos tortuosos como os atuais, mantenham-se ainda mais retos na nossa formação.

Ao Léo, pelas sugestões e observações científicas dadas sempre de bom grado e em todos os momentos que lhe procurei. Obrigado por sempre me fazer pensar.

Aos tios Marcos e Penha, por todas as conversas inspiradoras, apesar de toda a minha ausência.

Aos meus pais, Luzia e Gilson, e ao meu irmão Jeffinho. Obrigado por todo o apoio, paciência, compreensão, carinho, admiração e confiança que possibilitaram que eu sempre prosseguisse.

“To Doctor Brant, because when he opened to me his laboratory door, he also opened my mind.”

À Alê, pelo voto de confiança ao me aceitar como aluno desde a iniciação científica. Obrigado por dividir comigo seu conhecimento inestimável. Obrigado por me mostrar o caminho, mas sempre permitir que eu o percorresse com os meus próprios pés. Obrigado por deixar que eu cometesse meus próprios erros, e, obrigado por estar sempre atenta e disposta a me ajudar a corrigi-los. E, é claro, por toda paciência!

Ao Marcelo, por compartilhar e a mim confiar a ideia que nos trouxe até aqui, por sempre nutri-la e por me inspirar, sobretudo, pelo exemplo. Obrigado também pela relativização do tempo!

À Camila, pela paciência, dedicação e incentivo. Agradeço por cada crítica. Agradeço por sua mente presente desde a concepção desse projeto e, ainda, por suas mãos, que permitiram que essa tese transcendesse a ideia.

E a Laís, por me inspirar a ser a melhor versão de mim.

*"..Eu quero ver o que eu não vi
Porque eu sei que há mais.."*

Take the world by storm, L. Graham

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE SIGLAS DE ABREVIACÕES	14
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1. Introdução	18
1.1. Frutose	18
1.2. Metabolismo e desordens metabólicas promovidas pela frutose.....	19
1.3. Frutose e a função vascular	22
1.4. Ações cardiovasculares da frutose em machos e fêmeas.....	26
1.5. Problemática.....	28
2. Objetivo	29
2.1. 29	
2.1. Objetivo geral.....	29
2.2. Objetivos específicos	29
3. Material e métodos	30
3.1. 30	
3.1. Modelo experimental.....	30
3.2. Glicemia em jejum, teste de tolerância à glicose e teste de sensibilidade à insulina	30
3.3. Medida dos parâmetros bioquímicos séricos	31
3.4. Avaliação da reatividade vascular de anéis de aorta à fenilefrina	31
3.4.1.Obtenção Dos Anéis Isolados De Aorta Torácica	31

3.4.2. Avaliação da integridade funcional dos segmentos de aorta torácica	33
3.4.3. Protocolos Experimentais de reatividade vascular	34
3.4.3.1. A vasoconstrição induzida pela fenilefrina	34
3.4.3.2. A modulação do tecido adiposo perivascular na resposta vasoconstritora à fenilefrina	34
3.4.3.3. A modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina	34
3.4.3.4. A participação dos fatores endoteliais nas alterações vasculares mediadas pela exposição à frutose	35
3.5. Expressão dos resultados e análise estatística	36
3.6. Fármacos e reagentes utilizados	36
4. Resultados	38
4.1. 38	
4.1. Parâmetros bioquímicos séricos	38
4.2. Tolerância à glicose, sensibilidade à insulina e glicemia de jejum	39
4.3. Reatividade vascular	40
4.3.1. Reatividade vascular em machos	41
4.3.2. Reatividade vascular em fêmeas	46
5. Discussão	48
5.1. 49	
5.1. Suplementação com frutose promove aumento precoce da trigliceridemia em machos, mas não em fêmeas	49
5.2. Suplementação com frutose altera diferentemente a função vascular em machos e em fêmeas	53
5.2.1. A vasomodulação endotelial em fêmeas é aumentada pela suplementação com frutose.	54

5.2.2.A suplementação com frutose muda o perfil contrátil do TAP em machos
57

5.3. Relação entre as alterações bioquímicas e vasculares resultantes de 4 dias de
suplementação de frutose.....58

6. Conclusão 60

7. referências 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos séricos de ratos controles e ratos suplementados com frutose durante 4 dias.	39
Tabela 2. Valores de resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (pD2) correspondentes às curvas concentração-resposta à fenilefrina.	41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Glicólise, frutólise e síntese hepática de triglicerídeos. Na figura, a glicose passa pela glicólise para gerar piruvato que é subsequentemente utilizado para uma série de processos que incluem o catabolismo oxidativo, cetogênese e lipogênese sob catálise da ácido graxo sintase (FAS). A via frutolítica alimenta a via glicolítica a nível das trioses: fosfato de di-hidroxiacetona e gliceraldeído 3-fosfato. Ela permite que a produção de acetil-CoA continue sem regulação pela insulina e, portanto, promove a lipogênese e a subsequente síntese de triglicérides (TG) a partir do produto acil-coenzima A (CoA). Isso envolve a acilação progressiva de um esqueleto de glicerol-fosfato pela glicerol-fosfato aciltransferase (GPAT) e pela acilglicerol-fosfato acil transferase (AGPAT). A desfosforilação do esqueleto de glicerol ocorre sob a catálise da fosforilase do ácido fosfático (PAP), seguida por uma acilação adicional do diacilglicerol pela diacilglicerol acil transferase (DGAT). Os TGs produzidos são empacotados em lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDLs) para exportação do fígado, ou são armazenadas dentro de hepatócitos. DH: desidrogenase; NAD: dinucleótido de nicotina adenina; NADH: forma reduzida de NAD; PDH: piruvato desidrogenase; TPI: triose fosfato isomerase. Adaptação a partir de TRAN; YUEN; MCNEILL, 2009. 21
- Figura 2. Formação de ácido úrico em consequência da frutólise. A frutose é rapidamente fosforilada no hepatócito pela frutoquinase (KHK) para frutose-1-fosfato (F-1-P), que usa a adenosina trifosfato (ATP) como doador de fosfato (do seu uso, obtemos adenosina difosfato e, consequentemente, adenosina monofosfato (AMP)). Os níveis de fosfato intracelular (PO₄) diminuem, estimulando a atividade da AMP deaminase 2 (AMPD2). A AMPD2 converte o AMP em monofosfato de inosina (IMP). O IMP é metabolizado em inosina pela 5' nucleotidase (5'NT), que é ainda degradado em xantina e hipoxantina pela xantina oxidase (XO), finalmente gerando ácido úrico. Adaptação a partir de (JOHNSON et al., 2013). 24
- Figura 3. Sinalização da insulina via seu receptor transmembranar e sua relação com a produção de óxido nítrico. A insulina liga-se ao receptor de insulina da membrana celular, levando à ativação de duas vias de sinalização, principalmente: Ras-MAPK, que resulta na proliferação celular; e PI3K – Akt – eNOS, que resulta em modulação metabólica e proteção cardiovascular. Entre as cascatas de sinalização ativadas por insulina, a PI3K-Akt – eNOS – NO representa uma ligação especial entre a insulina e o sistema cardiovascular no que diz respeito à saúde e patologia. A ativação dessa cascata de sinalização promove efeitos protetores cardiovasculares, incluindo vasodilatação, efeitos anti-inflamatórios e anti-oxidativos. Akt: proteína cinase B; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; ET-1: endotelina-1; GLUT4: transportador de glicose 4; GSK: glicogênio sintase quinase; IRS: substrato do receptor de insulina; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; PI3K: fosfatidilinositol 3'-quinase; PMN: neutrófilo polimorfonuclear; ROS: espécies reativas de oxigênio. Adaptação a partir de YU; GAO; MA, 2011. 25
- Figura 4. Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo (esquerda); após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm (direita) (ANGELI, 2013). 32

- Figura 5. Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “in vitro”. Sistema de aquisição de dados Biopac Systems (ANGELI, 2013)..... 32
- Figura 6. Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: (A) Período de estabilização inicial (30 min permanecendo na tensão de 0,9 a 1,3 g); (B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; (C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; (D) Período de estabilização (30 min); (E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; (F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); (G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; (H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: (I) Pré-contração com fenilefrina (Fe) 10-6M; (J) Platô da contração induzida pela Fe; (L) Adição de acetilcolina (ACh) 10-5M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical. (modificado de Dias, 2007). 34
- Figura 7. Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE (10-10 a 1x10-4M) (Angeli, 2009)..... 35
- Figura 8. Parâmetros bioquímicos séricos de ratos controles e ratos suplementados com frutose durante 4 dias. * $p < 0,05$ vs controle. N=4—5. Teste t-Student. 38
- Figura 9. Curso temporal (A e C) dos níveis sanguíneos de glicose de ratos controles e ratos slupementados com frutose durante 4 dias após a injeção de glicose (2mg/kg, ip). (B e D) Curso temporal dos níveis sanguíneos de glicose de ratos controles e ratos tratados com frutose durante 4 dias após a injeção de insulina (1U/kg, ip). N=4—5. * $p < 0,05$ vs CT.... 40
- Figura 10. Curvas concentração-resposta à fenilefrina (A) correspondente às fêmeas e (B) aos machos. * corresponde ao teste t-Student entre Rmax para os quais $p < 0,05$ vs o CT correspondente. N = 13—15. CT: controle; FR: ratos suplementados com frutose; PE: fenilefrina. N = 13—15..... 41
- Figura 11. Curvas concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta de machos suplementados com frutose e seus respectivos controles (A) em condições basais, após (B) a remoção do endotélio vascular, (C) incubação com L-NAME, (D) incubação com apocinina, (E) incubação com DETCA e (F) incubação com catalase. * indica o teste t-Student entre Rmax para os quais $p < 0,05$ vs o CT correspondente. # indica o teste t-Student entre pD2 para os quais $p < 0,05$ vs o CT correspondente. N = 6—9. 43
- Figura 12. Curvas concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta com e sem tecido adiposo perivascular (TAP) de fêmeas suplementados com frutose (B) e seus respectivos controles (A); e de machos suplementados com frutose (E) e seus respectivos controles (D). Porcentagem da diferença das áreas abaixo das curvas (%dAUC) correspondentes (C) às fêmeas e (F) aos machos. * indica ou o teste t-Student entre Rmax para os quais $p < 0,05$ vs o CT correspondente, ou indica o teste t-Student entre as %dAUC para as quais $p < 0,05$. # indica o teste t-Student entre pD2 para os quais $p < 0,05$ vs o CT correspondente. N = 6—9. 45

Figura 13. Curvas concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta de fêmeas suplementadas com frutose e seus respectivos controles (A) em condições basais, após (B) a remoção do endotélio vascular, (C) incubação com L-NAME, (D) incubação com apocinina, (E) incubação com DETCA e (F) incubação com catalase, além da porcentagem da diferença das áreas abaixo das curvas (%dAUC) correspondentes às curvas adjacentes. * indica ou o teste t-Student entre Rmax para os quais $p < 0,05$ vs o CT correspondente, ou indica o teste t-Student entre as %dAUC para as quais $p < 0,05$. # indica o teste t-Student entre pD2 para os quais $p < 0,05$ vs o CT correspondente. N = 6—9. ... 47

Figura 14. Representação esquemática das vias de sinalização da insulina e seus desfechos sobre o metabolismo energético e estrutural. Akt/PKB: proteína cinase B; ATP: trifosfato de adenosina; IRS: substrato do receptor de insulina; ADP: adenosina difosfato; MAP quinase: proteína cinase activada por mitógeno; PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase; PIPD1 & 2: proteas quinases dependentes de fosfatidilinositol 1 e 2 políptido insulínico dependente de glucose; PKC: proteína cinase C; RAS: proteína de sarcoma de rato; GLUT 4: proteína de transporte de glicose 4; SHC: proteína adaptadora com homologia de src. Adaptação a partir de WILCOX, 2005. 51

Figura 15. Relação entre óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, na qual um influencia a biodisponibilidade do outro. O óxido nítrico (NO) é produzido a partir da L-arginina pela ação do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) na presença de cofatores, principalmente a tetrahydrobiopterina (H4B). O •NO difunde-se para as células musculares lisas vasculares e ativa a guanilato ciclase, promovendo a vasodilatação mediada pelo GMP cíclico. O NO é também um radical livre e, quando produzido juntamente com o O₂⁻, reage extremamente rápido para formar uma espécie pró-inflamatória altamente reativa e importante mediador da peroxidação de lipídios: o peroxinitrito (ONOO⁻). Adaptação a partir de RABÊLO et al., 2010. 56

LISTA DE SIGLAS DE ABREVIÇÕES

- %dAUC: % da diferença das áreas abaixo das curvas;
- 5'NT: 5' nucleotidase;
- ACh: acetilcolina;
- ADP: adenosina bifosfato;
- AGPAT: acilglicerol-fosfato acil transferase;
- Akt: proteína cinase B;
- AMP: adenosina monofosfato;
- AMPD2: AMP deaminase 2;
- ATP: adenosina trifosfato;
- AUC: área abaixo da curva;
- CAPES: Coordenadoria de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior ;
- CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico;
- CoA: acil-coenzima A;
- DAG: diacilglicerol;
- DGAT: diacilglicerol acil transferase;
- DH: desidrogenase;
- E-: endotélio removido mecanicamente;
- eNOS: isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico.
- eNOS: óxido nítrico sintase endotelial;
- EPM: erro padrão da média;
- EROs/ROS: espécies reativas de oxigênio;
- ET-1: endotelina-1;
- F-1-P: frutose-1-fosfato;
- FAD: flavina adenina dinucleotídeo;
- FAS: ácido graxo sintase;
- GLUT-2: transportador de glicose 2;
- GLUT4: transportador de glicose 4;
- GLUT-5: transportador de glicose 4;
- GMP: monofosfato cíclico de guanosina;
- GMPC: 3,5 – monofosfato cíclico de guanosina
- GPAT: glicerol-fosfato aciltransferase;
- GSK: glicogênio sintase quinase;
- H₂O₂: peróxido de hidrogênio;
- H4B: tetrahidrobiopterina;
- IMP: monofosfato de inosina;
- IP₃:1,4,5 – inositol trifosfato;
- IRS: substrato do receptor de insulina;
- KCl: cloreto de potássio;
- KHK: frutoquinase;
- L-NAME: inibidor não-seletivo da NOS, o N^G-nitro-L-arginina metil;
- MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno;
- NAD: dinucleótido de nicotina adenina;
- NADH: forma reduzida de NAD;

- NADPH: adenina dinucleotídeo fosfato;
- NO: óxido nítrico (NO);
- O²⁻: ânion superóxido;
- ONOO⁻: peroxinitrito;
- PAP: ácido fosfático;
- pD₂: sensibilidade da curva concentração-resposta ao agonista;
- PDH: piruvato desidrogenase;
- PI3K: fosfatidilinositol 3'-quinase;
- PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase;
- PIPD1 & 2: proteas quinases dependentes de fosfatidilinositol 1 e 2 políptido insulínico dependente de glucose;
- PKC: proteína cinase C;
- PMN: neutrófilo polimorfonuclear;
- PO₄: fosfato;
- R_{máx}: resposta máxima da curva concentração-resposta ao agonista;
- SHC: proteína adaptadora com homologia de src;
- SOD: Superóxido dismutase;
- TAP: tecido adiposo perivascular;
- TG: triglicérides;
- TPI: triose fosfato isomerase;
- VLDL: lipoproteínas de muito baixa densidade;
- XO: xantina oxidase.

RESUMO

Com o aumento do consumo de frutose nas últimas décadas, cresceu a preocupação sobre os efeitos desse açúcar no organismo. Já é sabido que o consumo crônico de frutose induz distúrbios metabólicos como a hiperglicemia e dislipidemias, e esses são fortemente correlacionados a alterações na função vascular. Pelo seu potencial lipogênico, a dieta rica em frutose foi adotada pela comunidade científica como modelo de disfunção metabólica para investigação da influência de parâmetros como hipertrigliceridemia, hiperglicemia e resistência à insulina sobre o aparecimento de doenças cardiovasculares. Com isso, emergiu a necessidade de determinar se a frutose, *de per se*, teria sua parcela de responsabilidade sobre as alterações vasculares observadas nesse modelo, independentemente do cenário metabólico que ela impõe.

A fim de caminhar em direção à resposta se as alterações vasculares precedem a dislipidemia, hiperglicemia e resistência à insulina induzidas pela frutose, estabelecer o papel do endotélio e do tecido adiposo perivascular na modulação vascular após a suplementação com frutose e, ainda, definir se as possíveis alterações vasculares precoces induzidas dependem do sexo, nós suplementamos ratos, de ambos os sexos, por 4 dias com solução frutose à 10% via água de beber para avaliar a reatividade vascular de aortas sem o cenário de síndrome metabólica consolidado pelo uso prolongado de frutose.

Nossos dados revelaram que o consumo de frutose por 4 dias promove redução da resposta vasoconstritora à fenilefrina em aortas de fêmeas, quando na ausência do tecido adiposo perivascular (r_{max} fêmeas CT = 116 ± 2 Vs FR = $90 \pm 2^*$, %KCl, $*=p < 0,05$ vs CT), ao passo que nessas condições não há diferença entre os machos, suplementados ou não com frutose (r_{max} machos CT = 85 ± 3 Vs FR = 81 ± 3 , %KCl). Mostramos também que os efeitos da frutose são diferentes entre os sexos, recrutando o endotélio para sua ação sobre a aorta de fêmeas e o tecido adiposo perivascular no que diz respeito a redução de reatividade vascular observada nos machos (r_{max} machos+TAP CT = 92 ± 4 Vs FR = $69 \pm 5^*$, %KCl, $*=p < 0,05$ vs CT). Ainda, os machos se mostraram mais suscetíveis do que as fêmeas às alterações metabólicas induzidas pelo consumo de frutose, pois, apesar da glicemia de jejum não ser alterada em ambos os sexos, a resistência à insulina e parâmetros séricos como o VLDL (machos CT = 19 ± 3 vs FR = $37 \pm 7^*$, mg/dL, $*=p < 0,05$ vs CT) e triglicérides (machos CT = 98 ± 16 vs FR = $188 \pm 33^*$, mg/dL, $*=p < 0,05$ vs CT) estavam elevados naquele grupo.

Os dados determinam que o consumo de frutose por 4 dias altera a resposta vasoconstritora à fenilefrina em aortas de maneira diferente entre os sexos, recrutando o endotélio para sua ação sobre a aorta de fêmeas e o TAP no que diz respeito a redução de reatividade vascular observada nos machos. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram a importância dessas variáveis no que se refere às alterações vasculares induzidas pela suplementação com frutose e estimula novos estudos que explorarão as diferenças entre os sexos no que tange as mudanças na função vascular, tendo como foco a modulação endotelial e a participação do tecido adiposo perivascular nas alterações vasculares induzidas pela frutose.

Palavras-chave: Frutose, tecido adiposo perivascular, endotélio, reatividade vascular e metabolismo.

ABSTRACT

Once fructose consumption increased in the last decades, also increased the concerns about its effects upon the organism. It is already known that the chronic consumption of fructose induces metabolic disorder such as hyperglycemia and dyslipidemias, and these factors are strongly correlated with vascular dysfunction. Due to fructose lipogenic potential, the high fructose diet was adopted by the scientific community as a model of metabolic dysfunction which allowed investigate how factors as hypertriglyceridemia and hyperglycemia are correlated to cardiovascular diseases. Thus, there is a need to determine whether fructose *de per si* has its own responsibility upon the vascular changes observed in this model, regardless of the metabolic scenario that it imposes.

