

**PAPEL DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA
NAS ALTERAÇÕES VASCULARES E METABÓLICAS INDUZIDAS
PELA ALTA INGESTÃO DE FRUTOSE EM RATOS**

GLAUCIENE JANUÁRIO DE SOUSA

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

VITÓRIA, 2022

GLAUCIENE JANUÁRIO DE SOUSA

**PAPEL DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA NAS
ALTERAÇÕES VASCULARES E METABÓLICAS INDUZIDAS PELA ALTA
INGESTÃO DE FRUTOSE EM RATOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, em cumprimento às exigências parciais de avaliação para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Nazaré Souza Bissoli

VITÓRIA

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Centro de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE TESE DA CANDIDATA AO
TÍTULO DE DOUTORA PELO PPGCF/CCS/UFES**

Nº. Matrícula do(a) Candidato(a): 2017142092

A Comissão Julgadora que examinou a Tese de Doutorado, intitulada "**PAPEL DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA NAS ALTERAÇÕES VASCULARES E METABÓLICAS INDUZIDAS PELA ALTA INGESTÃO DE FRUTOSE EM RATOS**", apresentada e defendida publicamente pela aluna Glauciene Januário de Sousa, no dia 17 de março de 2022, às 14h, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida tese de Doutorado e, portanto, declara que a aluna faz jus à obtenção do Título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Vitória – ES, 17 de março de 2022.

Prof^a. Dr^a. Nazaré Souza
Dept^o. Ciências Fisiológicas CCS – UFES
(Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Izabela Facco Caliman
Dept^o. Fisiologia da FMR – USP
(Membro Externo)

Prof^a. Dr^a. Sônia Alves Gouvêa
Dept^o. Ciências Fisiológicas CCS - UFES
(Membro Interno)

Prof^o. Dr^o. Marcelo Perim Baldo
Dept^o. Fisiopatologia – Unimontes
(Membro Externo)

Prof^o. Dr^a. Alessandra Simão Padilha
Dept^o. Ciências Fisiológicas CCS – UFES
(Membro Interno)

Sousa, Glauciene Januário 1991.

O papel do sistema renina-angiotensina-aldosterona nas alterações vasculares e metabólicas induzidas pela alta ingestão de frutose em ratos [Vitória] 2022. xxi, 78p., 29,7 cm (UFES, D. Sc., Ciências Fisiológicas, 2022).

Tese, Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Nazaré Souza Bissoli

1. Frutose 2. Síndrome Metabólica 3. Função Vascular 4. Enalapril
5. Espironolactona 6. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

DEDICATÓRIA

À Deus,

Pelo dom da vida e pelos anjos que colocou em meu caminho, sem os quais eu jamais conseguira ter concluído este trabalho.

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais Elizabeth e Adão, por todo amor, cuidado, compreensão e apoio concedido durante todos os momentos e que mesmo sem saber são a maior inspiração para que eu não desista dos meus sonhos.

Ao meu eterno amor Gabriel, por todo incentivo, amor e compreensão. Obrigada por entender minha ausência, meu estresse, meu tempo, meus delírios e ainda assim jamais me abandonar. Obrigada por acreditar em mim e não me deixar desistir nos momentos de fraqueza. Esta conquista também é sua!

A minha orientadora prof^ª. Dr^ª. Nazaré Souza Bissoli, por me permitir fazer parte do Laboratório de Hipertensão Experimental e acima disso, de sua vida. É impossível expressar em palavras o quanto sou grata. Obrigada por mesmo nos momentos difíceis sempre acreditar em mim, saber esperar o meu ritmo com muita paciência, estando sempre presente e me mostrando que eu sou capaz. Muito obrigada pela confiança, amizade e oportunidade.

Ao prof^o Dr^o Marcelo Perim Baldo, pela excelente orientação durante o mestrado e que me apresentou a frutose, a qual hoje é tema também deste trabalho. Fica meu agradecimento não somente por aceitar o convite de compor a banca examinadora desta tese, mas, sobretudo, pelas significativas contribuições.

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

A prof^ª. Dr^ª. Alessandra Simão Padilha por gentilmente aceitar o convite para compor a banca e por todos os momentos de disponibilidade em auxiliar, além de claro suas significativas contribuições com minha formação, especialmente nas excelentes aulas de Fisiologia da Circulação.

A Prof^ª Dr^ª Izabela Facco Caliman por aceitar de forma muito gentil o convite para compor a banca e é claro por toda sua contribuição durante a minha formação. Obrigada pelos ensinamentos que foram fundamentais para o início da minha vida científica e

permanência no laboratório e mesmo quando estive mais longe (EUA) sempre estive disponível para auxiliar com preciosas dicas.

Ao meu sogro Mário que é um dos meus maiores incentivadores nesta caminhada acadêmica que sempre acreditou em mim e me dá total apoio e incentivo. Foi e é suporte essencial hoje para Gabriel na loja, sendo somente possível assim a finalização deste trabalho.

A Aline e Polyana por todo apoio, amizade, torcida, carinho e ensinamentos que foram fundamentais para minha vida científica e formação. E que não medem esforços para ajudar sempre que necessário. Obrigada, vocês são hoje além de colaboradoras grandes amigas e inspiração.

A Mariana Couto que me acompanhou desde o mestrado e por participar arduamente em todas as etapas deste trabalho, sempre se disponibilizando a ajudar em tudo, foi suporte físico e emocional em todas as etapas e sempre me fez acreditar que mesmo com todas as dificuldades eu iria conseguir. Além da parceria no laboratório se tornou uma grande amiga para a vida.

A Thatiany, que chegou um pouco depois no laboratório, mas se tornou essencial sendo um grande apoio dentro e fora da UFES. Gratidão por ter chegado num momento tão necessário e por se fazer presente e especial. Além disso trouxe Vitor, o qual também agradeço pela nova parceria momentos compartilhados.

A Nara, que de forma leve e encantadora sempre estive disponível para me auxiliar no que fosse preciso, não importa o tipo de atividade. E até hoje é assim, tive a oportunidade de fazer muito além de parcerias de experimentos.

Ao Antônio Ferreira, pela parceria nos projetos, por sempre fazer aquele cafezinho e é claro pelo apoio em diversos momentos onde compartilhamos risos e também as dificuldades que só nós entendemos.

Ao Phablo que além de grandes ensinamentos científicos para a vida, se fez presente especialmente nesta reta final e me auxiliou com o artigo de forma que jamais poderei agradecer. Este trabalho sempre teve um espaço que é seu. Muito obrigada pela parceria.

A toda equipe do Laboratório de Hipertensão Experimental (LHE – UFES) por todo companheirismo e ajuda especialmente aos alunos e ex-alunos Marcos, Karine, Gírlândia,

Eweline, Andrews, Pollyana, Mariana Cristina, Leonardo, Priscilla, Edgar, Mayara, Marília, Ana Carolina, Silas, Wedson, Felipe.

Aos meus novos colegas de trabalho por todo apoio, torcida e incentivo nesta reta final, especialmente ao Yan que, talvez mesmo sem perceber