In order to verify if the vascular alterations observed during long-term fructose supplementation precede fructose-induced dyslipidemia, hyperglycemia, and insulin resistance; to establish the role of endothelium and perivascular adipose tissue in vascular modulation after fructose supplementation; and to assay whether the early vascular changes are sex dependent, we supplemented rats of both sexes for 4 days with 10% fructose solution via drinking water to assess vascular reactivity of aortas before the scenario of metabolic syndrome consolidated by prolonged use of fructose.

Our data revealed that the consumption of fructose during 4 days promotes a reduction of vasoconstricting response to phenylephrine in aortas from female rats when without perivascular adipose tissue (r_{max} female CT = 116 ± 2 Vs FR = $90 \pm 2^*$, %KCl, $*=p < 0,05$ vs CT), despite do not chance it in aortas from male rats (r_{max} male CT = 85 ± 3 Vs FR = 81 ± 3 , %KCl). We have also shown that the effects of fructose are different between male and female, recruiting the endothelium for fructose action upon the female aorta and the perivascular adipose tissue with regard to the reduction of vascular reactivity observed in males (r_{max} male+PVAT CT = 92 ± 4 Vs FR = $69 \pm 5^*$, %KCl, $*=p < 0,05$ vs CT). Moreover, males were more susceptible than females to the metabolic changes induced by fructose consumption, because although fasting glycemia was not altered in both sexes, insulin resistance and serum parameters such as VLDL VLDL (male CT = 19 ± 3 vs FR = $37 \pm 7^*$, mg/dL, $*=p < 0,05$ vs CT) and triglycerides (machos CT = 98 ± 16 vs FR = $188 \pm 33^*$, mg/dL, $*=p < 0,05$ vs CT) were higher in that group.

The data determine that the consumption of fructose for 4 days alters the vasoconstrictor response to phenylephrine in aortas differently between sexes, recruiting endothelium for its action on female aorta and PVAT with respect to the reduction of vascular reactivity observed in males. The results obtained in the present study demonstrate the importance of these variables in relation to vascular alterations induced by fructose supplementation and stimulate new studies that will explore gender differences regarding vascular function changes, focusing on endothelial modulation and the participation of perivascular adipose tissue in fructose-induced vascular changes.

Key words: Fructose, perivascular adipose tissue, endothelium, vascular reactivity, metabolism.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Frutose

A Frutose é uma cetose e está presente como um monossacarídeo nas frutas, vegetais e no mel, ou como um dissacarídeo, associado a glicose. A dieta humana, até o marco recente da revolução industrial, era composta principalmente por carne, tendo baixa quantidade de frutose (DOUARD; FERRARIS, 2013). Contudo, esse panorama mudou na segunda metade do século 20, quando passamos a consumir mais desse açúcar, uma vez que o xarope de milho com alta concentração de frutose foi introduzido na indústria alimentícia no final da década de 1960 como uma alternativa à sacarose. Nas décadas seguintes houve um aumento expressivo do consumo daquele açúcar, chegando no ano de 1999 a números comparáveis à sacarose (WHITE, 2013).

Seu efeito edulcorante 170 vezes maior que o da sacarose, apesar da mesma composição energética (WHITE, 2013), o baixo custo de produção e a praticidade em se trabalhar com a apresentação na forma de xarope despertaram o interesse da indústria de bebidas industrializadas e a de cereais matinais (HANOVER; WHITE, 1993), que adotaram esse xarope como principal edulcorante (WHITE, 2013). Isso contribuiu para que o consumo de frutose nos Estados Unidos aumentasse em 50% de 1950 a 2009, tendo os jovens com idade entre 15 a 22 anos como maiores consumidores de frutose (DOUARD; FERRARIS, 2013), o que se justifica pela quantidade exorbitante desse açúcar em alimentos industrializados, como em refrigerantes. Uma porção de 500ml de refrigerante, facilmente consumida durante o refeição, pode conter aproximadamente 60g de açúcares e destes, 30g são de frutose (DOUARD; FERRARIS, 2013).

A ascensão do consumo de frutose e a concomitante epidemia de obesidade chamaram a atenção da comunidade científica. Estudos clínicos e experimentais revelaram que a ingestão crônica e excessiva desse açúcar leva à hiperglicemia, resistência insulínica, hipertrigliceridemia e obesidade; todos esses são fatores de risco cardiovasculares e sinais metabólicos da síndrome metabólica (BRAY; NIELSEN; POPKIN, 2004; CHICCO et al., 1994; HWANG et al., 1987).

1.2. Metabolismo e desordens metabólicas promovidas pela frutose

As alterações metabólicas promovidas pela frutose estão diretamente relacionadas ao seu metabolismo. Uma vez ingerida, a frutose é absorvida no intestino delgado por difusão facilitada, especialmente via transportadores GLUT-5 e GLUT-2. O GLUT-5, localizado na membrana apical dos enterócitos, transporta a frutose da luz intestinal para o citoplasma dessas células. Dalí, a frutose atinge a circulação através do GLUT-2 (THORENS; MUECKLER, 2010).

Quando a concentração de frutose na luz intestinal é menor que 1mM, até 60% da frutose pode ser convertida à glicose ainda nos enterócitos (BISMUT; HERS; VAN SCHAFTINGEN, 1993). Esta conversão leva à redução do conteúdo intracelular de frutose, perpetuando um gradiente entre o meio intracelular e o intestinal que é favorável à absorção, permitindo que toda a frutose ingerida seja absorvida (DOUARD; FERRARIS, 2013). À medida que mais frutose é ingerida, o percentual que é metabolizado nos enterócitos diminui e mais frutose é disponibilizada ao fígado via circulação, que passa ser o seu principal sítio de metabolização (SCHAEFER; GLEASON; DANSINGER, 2009).

Ao menos 50% do total de frutose absorvido é metabolizado pelo fígado. Com menor expressão, outros órgãos como intestino, rins e músculos também podem metabolizá-la (FEINMAN; FINE, 2013). A entrada de frutose nos hepatócitos, assim como nas células musculares, ocorre através do GLUT-2 e dispensa a ação da insulina (DOUARD; FERRARIS, 2013), sendo essa uma importante diferença entre frutose e glicose, já que esta última depende da ação da insulina para entrar nessas células. Durante seu metabolismo, cerca de 30 a 50% da frutose ingerida é convertida à glicose (SUN; EMPIE, 2012). A frutose também estimula a produção de glicogênio (PETERSEN et al., 2001), além de contribuir para o aumento da síntese de triglicerídeos e acetil-CoA (FEINMAN; FINE, 2013).

A primeira etapa do metabolismo da frutose é a sua conversão rápida e livre de *feedbacks* negativos à frutose-1-fosfato pela ação da enzima frutoquinase (JOHNSON et al., 2013). Vale destacar que a enzima apresenta duas isoformas: A e C. A frutoquinase C é expressa principalmente no fígado, apresenta alta afinidade pela frutose e é responsável pelo rápido *clearance* da frutose do compartimento sanguíneo. Já a frutoquinase A está distribuída em territórios extra-hepáticos e apresenta uma menor afinidade pela frutose quando comparada à isoforma hepática (ISHIMOTO et al., 2012). Consecutivamente, a frutose-1-fosfato é clivada a d-gliceraldeído e fosfato de diidroxiacetona por ação da enzima aldolase B, e esses metabólitos alimentam diferentes vias que culminam na síntese descontrolada de triglicerídeos, glicose ou glicogênio (FEINMAN; FINE, 2013) (Figura 1) .

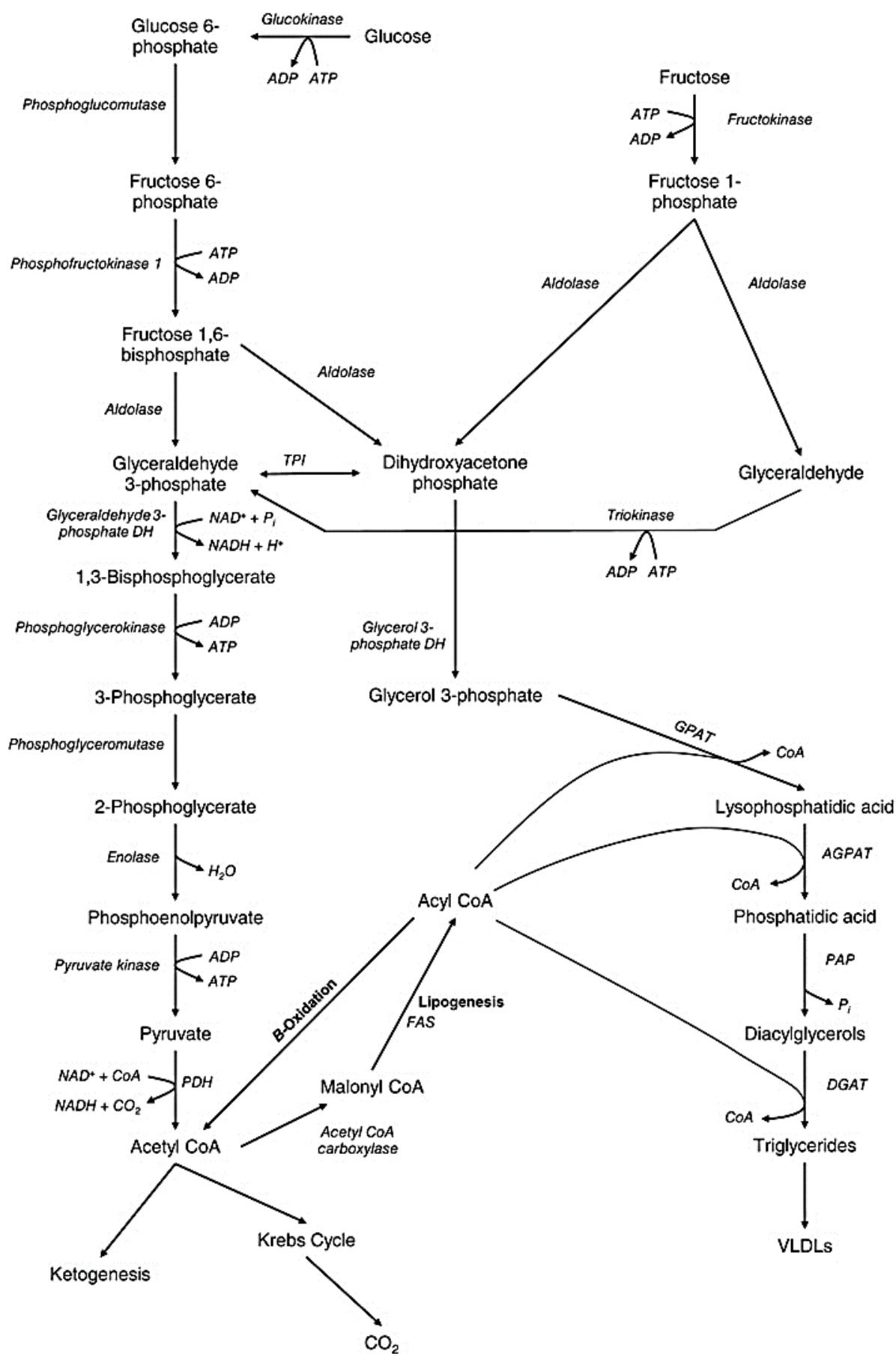


Figura 1. Glicólise, frutólise e síntese hepática de triglicerídeos. Na figura, a glicose passa pela glicólise para gerar piruvato que é subsequentemente utilizado para uma série de processos que incluem o catabolismo oxidativo, cetogênese e lipogênese sob catálise da ácido graxo sintase (FAS). A via frutolítica alimenta a via glicolítica a nível das trioses: fosfato de di-hidroxiacetona e gliceraldeído 3-fosfato. Ela permite que a produção de acetil-CoA continue sem regulação pela insulina e, portanto, promove a lipogênese e a subsequente síntese de triglicerídeos (TG) a partir do produto acil-coenzima A (CoA). Isso envolve a acilação progressiva de um esqueleto de glicerol-fosfato pela glicerol-fosfato aciltransferase (GPAT) e pela acilglicerol-fosfato acil transferase (AGPAT). A desfosforilação do esqueleto de glicerol ocorre sob a catálise da fosfatase do ácido fosfático (PAP), seguida por uma acilação adicional do diacilglicerol pela diacilglicerol acil transferase (DGAT). Os TGs produzidos são empacotados em lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDLs) para exportação do fígado, ou são armazenadas dentro de hepatócitos. DH: desidrogenase; NAD: dinucleótido de nicotina adenina; NADH: forma reduzida de NAD; PDH: piruvato desidrogenase; TPI: triose fosfato isomerase. Adaptação a partir de TRAN; YUEN; MCNEILL, 2009.

Como vimos no parágrafo anterior, o metabolismo da frutose pode ser direcionado para a formação de triglicerídeos, logo, o açúcar tem sido associado ao aumento da concentração plasmática de triglicerídeos e aumento da conversão à lipídios no fígado, sugerindo que a lipogênese é um importante processo bioquímico induzido pela frutose (OUYANG et al., 2008). O consumo crônico de frutose já foi mostrado como fonte de substrato para lipogênese de novo, que culmina em aumento da síntese de VLDL e reduz a oxidação lipídica no fígado (DORNAS et al., 2015), propiciando o desenvolvimento de esteatose hepática não-alcoólica.

O aumento da síntese de lipídeos também provoca a deposição ectópica desses produtos que pode levar à resistência à insulina por interferir na sinalização do hormônio nos tecidos alvo (SHULMAN, 2000). De fato, estudos clínicos demonstraram que pacientes sob dieta rica em frutose apresentaram maiores níveis séricos de triglicerídeos (ASSY et al., 2008; LE et al., 2009; LÊ et al., 2006; TEFF et al., 2004), corriqueiramente acompanhado de resistência à insulina (ASSY et al., 2008; LE et al., 2009).

O efeito lipogênico da frutose também já foi detectado após curto período. Park e colaboradores demonstraram os efeitos da ingestão de bebidas contendo glicose e/ou frutose sobre a lipogênese. Os autores observaram aumento da lipogênese decorrente da elevação da razão frutose/glicose da bebida, além de um aumento imediato na trigliceridemia após a ingestão da bebida com frutose (PARKS et al., 2008). Resultados similares demonstraram que bebidas adoçadas com frutose aumentaram agudamente (até 24 horas) os níveis sanguíneos de triglicerídeos em homens e mulheres obesas (TEFF et al., 2009).

A importância dessas alterações metabólicas é destacada pelo excerto do *Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III)*: muitas pessoas têm uma constelação de fatores de risco lipídicos e

não lipídicos de origem metabólica que representa um grave risco para o aparecimento de doenças cardiovasculares e é designada como síndrome metabólica (EXPERT PANEL ON DETECTION, EVALUATION, AND TREATMENT OF HIGH BLOOD CHOLESTEROL IN ADULTS, 2001). A síndrome metabólica está presente quando um indivíduo apresenta ao menos 3, destes 5 fatores: obesidade abdominal, elevação da glicemia em jejum, elevação da pressão arterial, elevação da trigliceridemia e baixo HDL (REAVEN, 2004).

Em suma, o acúmulo dos produtos energéticos resultantes do metabolismo da frutose têm sido associados a alterações metabólicas como a resistência à insulina, hipertensão arterial, dislipidemias, acúmulo de gordura visceral e obesidade em trabalhos que estudaram a ingestão crônica de frutose (VARTANIAN; SCHWARTZ; BROWNELL, 2007; WHITE, 2013). Além disso, tais fatores são fortemente relacionados ao risco de doenças cardiovasculares (SWARBRICK et al., 2008). Portanto, é bem descrito que o consumo crônico de frutose leva à síndrome metabólica e traz todos os riscos cardiovasculares a ela associados.

1.3. Frutose e a função vascular

Quando falamos em risco cardiovascular, é importante destacar que apesar dos avanços científicos que envolvem a matéria, as doenças cardiovasculares ainda são a principal causa de morte natural (GBD 2013 MORTALITY AND CAUSES OF DEATH COLLABORATORS et al., 2015). Nos Estados Unidos, a prevalência de doenças cardiovasculares soma 85,6 milhões de pessoas, o que corresponde a mais de um terço da população norte-americana (MOZAFFARIAN et al., 2016). No Brasil, em 2007, 29,4 % dos óbitos foram decorrentes de doenças cardiovasculares (VI Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial). Países de média e baixa renda registram 80% das mortes causadas por doenças cardiovasculares (MOZAFFARIAN et al., 2016).

Doenças cardiovasculares são intimamente ligadas à disfunção vascular, especialmente à disfunção endotelial que, por sua vez, tem uma forte conexão com as complicações cardiovasculares observadas em doenças metabólicas como a diabetes e a obesidade (KIM et al., 2006, 2012a).

O endotélio vascular é uma camada de células epiteliais pavimentosas singular. Somente em 1977 deixou de ser tratado como apenas uma barreira física entre o sangue e o músculo liso vascular, quando foi relatada a primeira indicação de que ele possuía fundamental importância no controle do tônus vascular, por meio da produção de substâncias vasoativas (MONCADA et al., 1977). Mais que isso, atualmente é sabido que

as células endoteliais sintetizam e liberam fatores que regulam a angiogênese, as respostas inflamatórias e o tônus vascular. O endotélio também é responsável pela manutenção do balanço entre a promoção e a inibição da proliferação e migração das células do músculo liso vascular, além de prevenir a agregação plaquetária e a trombose (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009). Os principais fatores relaxantes provenientes do endotélio são: óxido nítrico (NO) (BOLOTINA et al., 1994), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (TAYLOR; WESTON, 1988) e a prostaciclina (MONCADA et al., 1977). Dentre os fatores contráteis, destacam-se: a angiotensina II (SKEGGS et al., 1954), endotelina-1 (YANAGISAWA et al., 1988), ânion superóxido (RUBANYI; VANHOUTTE, 1986) e derivados da via do ácido araquidônico, a citar o tromboxano e as prostaglandinas H₂ e F_{2α} (FRÖLICH; FÖRSTERMANN, 1989). Alterações na biodisponibilidade, seja por um desequilíbrio na síntese e liberação ou na degradação dessas espécies vasoativas caracteriza a disfunção endotelial, que altera o controle do tônus vascular contribuindo para o aparecimento de hipertensão, doenças coronarianas, aterosclerose, acidentes circulatórios cerebrais e outros (KIM et al., 2006, 2012b).

A suscetibilidade a essas doenças é multifatorial, envolvendo fatores genéticos e fatores biológicos de base, como obesidade e diabetes; e fatores comportamentais como o sedentarismo, tabagismo e dieta (MOZAFFARIAN et al., 2016).

No que tange a dieta, em vista do que destacamos na seção anterior, a frutose compõe o rol de agressores ao sistema vascular e sua influência negativa sobre tal começa ainda na primeira etapa do seu metabolismo, com destacada ação sobre o endotélio. Quando a frutose é fosforilada em frutose 1-fosfato na reação catalisada pela fructoquinase, como já citamos, um ATP é consumido no processo. Em seguida, a enzima frutose-1-p aldolase quebra a frutose 1-fosfato em fosfato de di-hidroxiacetona e d-gliceraldeído. Quando há uma alta ingestão de frutose, a fosforilação em frutose 1-fosfato é rápida, mas a reação com a aldolase é lenta. Assim, o 1-fosfato de frutose acumula-se enquanto os níveis de fosfato caem, o que estimula a atividade da AMP deaminase, que catalisa a degradação de AMP em monofosfato de inosina, que aumenta a taxa de degradação de purinas, cujo metabólito é o ácido úrico (figura 2) (CALICETI et al., 2017; EMMERSON, 1974; FOX; KELLEY, 1972; TURNER et al., 1979). Estudos epidemiológicos revelaram que a hiperuricemia tem uma relação forte com a resistência à insulina, hipertensão e aterosclerose (ZHANG; JIAO; KONG, 2017).

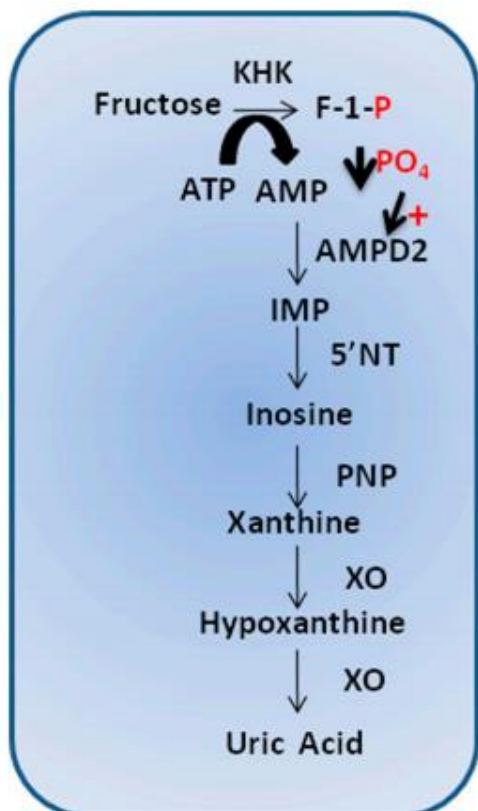


Figura 2. Formação de ácido úrico em consequência da frutólise. A frutose é rapidamente fosforilada no hepatócito pela frutoquinase (KHK) para frutose-1-fosfato (F-1-P), que usa a adenosina trifosfato (ATP) como doador de fosfato (do seu uso, obtemos adenosina difosfato e, conseqüentemente, adenosina monofosfato (AMP)). Os níveis de fosfato intracelular (PO₄) diminuem, estimulando a atividade da AMP deaminase 2 (AMPD2). A AMPD2 converte o AMP em monofosfato de inosina (IMP). O IMP é metabolizado em inosina pela 5' nucleotidase (5'NT), que é ainda degradado em xantina e hipoxantina pela xantina oxidase (XO), finalmente gerando ácido úrico. Adaptação a partir de (JOHNSON et al., 2013).

A nível vascular, a hiperuricemia está associada à disfunção vascular induzida pelo dano oxidativo que promove, e pela estimulação da proliferação de células musculares lisas e endoteliais, liberação de substâncias pró-inflamatórias e redução da biodisponibilidade de NO (DORNAS et al., 2015).

A metabolização da frutose também aumenta os níveis intracelulares de piruvato, que pode ser convertido em lactato, exportado do fígado, captado pelos tecidos periféricos e convertido em glicose para obtenção de energia. Aproximadamente 40% do lactato absorvido pelos músculos é convertido em glicose (HEDEN et al., 2014; ZHANG; JIAO; KONG, 2017), aumentando sua concentração intracelular e, por si só, contribuindo com a resistência à insulina. Além disso, o lactato reduz a sinalização via fosfatidilinositol-3-quinase e Akt (HEDEN et al., 2014), reduzindo a resposta à insulina e diminuindo a ativação da NOS, o que contribui com a disfunção vascular observada durante o uso crônico do açúcar (figura 3).

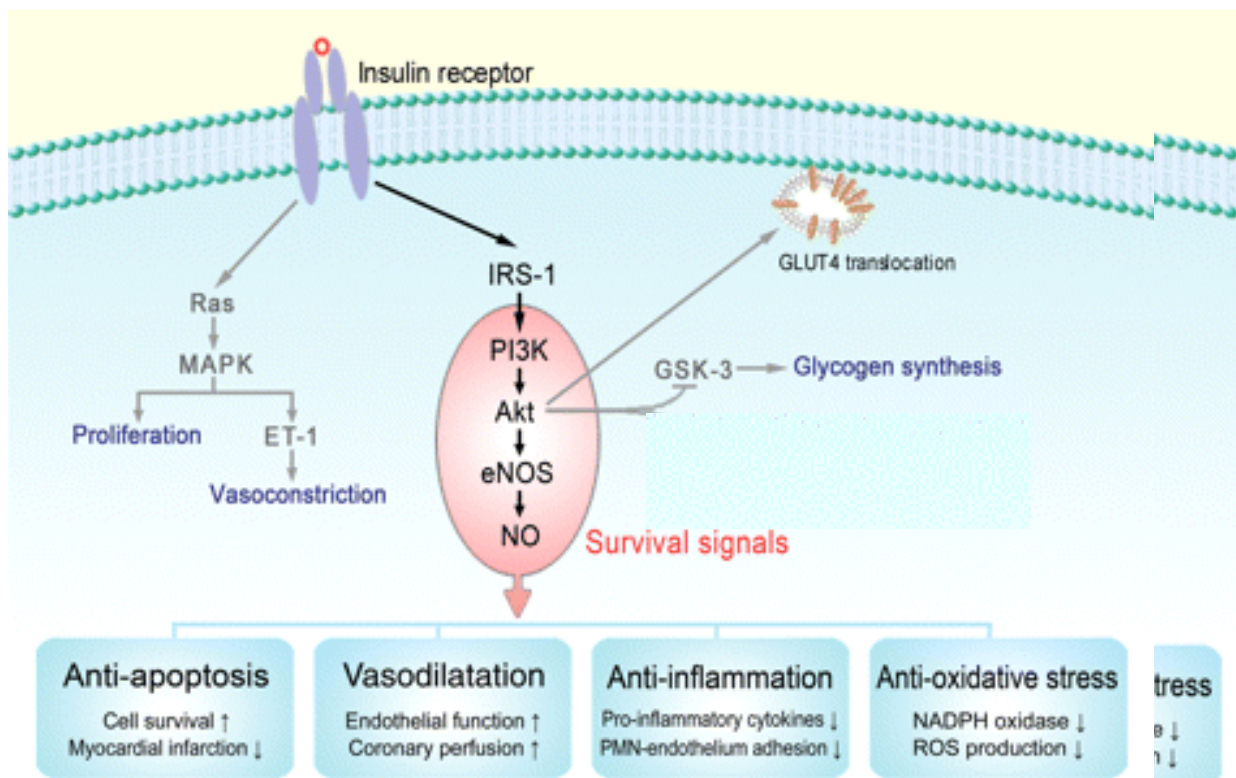


Figura 3. Sinalização da insulina via seu receptor transmembranar e sua relação com a produção de óxido nítrico. A insulina liga-se ao receptor de insulina da membrana celular, levando à ativação de duas vias de sinalização, principalmente: Ras-MAPK, que resulta na proliferação celular; e PI3K – Akt – eNOS, que resulta em modulação metabólica e proteção cardiovascular. Entre as cascatas de sinalização ativadas por insulina, a PI3K-Akt – eNOS – NO representa uma ligação especial entre a insulina e o sistema cardiovascular no que diz respeito à saúde e patologia. A ativação dessa cascata de sinalização promove efeitos protetores cardiovasculares, incluindo vasodilatação, efeitos anti-inflamatórios e anti-oxidativos. Akt: proteína cinase B; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; ET-1: endotelina-1; GLUT4: transportador de glicose 4; GSK: glicogênio sintase quinase; IRS: substrato do receptor de insulina; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; PI3K: fosfatidilinositol 3'-quinase; PMN: neutrófilo polimorfonuclear; ROS: espécies reativas de oxigênio. Adaptação a partir de YU; GAO; MA, 2011.

Somada à hiperuricemia e ao acúmulo de lactato, temos a lipotoxicidade causada pela alta concentração de triglicerídeos e LDL-colesterol, comuns durante a alta ingestão de frutose. A hiperlipidemia contribui para a disfunção endotelial e magnifica o risco de doenças cardiovasculares, especialmente em pessoas obesas, diabéticas ou com síndrome metabólica (FERON et al., 1999; KIM et al., 2012b). As razões para isso incluem a redução da biodisponibilidade de NO, via inibição da eNOS, e o aumento do estresse oxidativo no endotélio.

Sendo assim, estudos publicados nos últimos anos vêm destacando que a frutose, que induz essas diversas alterações metabólicas, leva ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares por mecanismos que envolvem a disfunção vascular (JALAL et al., 2010; KLEIN; KIAT, 2015; MADERO et al., 2011; YANAI et al., 2008).

Tais características fizeram com que a dieta rica em frutose fosse adotada pela comunidade científica como modelo de disfunção metabólica para investigação da influência de parâmetros como hipertrigliceridemia, obesidade e resistência à insulina sobre o aparecimento de doenças cardiovasculares (EL-BASSOSSY; DSOKEY; FAHMY, 2014; EL-BASSOSSY HM, DSOKEY N, 2014; JALAL et al., 2010; PEKTAŞ; SADI; AKAR, 2015; PEREDO et al., 2006; PUYÓ et al., 2009; SOUSA et al., 2017; TAKAGAWA et al., 2001). Logo, emergiu a necessidade de determinar se a frutose, *per sí*, teria sua parcela de responsabilidade sobre as alterações vasculares observadas nesse modelo, independentemente do cenário metabólico que ela impõe.

Impulsionados por essas questões, Moreno and Hong, 2012, mostraram que, após 4 horas da ingestão de uma única dose de frutose por ratos, esses apresentavam reatividade aórtica à acetilcolina reduzida (MORENO; HONG, 2012). Em 2015, Almenara e colaboradores encontraram resultados similares, demonstrando que a sobrecarga *in vitro* com frutose durante 30 minutos aumenta a resposta vascular à fenilefrina e reduz a resposta à acetilcolina em aortas de ratos (ALMENARA et al., 2015). Almenara atribuiu essa resposta a uma maior produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pela NADPHoxidase (NOX) e subsequente oxidação do óxido nítrico, um dos principais agentes vasodilatadores derivados do endotélio, cuja depleção é um importante indicador de disfunção endotelial.

Contudo, permanecemos sem respostas sobre se a frutose propriamente afeta a reatividade vascular, já que o modelo agudo não mimetisa o consumo oral e o modelo crônico impossibilita a desvinculação das alterações metabólicas sabidamente atuantes sobre o tecido vascular.

1.4. Ações cardiovasculares da frutose em machos e fêmeas

As peculiaridades entre os sexos são notadas nas diferenças micro e macroscópicas. Quando tratamos de doenças cardiovasculares, apesar de ser a maior causa de morte para ambos os sexos, mulheres morem mais de doenças cardiovasculares que homens. Contudo, esse é um dado mascarado pela maior longevidade feminina. Quando ajustado pela idade, a mortalidade em decorrência de doenças cardiovasculares é maior nos homens (MOSCA; BARRETT-CONNOR; WENGER, 2011).

Os fatores de risco para doenças cardiovasculares, como colesterolemia, glicemia, hipertensão, tabagismo e outros, são os mesmos entre os sexos (PETERS; MUNTNER; WOODWARD, 2019). Porém, a incidência de um ou mais fatores pode variar entre homens e mulheres. A hipertensão, por exemplo, afeta mais aqueles do que estas (WEI et al., 2017).

A hipertensão é uma doença multifatorial, mas a sua fisiopatologia muito se conecta à disfunção endotelial. Mulheres são hemodinamicamente mais jovens que os homens da mesma idade, sendo protegidas pelos hormônios femininos até a menopausa contra o remodelamento, enrijecimento arterial e disfunção endotelial. Dentre os mecanismos para tal, está a ação antioxidante mediada pelo estrogênio (NOVELLA et al., 2019).

Como trazido no tópico anterior, as alterações metabólicas correlacionadas ao consumo de altas doses de frutose ensejam alterações endoteliais. Sendo as alterações endoteliais influenciadas pelo sexo, esse é um fator que poderia fazer das mulheres mais resistentes à disfunção vascular promovida pela frutose.

1.5. Problemática

Com 4 dias de exposição à frutose via água de beber, vislumbramos a possibilidade de avaliar a reatividade vascular sem o cenário similar ao da síndrome metabólica consolidado pelo uso prolongado de frutose, além de superar as limitações dos estudos de sobrecarga *in vitro*, e, dessa forma, demonstrar que 4 dias de suplementação com frutose promove alterações vasculares de maneira diferente entre os sexos.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Avaliar se a suplementação com frutose por 4 dias tem efeito sobre a reatividade vascular.

2.2. Objetivos específicos

- Definir se as alterações vasculares precedem a hipertrigliceridemia e resistência à insulina induzidas pela frutose;
- Definir se o sexo é um fator moderador dos efeitos vasculares da frutose;
- Estabelecer o papel do endotélio e do tecido adiposo perivascular na modulação vascular após 4 dias de suplementação com frutose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Modelo experimental

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos e fêmeas, com aproximadamente 12 semanas de idade, reproduzidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Eles foram mantidos em gaiolas com até 4 animais, sob condições controladas de temperatura (22-26 °C), umidade (40-60 %) e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e à ração.

Os animais foram classificados randomicamente em 2 grupos distintos. Um, o grupo controle (CT). O grupo CT foi subclassificado em 2 subgrupos, grupo controle machos e grupo controle fêmeas. Esses animais continuaram a receber água e dieta normais durante o período de experimentação. O outro grupo, Frutose (FR), e seus respectivos subgrupos, grupo machos e grupo fêmeas, tiveram a água normal substituída por solução aquosa de frutose à 10% p/v, a qual tinham irrestrito acesso durante 4 dias.

O uso e cuidado desses animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais (resolução normativa CONCEA nº 39, de 20.06.2018 ("MCTIC", [s.d.])), e os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES-CEUA 06/2014).

3.2. Glicemia em jejum, teste de tolerância à glicose e teste de sensibilidade à insulina

A glicemia foi avaliada após 4 dias de suplementação com frutose e para tal os animais foram submetidos ao jejum, durante à noite, por um período de aproximadamente 12 horas que antecediam o momento da dosagem. Um lote diferente de cada subgrupo de tratamento foi destinado a cada uma das análises descritas subseqüentemente.

Os animais também foram submetidos aos testes de tolerância à glicose e de sensibilidade à insulina. Esses testes foram realizados ao final do 4º dia de suplementação com frutose e consistem, respectivamente, na aferição das variações na glicemia após administração de glicose (2 mg/Kg) por via intraperitoneal, nos tempos 15', 30', 60', 90' e 120' após a administração; e na aferição das variações da glicemia após a administração de insulina (insulina regular, Lilly France SAS) via intraperitoneal (1 U/Kg), nos tempos 15', 30',

60', 90' e 120' após a administração. Para ambos os testes, o tempo 0' que aparece no gráfico é correspondente à glicemia de jejum, sendo que o teste de tolerância à glicose foi realizado após jejum de 12h, e o teste de sensibilidade à insulina foi realizado após jejum de 6 horas.

Para a aferição dos valores de glicemia, foi utilizado um glicosímetro (ACCU-CHEK, Roche, Alemanha) de sangue periférico e as amostras foram obtidas, repetidamente, da porção final da cauda dos animais acordados e submetidos ao mínimo de estresse possível. Nenhum tipo de anestesia ou contenção foram utilizados durante o processo.

3.3. Medida dos parâmetros bioquímicos séricos

Uma leva distinta de animais, contemplando todos os grupos e subgrupos experimentais, foi submetida a jejum de 12h, teve o sangue coletado por punção da aorta torácica em tubos de plástico sem anticoagulantes da BD Vacutainer. O sangue foi então centrifugado por 10 minutos a 3200g e amostras de soro foram coletadas e armazenadas a -80°C até serem enviados para análise laboratorial.

Os parâmetros ácido úrico, ácido láctico, lactato desidrogenase, triglicerídeos, colesterol total, HDL e VLDL foram automaticamente medidos pelo analisador bioquímico flexor XL® utilizando Kits de reagentes aberto Elitech®.

3.4. Avaliação da reatividade vascular de anéis de aorta à fenilefrina

3.4.1. Obtenção dos anéis isolados de aorta torácica

Os animais foram anestesiados com uma mistura anestésica, contendo quetamina e xilasina nas doses de 90 e 10 mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal. Após atestada a ação anestésica, os animais foram eutanasiados por exsanguinação jugular. A aorta torácica foi cuidadosamente removida e imersa rapidamente em solução de Krebs-Henseleit resfriada composta por (em mM): NaCl 118; KCl 4,7; CaCl₂.2H₂O 2,5; MgSO₄.7H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 23; Glicose 11; EDTA 0,01; aerada com mistura carbogênica contendo 5 % de CO₂ e 95 % de O₂, mantendo o pH em 7,4.

Após a retirada do tecido conectivo e adiposo, a aorta torácica foi dividida em 6—8 segmentos cilíndricos de aproximadamente 4 mm de comprimento (Figura 4). Alguns desses anéis tiveram o endotélio removido mecanicamente passando um fio de aço inoxidável na luz do vaso e friccionando contra a parede interna deste. Outros não tiveram o tecido adiposo perivascular removidos, sendo apenas segmentados.



Figura 4. Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo (esquerda); após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm (direita) (ANGELI, 2013).

A reatividade vascular desses anéis de aorta foi analisada utilizando o aparato experimental miógrafo de arame. Para isso, cada anel vascular foi colocado em cubas contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit aquecida a $36\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, continuamente gaseificada com mistura carbogênica, mantendo o pH estável em 7,4. Dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos de forma que ficassem paralelos na luz do vaso. Um dos triângulos metálicos foi fixado à parede inferior da cuba e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração de tensão exercida pelo vaso, na tentativa de modificar seu diâmetro interno, era captada pelo transdutor de força (TSD 125) conectado ao hardware de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; Santa Bárbara, CA- USA) e este a um computador (Figura 5).

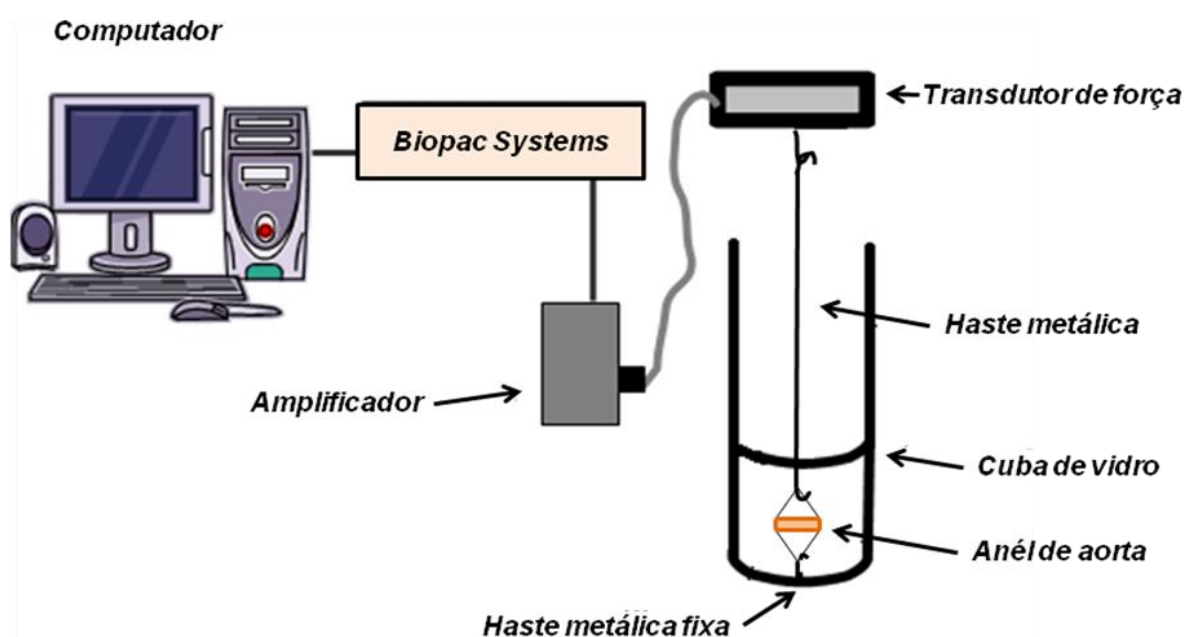


Figura 5. Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular "in vitro". Sistema de aquisição de dados Biopac Systems (ANGELI, 2013).

Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso entre 0.9 a 1.1 g, reajustada, quando necessário, durante 30 minutos de estabilização (figura 6A).

3.4.2. Avaliação da integridade funcional dos segmentos de aorta torácica

Após o período de 30 minutos de estabilização (figura 6A), uma dose de KCl 75 mM foi adicionada ao banho para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização (figura 6B,C). Após atingirem um aumento de um grama de força a partir do valor basal, a solução nutritora foi trocada três vezes com solução de Krebs-Henseleit e foi esperado até que a tensão retornasse ao valor de repouso (figura 6D). Após 30 minutos de estabilização, uma nova dose de KCl (75 mM) foi adicionada ao banho para a indução de uma contração máxima do músculo liso vascular, aferida após 30 minutos da adição, quando a tensão se estabiliza em um platô (figura 6E, F). Neste momento, os anéis foram novamente lavados trocando-se a solução nutritora três vezes para a remoção do excesso de KCl e a tensão voltar ao valor basal (1.0 grama) e, após 30 minutos (figura 6G, H), esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

A função endotelial foi avaliada por meio do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico, acetilcolina. Para tal, os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina 10^{-6} M. Uma vez estabilizada a tensão de contração, que se aproximava de 60% da contração induzida pelo KCl, uma dose única de acetilcolina (10^{-5} M) foi aplicada (figura 6I, J, L). Nenhum anel foi descartado como resultado desse teste porque uma redução do relaxamento nesse ponto poderia ser reflexo do modelo em si, e não de ocasional dano mecânico pela manipulação do dissecador. Apesar disso, nenhum anel teve prejuízo de relaxamento induzido pela acetilcolina. Os anéis que tiveram o endotélio propositadamente removido mecanicamente relaxaram no máximo 10% ou contraíram após a incubação com acetilcolina.

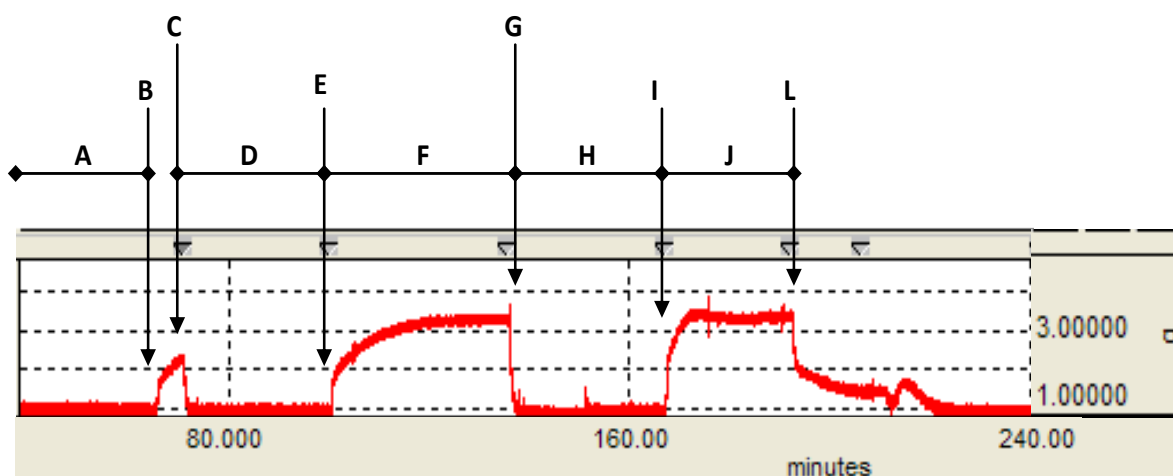


Figura 6. Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: (A) Período de estabilização inicial (30 min permanecendo na tensão de 0.9 a 1,3 g); (B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; (C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; (D) Período de estabilização (30 min); (E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; (F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); (G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; (H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: (I) Pré-contracção com fenilefrina (Fe) 10^{-6} M; (J) Platô da contração induzida pela Fe; (L) Adição de acetilcolina (ACh) 10^{-5} M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical. (modificado de Dias, 2007).

3.4.3. Protocolos Experimentais de reatividade vascular

3.4.3.1. A vasoconstrição induzida pela fenilefrina

Após a avaliação da viabilidade vascular com o KCl e da integridade funcional do endotélio, a solução nutritora do banho foi trocada três vezes para que a tensão basal fosse restabelecida. Após 30 minutos de estabilização e mais 30 minutos de eventual incubação de algum fármaco, foi realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (1×10^{-10} a 1×10^{-4} M) de maneira cumulativa nos segmentos aórticos de animais de todos os grupos experimentais.

3.4.3.2. A modulação do tecido adiposo perivascular na resposta vasoconstritora à fenilefrina

Com a finalidade de avaliar a capacidade do TAP em modular a resposta constritora à fenilefrina, alguns anéis aórticos tiveram o TAP removido por dissecação e outros, permaneceram com o TAP para serem então acoplados ao miógrafo de arame e então procedido como explicado anteriormente.

3.4.3.3. A modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina

Com a finalidade de avaliar a capacidade do endotélio em modular a resposta constritora à fenilefrina, foram utilizados nos protocolos experimentais anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e sem endotélio (E-). Nesses últimos, a camada de células endoteliais foi removida mecanicamente através do uso de hastes metálicas que foram inseridos na luz do vaso e friccionados à sua íntima, ocasionando lesão do endotélio. Esse procedimento foi seguido da montagem dos anéis no aparato experimental já descrito. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina 10^{-5} M induzir o relaxamento, após a pré-contracção com fenilefrina (10^{-6} M). A preparação foi lavada e, após 30 minutos de retorno à tensão basal, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 1×10^{-4} M).

3.4.3.4. A participação dos fatores endoteliais nas alterações vasculares mediadas pela exposição à frutose

Todos os protocolos de reatividade vascular, a partir deste momento, foram realizados da seguinte forma: após o teste do endotélio e dos 30 minutos de estabilização da preparação, o fármaco foi incubado por trinta minutos e então realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 1×10^{-4} M) (figura 7).

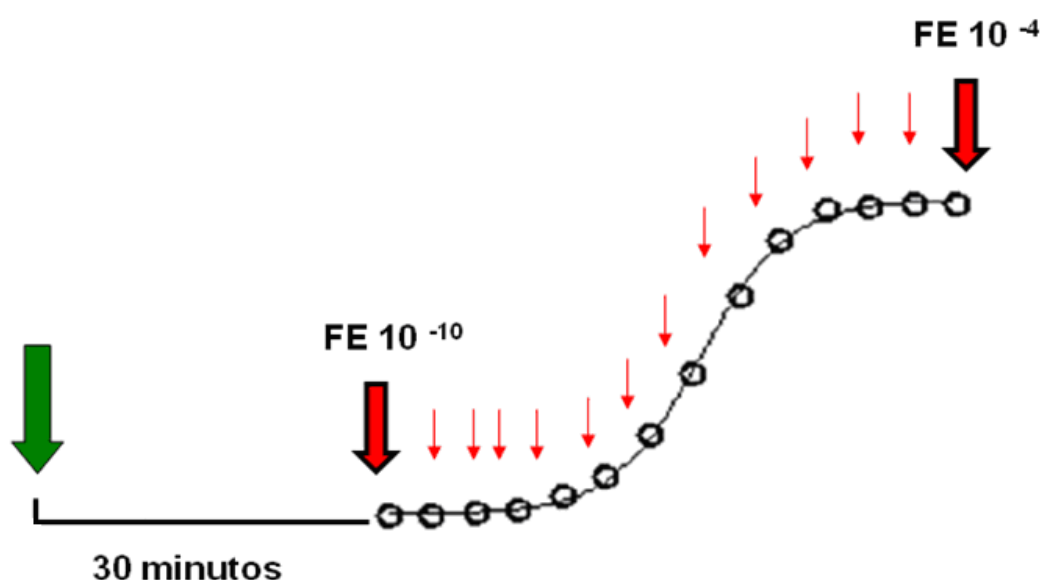


Figura 7. Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE (10^{-10} a 1×10^{-4} M) (Angeli, 2009).

A participação de determinados agentes vasoativos na modulação das respostas contráteis à fenilefrina foi avaliada por meio da incubação de drogas inibidoras dessas vias. As drogas foram incubadas 30 minutos antes do início das curvas-concentração resposta à fenilefrina, permanecendo no banho até o final do protocolo. Com a finalidade de estudar a participação do óxido nítrico (NO) na resposta contrátil à fenilefrina após a suplementação por 4 dias com frutose, os anéis de aorta foram incubados com um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μ M, SIGMA). A participação de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas respostas vasculares foi avaliada por meio da incubação do varredor enzimático de peróxido de hidrogênio, a catalase (catalase de fígado bovino, 1000 U.ml⁻¹, SIGMA) e do inibidor da SOD, o DETCA (diethyldithiocarbamate, 0,5mM, SIGMA). Para avaliar a possível fonte dessas EROs, foi utilizado o inibidor da NADPH oxidase, apocinina (30 μ M, SIGMA).

3.5. Expressão dos resultados e análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os valores de N significam o número de animais utilizados em cada grupo experimental em cada protocolo representado.

Os resultados de reatividade vascular das curvas concentração-resposta à fenilefrina foram normalizados em função da resposta máxima de contração ao KCl (75 mM) e estão expressas em porcentagem.

Para a determinação dos valores de resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e pD_2 ($-\log EC_{50}$, concentração de fenilefrina que produz 50 % da resposta máxima), em resposta ao agonista utilizado, foi realizada uma análise de regressão não-linear, obtida por meio da análise das curvas concentração-resposta com auxílio do GraphPrism Software (San Diego, CA, USA). O pD_2 , por ser um parâmetro relacionado à dose necessária do agonista para que se observe 50% da sua resposta máxima, é utilizado como medida de sensibilidade ao agonista.

A fim de comparar a magnitude de efeito dos fármacos sobre a resposta contrátil à fenilefrina dos grupos estudados, quando havia diferença entre as curvas basais de cada subpopulação, alguns resultados foram expressos como diferenças das áreas abaixo das curvas (dAUC) de concentração-resposta à fenilefrina. A AUC foi calculada para cada curva concentração-resposta e a diferença foi expressa como porcentagem da diferença da AUC (%dAUC) da curva controle correspondente (a curva obtida do mesmo grupo experimental, sem incubação de drogas bloqueadoras das vias dos agentes vasoativos, sem TAP e com endotélio).

A análise estatística dos resultados foi realizada por teste t de Student não-pareado, análise de variância de dois parâmetros (ANOVA 2 vias). Para analisar as diferenças individuais na análise de variância foi realizado o pos-hoc Bonferroni, utilizando-se GraphPrism Software (San Diego, CA, USA). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

3.6. Fármacos e reagentes utilizados

- Acetilcolina, cloridrato (Sigma)
- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Merck)

- Apocinina (Acetovanilona) (Sigma)
- Bicarbonato de sódio (Vetec)
- Catalase (Catalase extraída de fígado bovino) (Sigma)
- Catalase fígado bovino (Sigma)
- Cloreto de cálcio diidratado (Merck)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- Dietilditiocarbamato tetrahidrato de sódio (DETCA) (Sigma)
- Fosfato de potássio monobásico (Merck)
- Frutose (WOW! Nutrition)
- Glicose (Merck)
- L-Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
- Losartan (Sigma)
- N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma)
- Sulfato de magnésio heptahidratado (Merck)

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada e, quando necessário estocagem, foram mantidas no congelador a -20° C.

4. RESULTADOS

4.1. Parâmetros bioquímicos séricos

A suplementação com frutose por 4 dias não afetou os índices bioquímicos de ratas, mas repercutiu em alterações em alguns dos analisados em ratos.

Nos machos tratados foi constatada a elevação da concentração sérica de triglicerídeos e de VLDL após jejum de 12 horas, como podemos observar na figura 8C e 8E, respectivamente, bem como na tabela 1 que explicita as médias de cada parâmetro de cada grupo. Contudo, HDL e colesterol total não se alteraram (figura 8F e D, respectivamente, e tabela 1). As concentrações séricas de ácido láctico e ácido úrico não sofreram alterações por influência do tratamento em machos (figura 8B e 8A, respectivamente, e tabela 1).

Nas fêmeas, no que tange os parâmetros bioquímicos acima citados, nenhuma diferença foi encontrada entre as fêmeas controle e as fêmeas suplementadas com frutose (figura 8 e tabela 1).

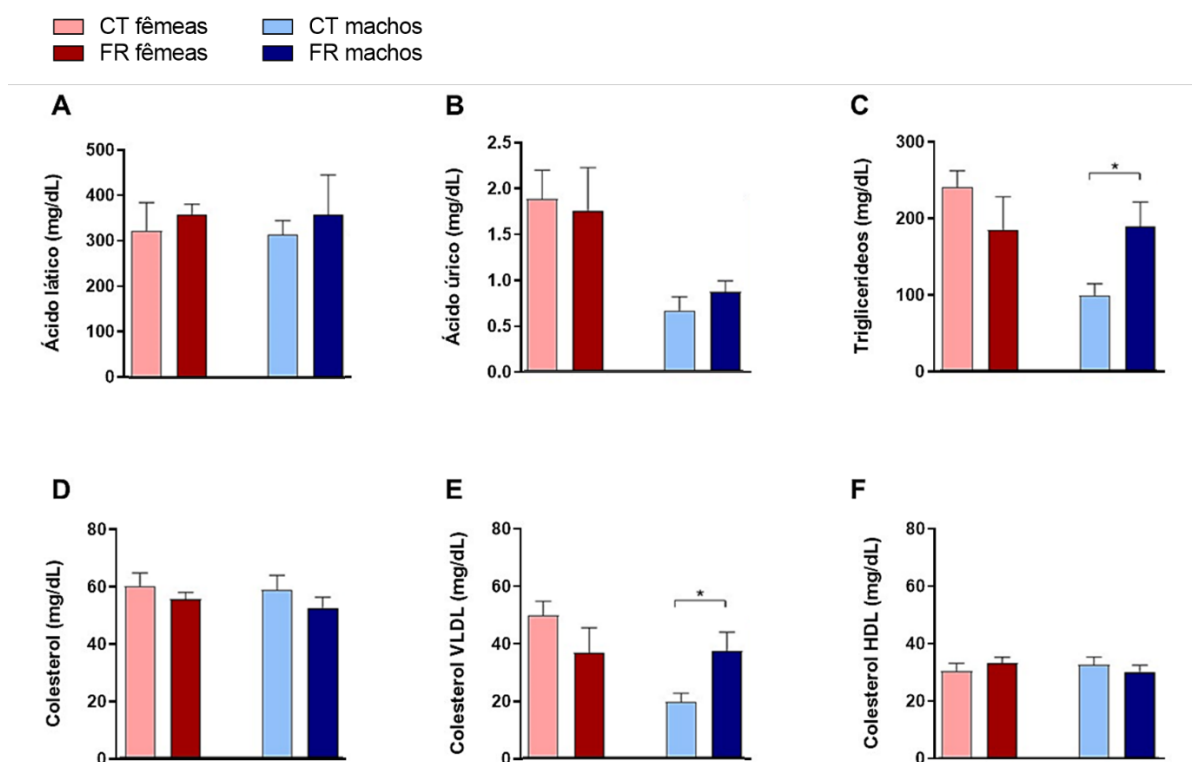


Figura 8. Parâmetros bioquímicos séricos de ratos controles e ratos suplementados com frutose durante 4 dias. * $p < 0,05$ vs controle. $N = 4-5$. Comparação intra-sexo usando teste t-Student.

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos séricos de ratos controles e ratos suplementados com frutose durante 4 dias.

	FR MACHOS	CT MACHOS	FR FÊMEAS	CT FÊMEAS
ÁCIDO LÁTICO (MG/DL)	359±88	315±30	358±23	323±62
ÁCIDO ÚRICO (MG/DL)	0,9±0,12	0,67±0,15	1,75±0,5	1,88±0,32
TRIGLICERÍDEOS (MG/DL)	188±33*	98±16	185±43	240±21
COLESTEROL TOTAL (MG/DL)	53±4	59±5	56±3	60±5
COLESTEROL VLDL (MG/DL)	37±7*	19±3	37±9	50±5
COLESTEROL HDL (MG/DL)	30±2	32±3	33±2	30±3

*p<0,05 vs CT. N=4—5. Teste t-Student.

4.2. Tolerância à glicose, sensibilidade à insulina e glicemia de jejum

Após 4 dias de suplementação com frutose nós avaliamos a tolerância à glicose, a sensibilidade à insulina e glicemia de jejum dos animais tratados e controles.

O teste de tolerância à glicose foi realizado com a aplicação de uma injeção de glicose (2 g/kg, ip), após jejum de 12 horas. A figura 9A apresenta o curso temporal da glicemia de machos, tratados ou não com frutose, após a injeção intraperitoneal de glicose. Os níveis basais de glicemia são semelhantes, mostrando que a suplementação com frutose por 4 dias não afeta a glicemia de jejum. Contudo, após 15 minutos da infusão da solução concentrada de glicose, a elevação da glicemia foi maior nos machos suplementados por 4 dias quando comparados aos controles.

Para o teste de sensibilidade à insulina, os níveis plasmáticos de glicose foram avaliados após a injeção intraperitoneal de insulina (1 U/kg, ip), nos animais em jejum de 6 horas. Nos machos, não observamos qualquer alteração na glicemia basal após 6 horas de jejum, tampouco diferenças na diminuição gradual da glicemia estimulada pela infusão de insulina quando comparamos os dois grupos de animais (figura 9B).

Os procedimentos foram realizados em fêmeas bem como descrito para os machos. A glicemia de jejum, a tolerância à glicose e a resistência à insulina foi a mesma nas fêmeas suplementadas com frutose quando comparadas às fêmeas controles, como podemos constatar pela sobreposição das curvas que representam a glicemia ao longo do curso temporal dos experimentos (figuras 9C e D, respectivamente).

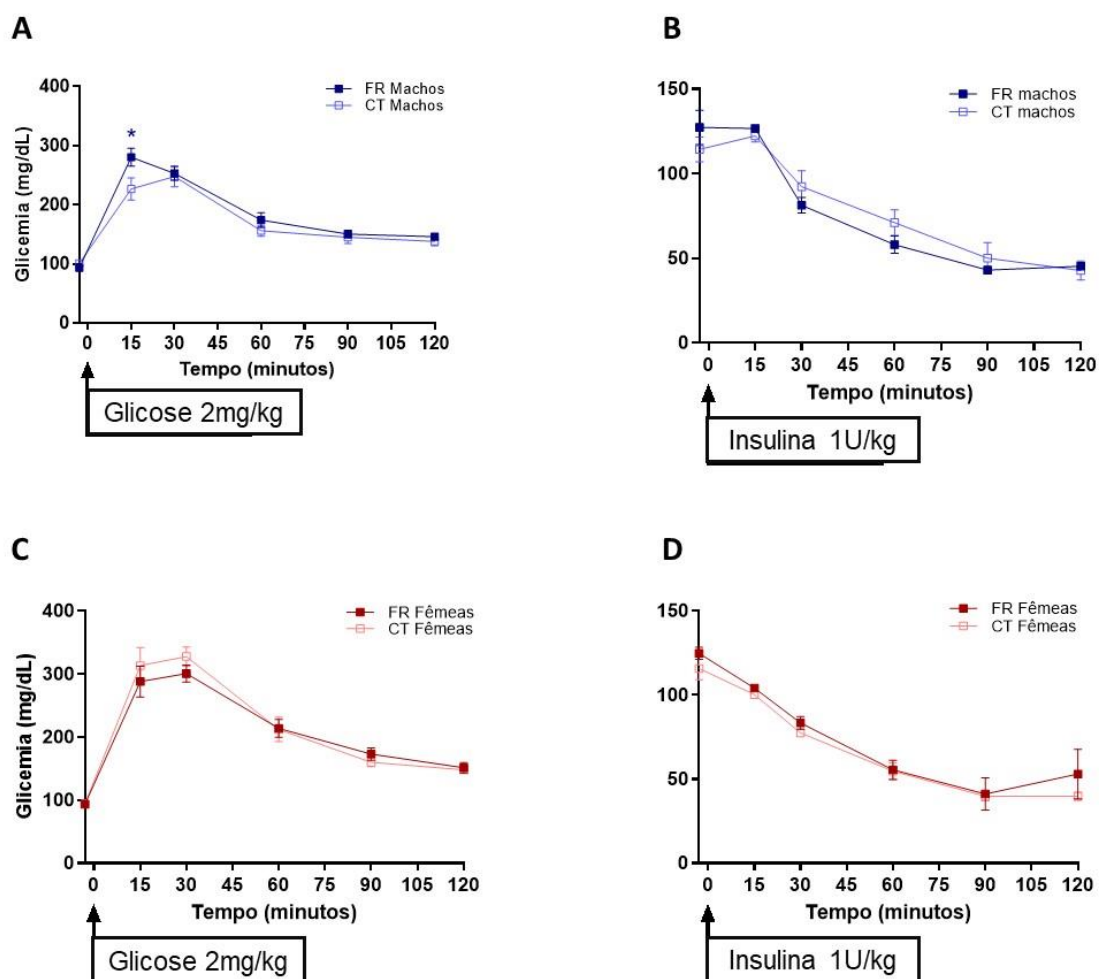


Figura 9. Curso temporal (A e C) dos níveis sanguíneos de glicose de ratos controles e ratos suplementados com frutose durante 4 dias após a injeção de glicose (2mg/kg, ip). (B e D) Curso temporal dos níveis sanguíneos de glicose de ratos controles e ratos tratados com frutose durante 4 dias após a injeção de insulina (1U/kg, ip). N=4—5. * corresponde à glicemia que foi diferente no ponto temporal analisado por meio da anova 2 vias para os quais $p < 0,05$ vs o CT correspondente.

4.3. Reatividade vascular

A análise inicial de como a suplementação com frutose durante 4 dias afeta a reatividade vascular revela diferenças entre os sexos. Observamos que a reatividade vascular à fenilefrina do grupo de fêmeas tratado foi menor quando comparada ao seu grupo controle correspondente (figura 10A e tabela 2), como deixa claro a menor resposta máxima à fenilefrina daquele grupo.

No entanto os machos não apresentaram qualquer diferença entre os subgrupos (figura 10C), sem diferenças de R_{max} e pD_2 entre os animais tratados ou não com frutose (tabela 2).

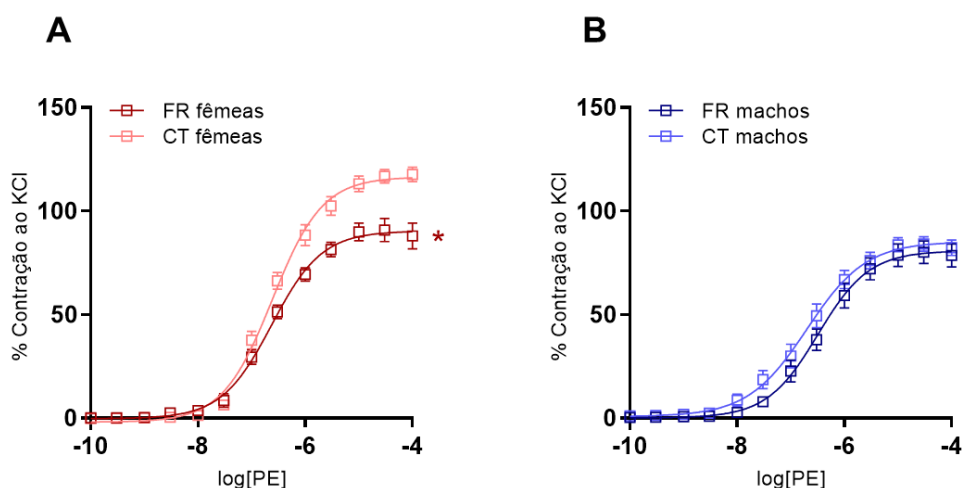


Figura 10. Curvas concentração-resposta à fenilefrina (A) correspondente às fêmeas e (B) aos machos. * corresponde ao teste t-Student entre Rmax para os quais $p < 0,05$ vs o CT correspondente. N = 13—15. CT: controle; FR: ratos suplementados com frutose; PE: fenilefrina.

Tabela 2. Valores de resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (pD2) correspondentes às curvas concentração-resposta à fenilefrina.

Intervenção farmacológica	FR MACHOS		CT MACHOS		FR FÊMEAS		CT FÊMEAS	
	pD2	Rmax	pD2	Rmax	pD2	Rmax	pD2	Rmax
PE	6,5±0,1	81±3	6,7±0,1	85±3	6,6±0,1	90±2 [§]	6,6±0	116±2
PE + E-	7,8±0,1 [#]	156±4*	8,1±0,2 [#]	166±6*	7,9±0,2 [#]	144±8*	7,5±0,1 [#]	128±2*
PE + LNAME	6,9±0,1 [#]	148±6*	6,9±0,1 [#]	143±5*	7,3±0,1 [#]	171±6*	7,3±0,1 [#]	188±8*
PE + APOCININA	6,5±4	71±0,1	6,5±0,2	82±5	6,4±0 [#]	77±5*	6,3±0,1 [#]	52±3*
PE + DETCA	7,2±0,1 [#]	145±7*	6,9±0,1 [#]	150±4*	6,9±0,1 [#]	175±4*	7,3±0,1 [#]	180±8*
PE + CATALASE	6,5±0,1	95±5	6,8±0,1	101±4	6,6±0,1	124±5	6,6±0,1	95±4
PE + TAP	5,6±0,2*	69±5	6,2±0,1	92±4*	5,7±0,1*	101±6	5,9±0,1 [#]	82±3*

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. Rmax: resposta máxima, expressa como porcentagem da resposta contrátil induzida por 75mM de KCl. pD2: $-\log EC_{50}$. * corresponde ao teste t-Student entre Rmax para os quais $p < 0,05$ vs o PE correspondente na mesma coluna. [#] corresponde ao teste t-Student entre pD2 para os quais $p < 0,05$ vs o PE correspondente na mesma coluna. [§] corresponde ao teste t-Student entre Rmax para os quais $p < 0,05$ vs CT fêmeas. N = 13—15. CT: controle; FR: ratos suplementados com frutose; PE: fenilefrina; E-: vasos sem endotélio; TAP: tecido adiposo perivascular.

4.3.1. Reatividade vascular em machos

A reatividade vascular à fenilefrina de anéis de aorta, sem TAP e isolados de machos não foi afetada pelo tratamento com frutose (figura 11A) (tabela 2). Contudo, para investigar se a frutose prejudica a modulação endotelial durante a resposta contrátil à fenilefrina, segmentos de aorta tiveram o endotélio removido mecanicamente e foram submetidos a doses crescentes do agonista. A remoção do endotélio aumentou a resposta contrátil das artérias de ambos, machos tratados ou não com frutose, seja a nível de resposta máxima ou

de sensibilidade (tabela 2), e em igual magnitude (figura 11B). Isso sugere que a frutose, após 4 dias, não altera a modulação endotelial sobre a reatividade à fenilefrina em aorta de ratos.

Conquanto, o fenótipo global de reatividade observado nesse sexo poderia ser reflexo de um reajuste entre vias pró e anticontráteis. Para investigar isso, foram feitas incubações de drogas inibidoras das principais vias de agentes que modulam a contração de artérias de condutância e são afetadas pela suplementação com frutose, segundo estudos anteriores.

O NO é um importante agente produzido no endotélio que, dentre outras funções, modula a contração do músculo liso subjacente. A sua influência sobre a intensidade da resposta vascular à fenilefrina foi avaliada por meio da inibição da NOS com o fármaco L-NAME. Assim como a remoção do endotélio, o bloqueio da produção enzimática de NO resulta em aumento da resposta vascular, cuja magnitude é proporcional a sua modulação sobre a contração. Assim como foi observado em anéis sem endotélio, com o L-NAME, machos suplementados e controles tiveram a mesma magnitude de aumento da resposta à fenilefrina (figura 11C), o que fica claro ao compararmos o R_{max} e o pD_2 desses subgrupos (tabela 2).

Uma vez que trabalhos anteriores envolvendo o tema observaram aumento do estresse oxidativo, nós avaliamos a participação do ânion superóxido, do peróxido de hidrogênio e da NADPH oxidase na resposta contrátil de aortas.

A incubação do DETCA, um bloqueador da enzima superóxido dismutase, aumentou a reatividade à fenilefrina em ambos os grupos, como já era de se esperar devido ao acúmulo citosólico de ânion superóxido resultante, e a magnitude foi igual entre machos suplementados e controles (figura 11E), sem diferenças de R_{max} e pD_2 entre os subgrupos. Já a catalase não alterou a resposta à fenilefrina (figura 11F), e a diminuição da resposta ao agonista alfa-adrenérgico gerado pela inibição da NADPH oxidase, por meio da incubação de apocinina, teve a mesma magnitude em machos suplementados quando comparados aos controles (figura 11D). Valores de R_{max} e pD_2 utilizados nas comparações podem ser apreciados na tabela 2. Diante desses dados, podemos afirmar que a modulação vascular exercida na aorta de ratos pelas EROs derivadas da NADPH oxidase e seus subsequentes metabólitos não foram afetados pela suplementação com frutose por 4 dias.

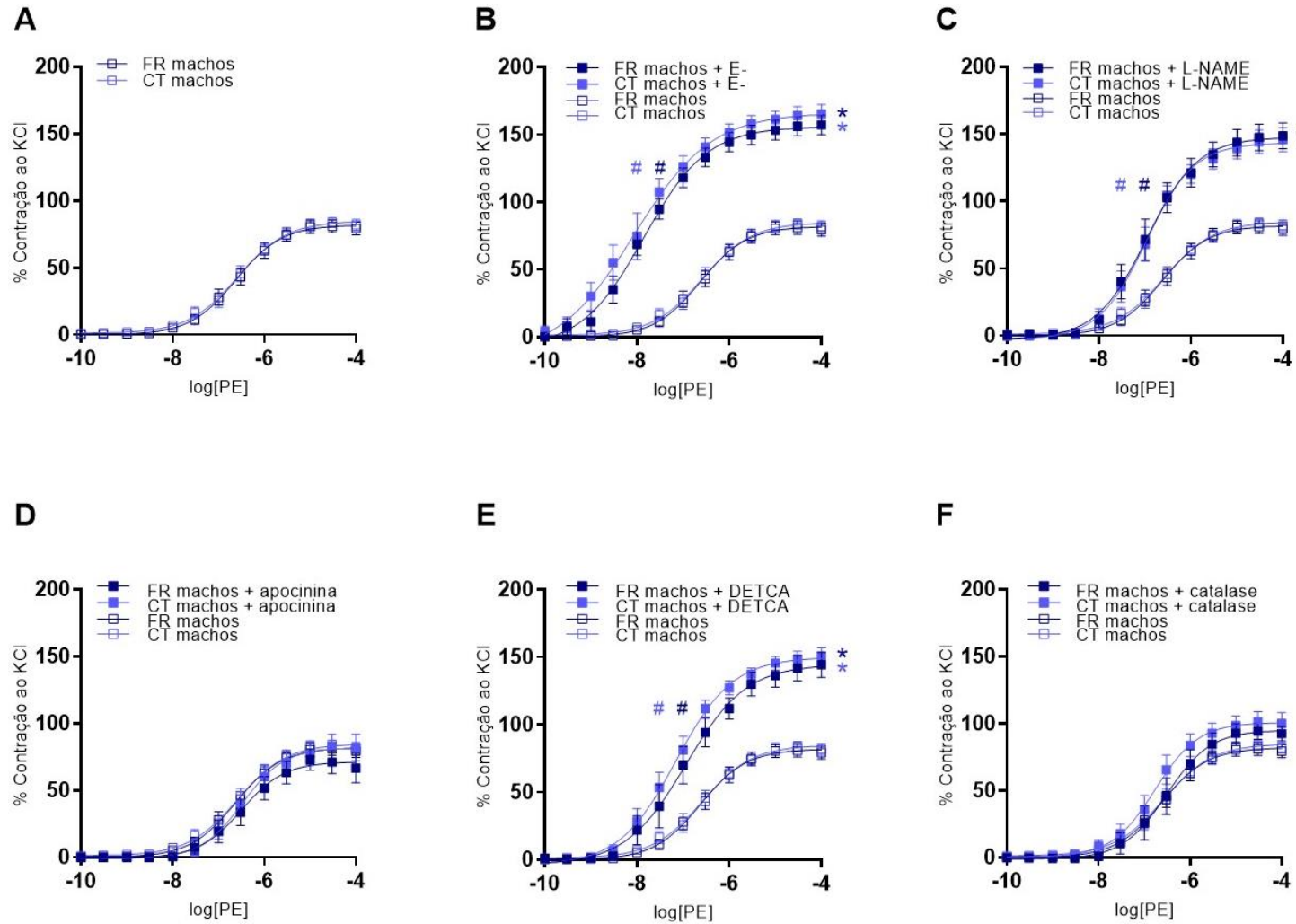


Figura 11. Curvas concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta de machos suplementados com frutose e seus respectivos controles (A) em condições basais, após (B) a remoção do endotélio vascular, (C) incubação com L-NAME, (D) incubação com apocinina, (E) incubação com DETCA e (F) incubação com catalase. * indica o teste t-Student entre Rmax para os quais $p < 0,05$ vs o CT correspondente. # indica o teste t-Student entre pD2 para os quais $p < 0,05$ vs o CT correspondente. N = 6–9. CT: controle; FR: ratos suplementados com frutose; PE: fenilefrina; E-: vasos sem endotélio.

Analogicamente ao intencionado com a remoção mecânica do endotélio para avaliar a sua participação durante a contração exercida pela fenilefrina, alternar vasos nos quais o TAP foi ou não removido e confrontar a resposta à fenilefrina de cada conjunto nos substancia acerca da influência desse na modulação da resposta contrátil. No entanto o desfecho não é tão previsível quanto o resultante da remoção endotelial que sabidamente leva a um aumento na resposta contrátil.

O TAP em machos controle mostrou ter uma ação contrátil, como podemos observar pelo aumento do R_{max} , em relação aos anéis sem TAP (figura 12D, tabela 1). Contudo, após suplementação dietética com frutose, ele assume um marcante papel anticontrátil, figurado pela redução da sensibilidade ao agonista e ausência de diferença no R_{max} (tabela 2, figura 12B). Além de mudar o perfil de ação vascular, a intensidade da modulação é muito maior nos machos tratados com frutose durante 4 dias que apresentam maior área abaixo da curva que fica explícita no gráfico %dAUC (figura 12C).

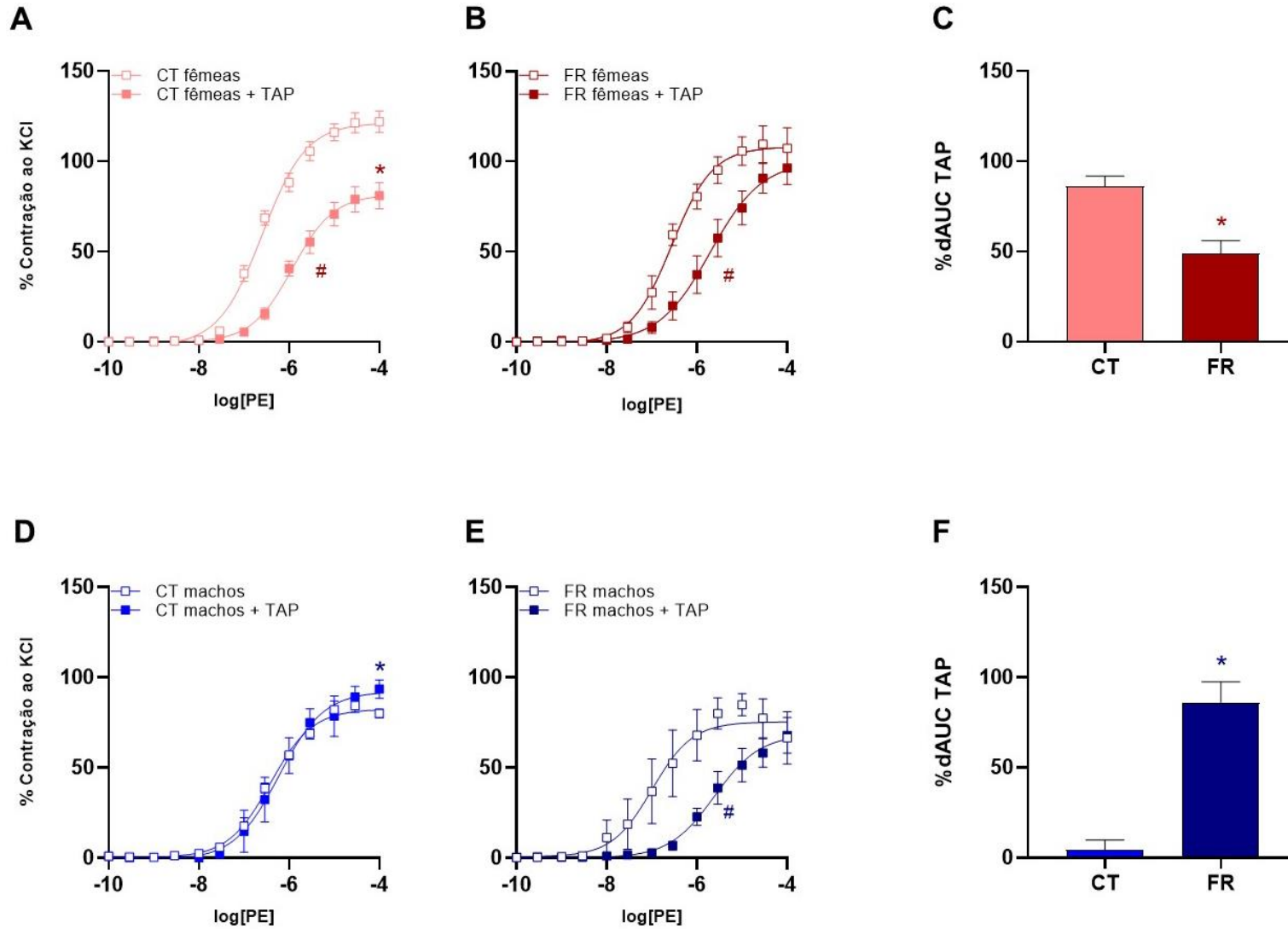


Figura 12. Curvas concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta com e sem tecido adiposo perivascular (TAP) de fêmeas suplementados com frutose (B) e seus respectivos controles (A); e de machos suplementados com frutose (E) e seus respectivos controles (D). Porcentagem da diferença das áreas abaixo das curvas (%dAUC) correspondentes (C) às fêmeas e (F) aos machos. * indica ou o teste t-Student entre Rmax para os quais p < 0,05 vs o CT correspondente, ou indica o teste t-Student entre as %dAUC para as quais p < 0,05. # indica o teste t-Student entre pD2 para os quais p < 0,05 vs o CT correspondente. N = 6—9. CT: controle; FR: ratos suplementados com frutose; PE: fenilefrina; TAP: tecido adiposo perivascular.

4.3.2. Reatividade vascular em fêmeas

As fêmeas apresentaram um fenótipo vascular diferente dos machos e o efeito vascular promovido pela frutose naquele grupo é tamanho que impôs seu perfil quando machos e fêmeas compuseram um único grupo de análise.

A reatividade vascular à fenilefrina de anéis de aorta, sem TAP e isoladas de fêmeas foi menor no grupo suplementado com frutose (figura 13A), como revela o menor R_{max} do grupo frutose (tabela 2). Isso foi resultado de uma maior ação vasodilatadora do endotélio, evidenciada durante os protocolos de remoção do mesmo, nos quais constatamos maior magnitude da modulação no grupo frutose segundo os dados da %dAUC complementares à figura 13B.

O aumento da modulação endotelial nas fêmeas suplementadas com frutose não parece ser decorrente do aumento da biodisponibilidade de NO, pois a incubação com L-NAME mostra que o agente tem a mesma parcela de contribuição entre as fêmeas tratadas ou não com frutose por 4 dias (figura 13C) já que não houve diferença quando analisamos %dAUC.

A maior modulação endotelial na aorta de fêmeas tratadas com frutose também não foi resultado de uma menor produção de ânion superóxido pela NADPHoxidase, haja vista que a %dAUC das curvas concentração-resposta à fenilefrina após a incubação com apocinina mostrou a mesma magnitude de efeito em fêmeas suplementadas ou controles (figura 13D). Tampouco foi resultado do aumento das vias antioxidantes analisadas, já que a incubação do DETCA (figura 13E) e a incubação da catalase (figura 13F) não resultaram em diferenças de magnitude da área abaixo da curva entre as fêmeas suplementadas ou não com frutose por 4 dias.

Nas fêmeas, a ação anticontrátil do TAP modulando o agonismo α -1 adrenérgico é marcante no grupo controle (figura 12A), no qual a presença do TAP reduz tanto a sensibilidade quanto a resposta máxima à fenilefrina (tabela 2). Após o tratamento com frutose, o TAP da aorta de fêmeas conserva sua influência anticontrátil (figura 12B), pois ainda reduz a sensibilidade ao agonista, mas a magnitude da sua modulação é reduzida. Isso fica claro na figura 12C, que mostra uma menor %dAUC nos anéis com TAP oriundos de fêmeas suplementadas com frutose quando comparados aos anéis de fêmeas controles.

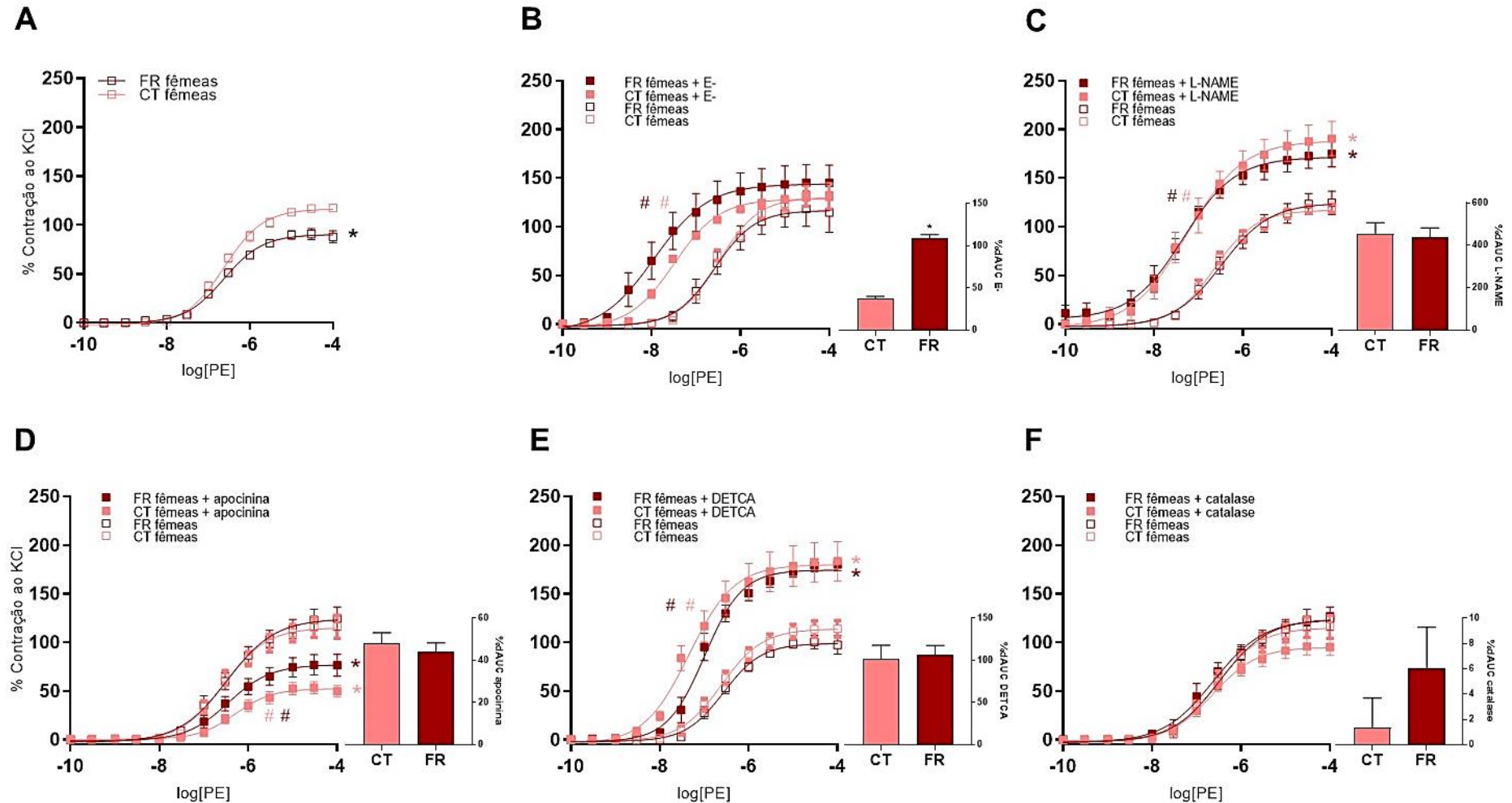


Figura 13. Curvas concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta de fêmeas suplementadas com frutose e seus respectivos controles (A) em condições basais, após (B) a remoção do endotélio vascular, (C) incubação com L-NAME, (D) incubação com apocinina, (E) incubação com DETCA e (F) incubação com catalase, além da porcentagem da diferença das áreas abaixo das curvas (%dAUC) correspondentes às curvas adjacentes. * indica ou o teste t-Student entre Rmax para os quais $p < 0,05$ vs o CT correspondente, ou indica o teste t-Student entre as %dAUC para as quais $p < 0,05$. # indica o teste t-Student entre pD2 para os quais $p < 0,05$ vs o CT correspondente. N = 6—9. CT: controle; FR: ratos suplementados com frutose; PE: fenilefrina; E-: vasos sem endotélio.

5. DISCUSSÃO

Nossos dados mostram que ratos de ambos os sexos, quando suplementados por 4 dias com solução frutose 10% (p.v.), apresentam diminuição da reatividade vascular à fenilefrina. Todavia, os mecanismos que envolvem esse fenótipo são diferentes entre os sexos. A frutose promove maior modulação endotelial em aortas de ratas durante o agonismo adrenérgico. Já nos ratos, apesar de não alterar a modulação endotelial, ela aumenta a modulação do TAP sobre a aorta e a reverte para um padrão anticontratil, que não era observado sem a influência da frutose.

Em fêmeas, essas alterações surgem antecipadamente ao aumento da colesterolemia, trigliceridemia e glicemia, ou de sinais de resistência à insulina ou tolerância à glicose. Já nos machos, as alterações vasculares são acompanhadas por elevação da trigliceridemia e um discreto aumento na tolerância à glicose em apenas 4 dias de suplementação, apesar de nenhuma alteração na glicemia de jejum. Percebemos que para as fêmeas o modelo de tratamento utilizado foi extremamente bem-sucedido, pois nos permitiu estudar as alterações vasculares promovidas pela frutose independente de alterações nos parâmetros metabólicos séricos.

A suplementação dietética com frutose é uma “ferramenta” de pesquisa amplamente utilizada para a indução de sintomas semelhantes aos da síndrome metabólica e, conseqüentemente, para estudos desse desvio metabólico sobre diversos sistemas, incluindo o vascular. Sendo assim, nosso trabalho vem como uma resposta para a emergente necessidade de determinar se a disfunção vascular observada em modelos de uso crônico de frutose precede os sinais da síndrome metabólica, comprometendo esse já estabelecido modelo.

Nossos dados parecem se encaixar na linha temporal do tratamento com frutose como um momento de adaptação vascular. Além disso, demonstra que a ação vascular promovida pela frutose é diferente entre os sexos e pode se manifestar independentemente das alterações similares a síndrome metabólica induzidas pelo tratamento crônico com frutose. No estudo de Almenara, 2015, os autores encontraram aumento da reatividade à fenilefrina após a incubação de 40mM de frutose por 30 minutos (ALMENARA et al., 2015). De poucos trabalhos agudos, a literatura salta até projetos de exposição crônica: 4, 6, 8, 12 semanas de exposição ao açúcar (EL-BASSOSSY; DSOKEY; FAHMY, 2014; EL-

BASSOSSY HM, DSOKEY N, 2014; JALAL et al., 2010; PEKTAŞ; SADI; AKAR, 2015; PEREDO et al., 2006; PUYÓ et al., 2009; SOUSA et al., 2017; TAKAGAWA et al., 2001). Curiosamente, os resultados dos estudos crônicos de suplementação com frutose acerca da reatividade vascular de anéis de aorta vão ao encontro do trabalho de Almenara (onde não há alterações metabólicas), demonstrando um panorama de hiperreatividade vascular a catecolaminas que parece decorrer do aumento do estresse oxidativo e diminuição da ação do NO.

Apesar da suplementação com frutose ser um modelo muito utilizado em estudos experimentais, permanecemos sem respostas acerca de se a frutose afeta a reatividade vascular *per si*, já que o modelo agudo não mimetiza o consumo oral e o modelo crônico impossibilita a desvinculação das alterações metabólicas sabidamente atuantes sobre o tecido vascular. Com 4 dias de exposição à frutose via água de beber conseguimos avaliar a reatividade vascular sem o cenário similar ao da síndrome metabólica consolidado pelo uso prolongado de frutose além de identificar diferenças vasculares e bioquímicas entre machos e fêmeas.

5.1. Suplementação com frutose promove aumento precoce da trigliceridemia em machos, mas não em fêmeas

A literatura mostra que o tratamento com solução de frutose 10% ou mesmo a introdução de altas doses do açúcar na dieta aumenta os níveis séricos de triglicédeos em apenas duas semanas (DAI; MCNEILL, 1995; HWANG et al., 1987). A hipertrigliceridemia parece se estender, a partir de então, enquanto durar o tempo de tratamento, se mantendo entre os achados de estudos que chegam a 24 semanas de exposição (PEKTAŞ; SADI; AKAR, 2015). Contudo, cessada a exposição, as alterações metabólicas tendem a se normalizar (DAI; MCNEILL, 1995).

Fica claro que as alterações metabólicas causadas pela frutose não são uma novidade trazida por nosso trabalho, mas, observar alterações na trigliceridemia em apenas 4 dias de exposição demonstra o alto impacto da frutose sobre o metabolismo de lipídeos em machos, que se mostraram mais susceptíveis que as fêmeas à essas alterações. Esses resultados mostram que as alterações metabólicas não são reflexo apenas do consumo crônico do açúcar e ressalta a suscetibilidade a esse fenótipo ligada ao sexo (BANTLE et al., 2000).

Tanto o metabolismo da frutose quanto o da glicose convergem ao mesmo ponto de formação de metabólitos de três carbonos que podem ser consumidos catabolicamente ou

serem desviados para formação de lipídios (TRAN; YUEN; MCNEILL, 2009). A etapa limitante do metabolismo da glicose é dirigida pela enzima fosfofrutoquinase, que catalisa a fosforilação da frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bifosfato, e é retrorregulada negativamente por metabólitos como o citrato e ATP, evitando o acúmulo de gliceraldeído, fosfato de di-hidroxiacetona e gliceraldeído-3-fosfato (figura 1).

O metabolismo da frutose não está sujeito à etapa limitada pela fosfofrutoquinase, o que faz do seu consumo aumentado uma via descontrolada de produção de lipídeos (TRAN; YUEN; MCNEILL, 2009), que podem, por si só, causar resistência à insulina e disfunção endotelial via mecanismos que englobam o estresse oxidativo e a diminuição de agentes vasodilatadores (KIM et al., 2012b).

Fala-se em resistência à insulina quando a insulinemia normal ou elevada produz uma resposta biológica atenuada no que tange ao tráfego celular de glicose (CEFALU, 2001; REAVEN, 2004). Como a frutose compartilha de algumas vias do metabolismo da glicose, podendo até ser convertida em tal, ela tem a capacidade de alterar o trânsito transcelular normal da glicose, contribuindo assim para a resistência à insulina.

A insulina é um hormônio polipeptídico sintetizado nas células β pancreáticas das ilhotas de Langerhans. O hormônio controla a glicemia trabalhando antagonicamente ao glucagon: facilita a absorção de glicose pelos tecidos, regula o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas.

Genericamente, a administração de glicose promove uma liberação bifásica de insulina. A primeira fase de liberação é rápida, com pico entre 3 e 5 minutos e com duração de cerca de 10 minutos. A segunda fase de secreção começa cerca de 10 minutos depois da detecção celular da alteração dos níveis séricos de glicose e perdura enquanto houver hiperglicemia. A primeira fase representa a liberação imediata do conteúdo de insulina estocado nos grânulos secretórios, enquanto a segunda fase representa o percentual aditivo de secreção de insulina recentemente sintetizada.

As ações da insulina são mediadas pela sua ligação ao seu receptor membranar nas células-alvo. A ligação da insulina ao receptor confere a ele a atividade de quinase que fosforila determinado resíduo de tirosina do substrato intracelular denominado “*insulin responsive substrates*” (IRS). Quando fosforilados, os IRS ligam-se, por exemplo, à fosfatidilinositol-3-quinase, para promover os efeitos metabólicos da insulina que envolvem a captação de glicose, ativação da síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, inibição da lipólise e controle da gliconeogênese (figura 14).

O aumento sérico e conseqüente aumento da concentração intracelular de lipídeos e seus metabólitos leva ao aumento na relação intramitocondrial de acetil CoA/CoA e NADH/NAD⁺, logo, à inativação da piruvato desidrogenase. Isso, por sua vez, causa o aumento da concentração intracelular de citrato, que leva à inibição da fosfofrutocinase, acumulando glicose-6-fosfato, que, inibe a atividade da hexoquinase II, resultando em aumento da concentração intracelular de glicose e diminuição da sua captação (SHULMAN, 2000). Esse cenário metabólico também altera a sinalização do receptor de insulina por diminuir os níveis de fosforilação de IRS (DRESNER et al., 1999; RODEN et al., 1996).

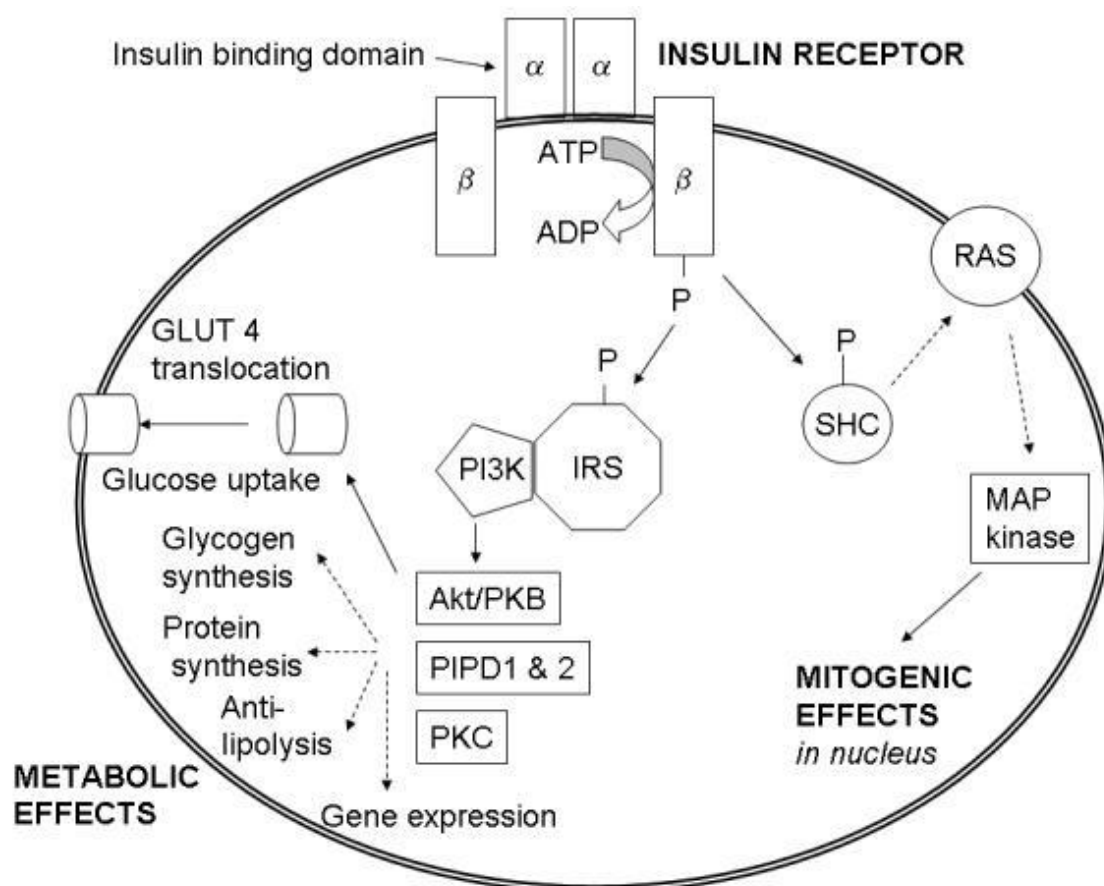


Figura 14. Representação esquemática das vias de sinalização da insulina e seus desfechos sobre o metabolismo energético e estrutural. Akt/PKB: proteína cinase B; ATP: trifosfato de adenosina; IRS: substrato do receptor de insulina; ADP: adenosina difosfato; MAP quinase: proteína cinase ativada por mitógeno; PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase; PIPD1 & 2: proteas quinases dependentes de fosfatidilinositol 1 e 2 políptido insulinotrico dependente de glicose; PKC: proteína cinase C; RAS: proteína de sarcoma de rato; GLUT 4: proteína de transporte de glicose 4; SHC: proteína adaptadora com homologia de src. Adaptação a partir de WILCOX, 2005.

A redução da fosforilação de IRS e a cascata de feedbacks metabólicos negativos combinados contribuem para a resistência à insulina induzida pelo tratamento com frutose. Após 4 dias de tratamento com frutose os machos suplementados apresentaram um pico de glicemia maior que os controles no teste IPGTT. Isso pode ser indício de uma discreta

resistência à insulina que se manifesta por diminuição da tolerância à glicose nos ratos que apresentaram elevação da trigliceridemia.

Até o momento, foram poucos os estudos que se dispuseram a avaliar se a ingestão de frutose repercute em alterações metabólicas distintas entre os sexos. Pektaş, em 2015, demonstrou que 24 semanas de tratamento com solução frutose a 10% via água de beber aumenta os níveis plasmáticos de insulina, triglicédeos e VLDL em ratos Wistar de ambos os sexos (PEKTAŞ; SADI; AKAR, 2015). Após 4 dias de tratamento, nas mesmas condições experimentais, observamos em nosso estudo aumento nos níveis séricos de triglicédeos apenas nos machos.

A frutose consumida na dieta por meio da ingestão de uma fruta, refrigerantes ou um bolo, bem como a que foi ingerida pelos ratos durante nosso protocolo experimental, alimenta a via frutolítica que, por sua vez, alimenta a via glicolítica, já que a frutólise origina o gliceraldeído e o fosfato de di-hidroxiacetona e ambos podem ser convertidos à gliceraldeído-3-fosfato (figura 1). Subsequentemente, o G-3-P originará Acetil-CoA que poderá ser usado na cetogênese, no ciclo de Krebs ou na lipogênese *de novo*, ou seja, na síntese de lipídeos a partir de hidrocarbonetos (SANDERS; GRIFFIN, 2016). Nessa via, o fosfato de di-hidroxiacetona é oxidado à glicerol 3-fosfato e sucessivamente acetilado pela ação de acil transferases, desfosforilado e dá origem ao diacilglicerol que servirá de base para a formação dos triglicédeos após uma terceira acetilação. Os triglicédeos formados podem ser estocados nos hepatócitos ou podem ser “embalados” em lipoproteínas de muito baixa densidade e exportadas do fígado (SANDERS; GRIFFIN, 2016). O aumento da atividade dessa via é a base metabólica da hipertrigliceridemia induzida por carboidratos (PARKS, 2002).

Tran, em 2010, usando a metodologia de isótopos estáveis, avaliou em homens e mulheres o destino da frutose durante seu consumo agudo (medições realizadas a cada 30 minutos, durante 8 horas). Constatou que as mulheres tinham, relativamente, menores alterações nos níveis plasmáticos de insulina e taxas de lipogênese *de novo* praticamente inalteradas pela frutose, ao contrário dos homens, que apresentaram elevação desses parâmetros. Além disso, os homens apresentaram redução na taxa de oxidação de lipídeos (TRAN et al., 2010). Logo, os dados de Tran corroboram nossos achados e servem de base para justificar a elevação precoce na concentração sérica de triglicédeos observada nos machos após os 4 dias de suplementação com frutose, e a ausência delas em fêmeas. Juntos, esses dados reforçam o perfil tempo-dependente e sexo-dependente nas alterações metabólicas promovidas pela sobrecarga de frutose.

Embora nossos dados não sejam suficientes para definir os mecanismos responsáveis pela diferença nos níveis plasmáticos de triglicerídeos observada entre os sexos, podemos especular que, ou existem mecanismos que facilitam as alterações metabólicas em machos ou existem mecanismos que previnem as fêmeas dessas alterações. Pensando a nível hormonal, apesar de envolvidos com o desenvolvimento da hipertensão durante a exposição à frutose, os andrógenos não parecem operar de maneira a facilitar tais alterações metabólicas, já que a depleção artificial da testosterona em machos suplementados com frutose previne esse grupo do desenvolvimento de hipertensão, apesar de continuarem hiperlipêmicos e resistentes à insulina (SONG et al., 2004).

Já a ação do estrogênio sobre o fígado, o tecido adiposo e os músculos, no que tange o metabolismo, facilitando a recaptção de glicose e a deposição de glicogênio e lipídeos pode justificar esse fenótipo (GODSLAND, 1996). Isso também nos permite racionalizar achados como os de Macdonald em 1966, que mostrou que a “proteção” metabólica está presente em mulheres apenas antes da menopausa (MACDONALD, 1966), ou os de Galipeau em 2002, que mostrou que a ovariectomia de roedoras elimina as diferenças entre os sexos no que diz respeito às alterações metabólicas induzidas pela suplementação com frutose. Assim, os efeitos do estrogênio sobre o metabolismo podem explicar a razão pela qual não encontramos alterações nos níveis séricos de triglicerídeos e na tolerância à glicose, em contraposição ao que foi observado em machos.

Apesar de envolvidos nas alterações vasculares promovidas pelo consumo crônico de frutose, colesterol total, ácido úrico e ácido lático não tiveram suas concentrações alteradas como reflexo da suplementação por 4 dias. O resultado foi o mesmo para machos e fêmeas.

5.2. Suplementação com frutose altera diferentemente a função vascular em machos e em fêmeas

A suplementação com solução de frutose 10% p.v. por 4 dias diminui a resposta vascular à fenilefrina em machos e em fêmeas, mas por mecanismos diferentes. Nas fêmeas, a menor responsividade está ligada a fatores endoteliais não dependentes de NO e nos machos a modulação passa a ser dependente do tecido adiposo perivascular e não se relacionada à modulação endotelial na ausência do TAP.

5.2.1. A vasomodulação endotelial em fêmeas é aumentada pela suplementação com frutose.

A fenilefrina é um agonista de receptores adrenérgicos que, via o subtipo α -1, exerce sua ação vasoconstrictora na aorta. Esses receptores estão ancorados à membrana plasmática das células musculares lisas e são acoplados à proteína Gq que, quando ativada pela ligação do agonista ao receptor, cliva o fosfatodilinositol bifosfato (PIP2) em inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 age em receptores presentes na membrana do retículo sarcoplasmático, estimulando a liberação de Ca^{2+} para o sarcoplasma. Enquanto isso, o DAG ativa a proteína quinase C (PKC) que, por sua vez, fosforila canais para cálcio no sarcolema, contribuindo para o aumento da concentração intracelular de cálcio. O aumento do cálcio sarcoplasmático favorece a formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina que ativa a quinase da cadeia leve da miosina e essa catalisa a fosforilação da cadeia leve da miosina. A fosforilação dessa, ativa a ATPase miosínica, que permite a formação das pontes cruzadas entre actina e miosina promovendo, assim, a contração do músculo liso.

O endotélio, reconhecidamente, é o maior regulador da função vascular em grandes vasos. Essa regulação se dá por meio da liberação de agentes vasodilatadores e vasoconstritores (GAO et al., 2005), dentre os quais se destacam, respectivamente, o óxido nítrico e o ânion superóxido.

Fisiologicamente e durante os experimentos de reatividade vascular, o endotélio modula a contração induzida pela fenilefrina contrapondo a ela agentes vasodilatadores. Tratando-se de aorta, a ativação de receptores α -2 adrenérgicos acoplados à proteína Gi, no endotélio, abrem canais para potássio permitindo seu extravasamento. Isso gera um gradiente negativo no citoplasma celular que favorece a entrada de cálcio (cátion) e consequente ativação da eNOS e aumento da biodisponibilidade de NO (VANHOUTTE, 2001). Sendo assim, a remoção do endotélio resulta em aumento da reatividade vascular à fenilefrina, sendo a magnitude desse aumento proporcional a ação anticontrátil promovida pelo mesmo.

Em machos, a magnitude do aumento gerado com a remoção do endotélio foi a mesma entre os vasos de animais suplementados ou não com frutose. Diferentemente, nas fêmeas, a %dAUC revela um marcante aumento na magnitude da contração após a remoção do endotélio de anéis de aorta de ratas suplementadas com a frutose durante 4 dias. Lembrando que, quando os experimentos foram realizados sem a influência do TAP, os machos não apresentaram diferença na resposta contrátil à PE, já as fêmeas tiveram uma marcante redução, que nitidamente é dependente da modulação endotelial.

O aumento da modulação endotelial está constantemente relacionado ao aumento da biodisponibilidade de seu principal agente vasodilatador, o óxido nítrico. Na via clássica, a produção de NO é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase a partir da L-arginina e do oxigênio molecular. O NO produzido no endotélio se difunde para o músculo liso vascular, onde provoca relaxamento por mecanismos tais como a diminuição citosólica de cálcio por estimulação da receptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático e a extrusão sarcolemal de cálcio, redução da afinidade das proteínas contráteis pelos íons cálcio e hiperpolarização muscular por abertura de canais para potássio.

A biodisponibilidade de NO pode ser indiretamente aferida por meio da inibição da NOS com a incubação do fármaco L-NAME durante as curvas concentração-resposta à fenilefrina. Similarmente à remoção do endotélio, o uso do L-NAME promove aumento da contração vascular, sendo a magnitude do aumento proporcional à biodisponibilidade de NO. Nos machos e nas fêmeas a inibição da NOS teve a mesma magnitude de efeito quando comparados animais controles com os tratados com frutose. Logo, podemos concluir que a frutose não promove alterações dessa via e que a exacerbada modulação endotelial observada nas fêmeas suplementadas com frutose é independente de NO, pelo menos do que é produzido enzimaticamente durante o estresse farmacológico contrátil.

Antagonicamente ao NO, aparecerem as EROS como os agentes pró-contráteis de destaque. As EROS são sintetizadas na célula principalmente como coproduto do metabolismo celular, agindo como mensageiros secundários em diversos processos fisiológicos como proliferação, diferenciação e envelhecimento celular, além de estarem envolvidas em processos de defesa do hospedeiro e de reparo tecidual (PANTH; PAUDEL; PARAJULI, 2016).

Apesar de indispensáveis à função vascular, o endotélio é extremamente sensível às EROS. Inclusive, se sabe que as EROs contribuem para a disfunção endotelial (WATTANAPITAYAKUL; BAUER, 2001). Portanto, é indispensável o equilíbrio entre a produção e degradação das espécies reativas de oxigênio (GRIENDLING; SORESCU; USHIO-FUKAI, 2000). No endotélio, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase (NADPHoxidase) promove a redução univalente do oxigênio molecular, o que gera ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (KIM et al., 2012b). O $O_2^{\cdot-}$ pode ser reduzido a H_2O_2 e O_2 pela superóxido dismutase, mas sua reação com o NO ocorre mais rapidamente levando à produção de OONO \cdot .

Mesmo que por meio da incubação do L-NAME não tenhamos encontrado aumento da biodisponibilidade de NO resultante de síntese, o desequilíbrio das vias descritas acima

pode repercutir em aumento ou diminuição de sua disponibilidade. Logo, a diminuição de EROS, seja por menor atividade da NADPH oxidase ou maior atividade líquida da SOD ou catalase, preservaria o NO sintetizado no endotélio durante a modulação da resposta a fenilefrina resultando em menor resposta contrátil (figura 14).

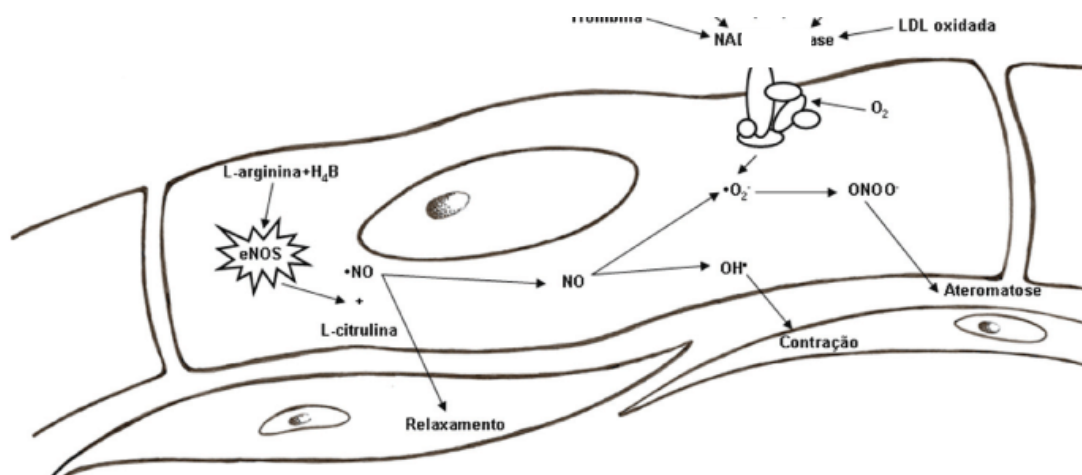


Figura 15. Relação entre óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, na qual um influencia a biodisponibilidade do outro. O óxido nítrico (NO) é produzido a partir da L-arginina pela ação do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) na presença de cofatores, principalmente a tetra-hidrobiopterina (H4B). O NO difunde-se para as células musculares lisas vasculares e ativa a guanilato ciclase, promovendo a vasodilatação mediada pelo GMP cíclico. O NO é também um radical livre e, quando produzido juntamente com o $O_2^{\cdot-}$, reage extremamente rápido para formar uma espécie pró-inflamatória altamente reativa e importante mediador da peroxidação de lipídios: o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$). Adaptação a partir de RABÊLO et al., 2010.

Logo, os machos não apresentam alterações na resposta à fenilefrina na ausência do TAP pois as principais vias modulatórias estão em equilíbrio. Quanto às fêmeas, as mesmas vias estão inalteradas, o que sugere que outro agente seja responsável pela modulação anticontrátil adicional exercida pelo endotélio após 4 dias de tratamento com frutose.

Com o curso do tratamento e cronificação da suplementação, a literatura mostra que o fenótipo observado em 4 dias deve mudar para aumento de reatividade à fenilefrina em ambos os sexos devido a disfunção endotelial causada pelo aumento da produção de EROS e redução da biodisponibilidade de NO. Nossos dados parecem se encaixar na linha temporal do tratamento com frutose como um momento de transição entre a hiperreatividade vascular observada durante a exposição *in vitro* à frutose e a crônica. Além disso, demonstra que a ação vascular promovida pela frutose é diferente entre os sexos e pode se manifestar independentemente das alterações bioquímicas similares à síndrome metabólica induzidas pelo tratamento crônico com frutose.

5.2.2. A suplementação com frutose muda o perfil contrátil do TAP em machos

O tecido adiposo é um conjunto complexo de nervos, capilares e diferentes tipos de células, incluindo adipócitos, macrófagos, células T, fibras de colágeno e fibroblastos (BROWN et al., 2014). A maioria dos vasos sanguíneos são circundados por tecido adiposo perivascular, que tem uma importante ação parácrina e endócrina (AGABITI-ROSEI et al., 2018), mas sua possível contribuição na modulação do tônus vascular tem sido negligenciada, pois ele é rotineiramente removido durante estudos com vasos isolados (GAO et al., 2005). De fato, nas nossas análises, nós também removemos o TAP enquanto analisávamos as alterações endoteliais promovidas pelo tratamento com frutose por 4 dias.

O primeiro estudo que avaliou a influência do TAP sobre a reatividade vascular à fenilefrina foi desenvolvido por Soltis e determinou que, por se tratar de uma região enriquecida de terminações noradrenérgicas, ocorria a recaptção do efetor pelos nervos no TAP, reduzindo a resposta vascular (SOLTIS; CASSIS, 1991). Diversos estudos posteriores já demonstraram que o TAP sintetiza e secreta inúmeras substâncias metabolicamente ativas, como adipocinas, quemoquinas; fatores similares a hormônios, tal como a leptina, a adiponectina e a resistina; ácidos graxos, além de agentes vasoativos por excelência, como o próprio NO e o H₂S (OUWENS et al., 2010). Ainda, Lohn mostrou que o TAP diminui a resposta vascular à angiotensina II e à serotonina e esse efeito parece ser mediado por um fator liberado pelo TAP que age sobre o vaso (LÖHN et al., 2002), somando informações ao achado de Soltis e demonstrando que ação modulatória do TAP não se restringe à contração induzida por catecolaminas.

As adipocinas, no que tange sua influência sobre o tônus vascular, podem desempenhar ações duais e o assunto é minuciosamente discutido por Maik Gollasch na revisão publicada em 2012 (GOLLASCH, 2012a). Um exemplo trazido é a leptina, que induz vasodilatação mediada pelo NO e EDHF ao passo que também é capaz de, indiretamente, promover vasoconstrição via ativação central do sistema nervoso simpático. O TNF- α também funciona como vasodilatador ou vasoconstritor, por mecanismos que envolvem o óxido nítrico, prostaglandina e ativação da NADPH oxidase (GOLLASCH, 2012b).

A presença do TAP durante nossos experimentos de reatividade à fenilefrina, em machos controle, contribuiu com um discreto aumento da resposta vascular ao agonista. Isso vai de encontro à literatura que trata o TAP como um agente anticontrátil em condições fisiológicas (BHATTACHARYA et al., 2013; MIAO; LI, 2012; VILLACORTA; CHANG, 2015). Como trazido no parágrafo anterior, isso pode ser justificado pela ação dual dos adipoderivados que, em nossos experimentos, parecem manifestar seu cunho constritor. O

mais interessante é que, no cenário de suplementação por 4 dias com frutose, a ação do TAP sobre os anéis de aorta é marcadamente vasodilatadora, mais uma vez contrariando a literatura, que mostra que durante o estresse metabólico, incluindo o tratamento crônico com frutose, o TAP perde sua ação vasculoprotetora (BUSSEY et al., 2016; OUWENS et al., 2010; REIFENBERGER et al., 2007). Entendemos que 4 dias de suplementação poderia não ter influência como têm as suplementações prolongadas, mas o esperado era ao menos uma ação inalterada do TAP.

Diferente do observado nos machos, a presença do TAP nos estudos de reatividade vascular dirigiu à menor resposta à fenilefrina nos anéis de ratas tratadas ou não com a frutose, indo ao encontro da literatura, já que observamos a referida ação anticontrátil atribuída ao TAP. No entanto, a menor %dAUC nas curvas com TAP no grupo fêmea tratado com frutose mostra que mantê-lo durante os protocolos não contribui aditivamente para a redução da reatividade já diminuída por influência do tratamento com frutose durante 4 dias que aumenta a modulação endotelial sobre a resposta à fenilefrina. Aplicando a interpretação analógica da incubação de drogas durante a reatividade e, sabendo que a diminuição da reatividade é dependente do endotélio, podemos supor que o endotélio está operando com efetores/vias de relaxamento similares àquelas estimuladas pelo TAP, logo, na sua presença, não há efeito aditivo, pois, as vias já estariam “saturadas”.

5.3. Relação entre as alterações bioquímicas e vasculares resultantes de 4 dias de suplementação de frutose

Os fatores que determinam a síndrome metabólica acompanham o rol de resultados de artigos com modelos de suplementação prolongados com frutose. A resistência à insulina, a hiperglicemia e a hipertrigliceridemia, integrantes desse rol, são usados para justificar a disfunção endotelial causada pelo aumento do estresse oxidativo via NADPHoxidase e diminuição da biodisponibilidade de NO (EL-BASSOSSY; DSOKEY; FAHMY, 2014; EL-BASSOSSY HM, DSOKEY N, 2014; JALAL et al., 2010; PEKTAŞ; SADI; AKAR, 2015; PEREDO et al., 2006; PUYÓ et al., 2009; SOUSA et al., 2017; TAKAGAWA et al., 2001).

Apesar da precoce elevação da concentração sérica de triglicérides e VLDL promovida pela frutose nos machos, nós constatamos que, durante os experimentos de reatividade vascular, nenhuma alteração pró ou anti-oxidante nas vias analisadas em machos e fêmeas ocorreu.

A estabilidade dessas vias não impediu que alterações vasculares ocorressem em aortas isoladas de fêmeas ou em aortas, com o TAP, em machos. Os ratos tiveram a

resposta à fenilefrina reduzida após 4 dias de suplementação com frutose, porém, por mecanismos diferentes. Fêmeas passaram a ter uma maior modulação endotelial e machos maior modulação do TAP. Podemos afirmar que a frutose tem ação independente das alterações metabólicas induzidas por sua suplementação crônica em aortas de fêmeas, mas não podemos dizer o mesmo para os machos.

Como já dito anteriormente, com o prolongamento da suplementação com frutose, a aorta assume um perfil hiperreativo à fenilefrina que contraria os nossos achados até aqui. Essa ambiguidade nos leva a supor que o que vemos acerca de reatividade vascular em trabalhos crônicos de exposição à frutose é, de certo, reflexo das alterações metabólicas infligidas pelo modelo, que suplantam os efeitos vasculares próprios do consumo esporádico de frutose.

6. CONCLUSÃO

Nossos dados determinam que o consumo de frutose por 4 dias altera a resposta vasoconstritora à fenilefrina em aortas. Demonstram também que os efeitos da frutose após 4 dias de suplementação são diferentes entre os sexos, recrutando o endotélio para sua ação sobre a aorta de fêmeas e o TAP no que diz respeito a redução de reatividade vascular observada nos machos. Ainda, os machos apresentaram-se mais suscetíveis do que as fêmeas às alterações metabólicas induzidas pelo consumo de frutose, apesar da glicemia de jejum não ser afetada em nenhum dos sexos.

Os resultados obtidos no presente trabalho, apesar de não conseguirem definir os mecanismos que justificam o aumento da modulação endotelial e do TAP, bem como aqueles que expliquem as diferenças entre os sexos, demonstra a importância dessas variáveis no que se refere às alterações vasculares induzidas pela suplementação com frutose e estimula novos estudos que explorarão as diferenças entre os sexos no que tange as mudanças na função vascular, tendo como foco a modulação endotelial e a participação do tecido adiposo perivascular nas alterações vasculares induzidas pela frutose.

7. REFERÊNCIAS

AGABITI-ROSEI, C. et al. Modulation of Vascular Reactivity by Perivascular Adipose Tissue (PVAT). **Current Hypertension Reports**, v. 20, n. 5, 2018.

ALMENARA, C. C. P. et al. In vitro fructose exposure overactivates NADPH oxidase and causes oxidative stress in the isolated rat aorta. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 29, n. 8, p. 2030–7, dez. 2015.

ANGELI, J. K. **Exposição aguda ao cádmio induz lesão endotelial em aorta de ratos: papel do estresse oxidativo, da angiotensina II e dos prostanóides da via da ciclooxigenase**. [s.l.] UFES, 2013.

ASSY, N. et al. Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors. **Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie**, v. 22, n. 10, p. 811–6, out. 2008.

BANTLE, J. P. et al. Effects of dietary fructose on plasma lipids in healthy subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 5, p. 1128–1134, 1 nov. 2000.

BHATTACHARYA, I. et al. Rictor in perivascular adipose tissue controls vascular function by regulating inflammatory molecule expression. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 33, n. 9, p. 2105–2111, 2013.

BISMUT, H.; HERS, H. G.; VAN SCHAFTINGEN, E. Conversion of fructose to glucose in the rabbit small intestine. A reappraisal of the direct pathway. **European journal of biochemistry**, v. 213, n. 2, p. 721–6, abr. 1993.

BOLOTINA, V. M. et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850–853, abr. 1994.

BRAY, G. A.; NIELSEN, S. J.; POPKIN, B. M. **Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity** **American Journal of Clinical Nutrition**, 2004.

BROWN, N. K. et al. Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 34, n. 8, p. 1621–30, ago. 2014.

BUSSEY, C. E. et al. Obesity-Related Perivascular Adipose Tissue Damage Is Reversed by Sustained Weight Loss in the Rat. 2016.

CALICETI, C. et al. Fructose Intake, Serum Uric Acid, and Cardiometabolic Disorders: A Critical Review. **Nutrients**, v. 9, n. 4, p. 395, 18 abr. 2017.

CEFALU, W. T. Insulin Resistance: Cellular and Clinical Concepts. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, n. 1, p. 13–26, 29 jan. 2001.

CHICCO, A. et al. Multiphasic metabolic changes in the heart of rats fed a sucrose-rich diet. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 26, p. 397–403, 1994.

DAI, S.; MCNEILL, J. H. Fructose-induced hypertension in rats is concentration- and duration-dependent. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 33, n. 2, p. 101–107, abr. 1995.

DORNAS, W. C. et al. Health Implications of High-Fructose Intake. v. 1, p. 729–737, 2015.

DOUARD, V.; FERRARIS, R. P. The role of fructose transporters in diseases linked to excessive fructose intake. **The Journal of physiology**, v. 591, p. 401–14, 2013.

DRESNER, A. et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 2, p. 253–259, 15 jan. 1999.

EL-BASSOSSY, H. M.; DSOKEY, N.; FAHMY, A. Characterization of vascular complications in experimental model of fructose-induced metabolic syndrome. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 00, n. 00, p. 1–8, 2014.

EL-BASSOSSY HM, DSOKEY N, F. A. Characterization of vascular complications in experimental model of fructose-induced metabolic syndrome. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 24, n. 8, p. 536–543, 2014.

EMMERSON, B. T. Effect of oral fructose on urate production. **Ann. rheum. Dis**, v. 33, p. 276–280, 1974.

EXPERT PANEL ON DETECTION, EVALUATION, AND TREATMENT OF HIGH BLOOD CHOLESTEROL IN ADULTS. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and

Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 285, n. 19, p. 2486–2497, 16 maio 2001.

FEINMAN, R. D.; FINE, E. J. Fructose in perspective. **Nutrition & metabolism**, v. 10, p. 45, 2013.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. EDHF: an update. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 117, n. 4, p. 139–155, 2009.

FERON, O. et al. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 6, p. 897–905, 15 mar. 1999.

FOX, I. H.; KELLEY, W. N. Studies on the mechanism of fructose-induced hyperuricemia in man. **Metabolism**, v. 21, n. 8, p. 713–721, 1972.

FRÖLICH, J. C.; FÖRSTERMANN, U. Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. **Advances in prostaglandin, thromboxane, and leukotriene research**, v. 19, p. 211–5, 1989.

GAO, Y.-J. et al. Perivascular adipose tissue modulates vascular function in the human internal thoracic artery. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 130, n. 4, p. 1130–1136, 1 out. 2005.

GBD 2013 MORTALITY AND CAUSES OF DEATH COLLABORATORS, I. FOR H. M. AND et al. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet (London, England)**, v. 385, n. 9963, p. 117–71, jan. 2015.

GODSLAND, I. F. The influence of female sex steroids on glucose metabolism and insulin action. **Journal of internal medicine. Supplement**, v. 738, p. 1–60, 1996.

GOLLASCH, M. Vasodilator signals from perivascular adipose tissue. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 3, p. 633–642, 2012a.

GOLLASCH, M. Vasodilator signals from perivascular adipose tissue. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 3, p. 633–642, fev. 2012b.

GRIENDLING, K. K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circulation research**, v. 86, n. 5, p. 494–501, mar. 2000.

HANOVER, L. M.; WHITE, J. S. Manufacturing, composition, and applications of fructose. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 58, n. 5 SUPPL., 1993.

HEDEN, T. D. et al. Moderate amounts of fructose- or glucose-sweetened beverages do not differentially alter metabolic health in male and female adolescents. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 100, n. 3, p. 796–805, 1 set. 2014.

HWANG, I. S. et al. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. **Hypertension**, v. 10, p. 512–516, 1987.

ISHIMOTO, T. et al. **Opposing effects of fructokinase C and A isoforms on fructose-induced metabolic syndrome in mice** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012.

JALAL, D. I. et al. Increased fructose associates with elevated blood pressure. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 21, p. 1543–1549, 2010.

JOHNSON, R. J. et al. Sugar, Uric Acid, and the Etiology of Diabetes and Obesity. **Diabetes**, v. 62, n. 10, p. 3307–3315, 1 out. 2013.

KIM, J. et al. Reciprocal Relationships Between Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction. **Circulation**, v. 113, n. 15, p. 1888–1904, 18 abr. 2006.

KIM, J. et al. Role of lipotoxicity in endothelial dysfunction. **Heart failure clinics**, v. 8, n. 4, p. 589–607, out. 2012a.

KIM, J. et al. Role of lipotoxicity in endothelial dysfunction. **Heart failure clinics**, v. 8, n. 4, p. 589–607, out. 2012b.

KLEIN, A.; KIAT, H. The mechanisms underlying fructose-induced hypertension: a review. **Journal of hypertension**, v. 33, n. 5, p. 912–920, 2015.

LE, K.-A. et al. Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 6, p. 1760–1765, jun. 2009.

LÊ, K.-A. et al. A 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. **The American journal of clinical nutrition**, v. 84, n. 6, p. 1374–9, dez. 2006.

LÖHN, M. et al. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. **The FASEB**

Journal, v. 16, n. 9, p. 1057–1063, jul. 2002.

MACDONALD, I. Influence of Fructose and Glucose on Serum Lipid Levels in Men and Pre- and Postmenopausal Women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 18, n. 5, p. 369–372, 1 maio 1966.

MADERO, M. et al. Dietary fructose and hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 13, p. 29–35, 2011.

MCTIC. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_Normativa_CONCEA_n_39_de_20062018.html>. Acesso em: 8 jun. 2019.

MIAO, C. Y.; LI, Z. Y. The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 3, p. 643–658, 2012.

MONCADA, S. et al. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. **Thrombosis Research**, v. 11, n. 3, p. 323–344, 1977.

MORENO, J. A; HONG, E. A single oral dose of fructose induces some features of metabolic syndrome in rats: Role of oxidative stress. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD**, 2012.

MOSCA, L.; BARRETT-CONNOR, E.; WENGER, N. K. Sex/gender differences in cardiovascular disease prevention: what a difference a decade makes. **Circulation**, v. 124, n. 19, p. 2145–54, 8 nov. 2011.

MOZAFFARIAN, D. et al. **AHA Statistical Update Heart Disease and Stroke Statistics — 2016 Update A Report From the American Heart Association WRITING GROUP MEMBERS.** [s.l: s.n.].

NOVELLA, S. et al. Regulatory Mechanisms of Estrogen on Vascular Ageing. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, p. 4859082, 2019.

Ouwens, D. M. et al. The role of epicardial and perivascular adipose tissue in the pathophysiology of cardiovascular disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 9, p. 2223–2234, set. 2010.

Ouyang, X. et al. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 48, n. 6, p. 993–999, jun. 2008.

PANTH, N.; PAUDEL, K. R.; PARAJULI, K. Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease. **Advances in medicine**, v. 2016, p. 9152732, 2016.

PARKS, E. J. Dietary carbohydrate's effects on lipogenesis and the relationship of lipogenesis to blood insulin and glucose concentrations. **British Journal of Nutrition**, v. 87, n. S2, p. S247–S253, 9 maio 2002.

PARKS, E. J. et al. Dietary Sugars Stimulate Fatty Acid Synthesis in Adults 1–3. **The Journal of nutrition**, n. February, p. 1039–1046, 2008.

PEKTAŞ, M. B.; SADI, G.; AKAR, F. Long-Term Dietary Fructose Causes Gender-Different Metabolic and Vascular Dysfunction in Rats: Modulatory Effects of Resveratrol. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 1407–1420, 2015.

PEREDO, H. A. et al. Oral treatment and in vitro incubation with fructose modify vascular prostanoid production in the rat. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**, v. 26, n. 1, p. 15–20, jan. 2006.

PETERS, S. A. E.; MUNTNER, P.; WOODWARD, M. Sex Differences in the Prevalence of, and Trends in, Cardiovascular Risk Factors, Treatment, and Control in the United States, 2001 to 2016. **Circulation**, v. 139, n. 8, p. 1025–1035, 19 fev. 2019.

PETERSEN, K. F. et al. Stimulating effects of low-dose fructose on insulin-stimulated hepatic glycogen synthesis in humans. **Diabetes**, v. 50, n. 6, p. 1263–8, jun. 2001.

PUYÓ, A. M. et al. Time course of vascular prostanoid production in the fructose-hypertensive rat. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**, v. 29, n. 3, p. 135–139, 2009.

RABÊLO, L. A. et al. Desbalanço redox: NADPH oxidase como um alvo terapêutico no manejo cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 5, p. 684–693, maio 2010.

REAVEN, G. The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 33, n. 2, p. 283–303, jun. 2004.

REIFENBERGER, M. S. et al. Perivascular fat alters reactivity of coronary artery: Effects of diet and exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 39, n. 12, p. 2125–2134, 2007.

RODEN, M. et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans.

Journal of Clinical Investigation, v. 97, n. 12, p. 2859–2865, 15 jun. 1996.

RUBANYI, G. M.; VANHOUTTE, P. M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. **The American journal of physiology**, v. 250, n. 5 Pt 2, p. H822-7, maio 1986.

SANDERS, F. W. B.; GRIFFIN, J. L. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 91, n. 2, p. 452–68, maio 2016.

SCHAEFER, E. J.; GLEASON, J. A.; DANSINGER, M. L. Dietary Fructose and Glucose Differentially Affect Lipid and Glucose Homeostasis. **Journal of Nutrition**, v. 139, n. 6, p. 1257S-1262S, jun. 2009.

SHULMAN, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 2, p. 171–176, 15 jul. 2000.

SKEGGS, L. T. et al. The purification of hypertensin I. **The Journal of experimental medicine**, v. 100, n. 4, p. 363–70, out. 1954.

SOLTIS, E. E.; CASSIS, L. A. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. **Clinical and experimental hypertension. Part A, Theory and practice**, v. 13, n. 2, p. 277–96, 1991.

SONG, D. et al. Androgens Are Necessary for the Development of Fructose-Induced Hypertension. **Hypertension**, v. 43, n. 3, p. 667–672, mar. 2004.

SOUSA, G. J. et al. Fructose intake exacerbates the contractile response elicited by norepinephrine in mesenteric vascular bed of rats via increased endothelial prostanoids. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 48, p. 21–28, 2017.

SUN, S. Z.; EMPIE, M. W. **Fructose metabolism in humans -- what isotopic tracer studies tell us** *Nutrition & Metabolism*, 2012.

SWARBRICK, M. M. et al. Consumption of fructose-sweetened beverages for 10 weeks increases postprandial triacylglycerol and apolipoprotein-B concentrations in overweight and obese women. **The British journal of nutrition**, v. 100, n. 5, p. 947–52, 2008.

TAKAGAWA, Y. et al. Long-term fructose feeding impairs vascular relaxation in rat mesenteric arteries. **American Journal of Hypertension**, v. 14, p. 811–817, 2001.

TAYLOR, S. G.; WESTON, A. H. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. **Trends in pharmacological sciences**, v. 9, n. 8, p. 272–4, ago. 1988.

TEFF, K. L. et al. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2963–72, jun. 2004.

TEFF, K. L. et al. Endocrine and metabolic effects of consuming fructose- and glucose-sweetened beverages with meals in obese men and women: Influence of insulin resistance on plasma triglyceride responses. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 5, p. 1562–1569, 2009.

THORENS, B.; MUECKLER, M. Glucose transporters in the 21st Century. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 298, n. 2, p. E141–E145, fev. 2010.

TRAN, C. et al. Sex differences in lipid and glucose kinetics after ingestion of an acute oral fructose load. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. 8, p. 1139–1147, 28 out. 2010.

TRAN, L. T.; YUEN, V. G.; MCNEILL, J. H. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 332, n. 1–2, p. 145–159, 18 dez. 2009.

TURNER, J. L. et al. Effect of dietary fructose on triglyceride transport and glucoregulatory hormones in hypertriglyceridemic men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 32, n. 5, p. 1043–1050, 1979.

VANHOUTTE, P. M. Endothelial adrenoceptors. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 38, n. 5, p. 796–808, nov. 2001.

VARTANIAN, L. R.; SCHWARTZ, M. B.; BROWNELL, K. D. Effects of soft drink consumption on nutrition and health: a systematic review and meta-analysis. **American journal of public health**, v. 97, n. 4, p. 667–75, abr. 2007.

VILLACORTA, L.; CHANG, L. The role of perivascular adipose tissue in vasoconstriction, arterial stiffness, and aneurysm. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 21, n. 2, p. 137–147, 2015.

WATTANAPITAYAKUL, S. K.; BAUER, J. A. Oxidative pathways in cardiovascular disease: roles, mechanisms, and therapeutic implications. **Pharmacology & therapeutics**,

v. 89, n. 2, p. 187–206, fev. 2001.

WEI, Y.-C. et al. Assessing Sex Differences in the Risk of Cardiovascular Disease and Mortality per Increment in Systolic Blood Pressure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Follow-Up Studies in the United States. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0170218, 25 jan. 2017.

WHITE, J. S. Challenging the Fructose Hypothesis: New Perspectives on Fructose Consumption and Metabolism. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 4, n. 2, p. 246–256, mar. 2013.

WILCOX, G. Insulin and Insulin Resistance. **Clinical Biochemist Reviews**, v. 26, n. 2, p. 19, 2005.

YANAGISAWA, M. et al. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. **Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension**, v. 6, n. 4, p. S188-91, dez. 1988.

YANAI, H. et al. The underlying mechanisms for development of hypertension in the metabolic syndrome. **Nutrition journal**, v. 7, p. 10, 2008.

YU, Q.; GAO, F.; MA, X. L. Insulin says NO to cardiovascular disease. **Cardiovascular Research**, v. 89, n. 3, p. 516–524, 15 fev. 2011.

ZHANG, D.-M.; JIAO, R.-Q.; KONG, L.-D. High Dietary Fructose: Direct or Indirect Dangerous Factors Disturbing Tissue and Organ Functions. **Nutrients**, v. 9, n. 4, 29 mar. 2017.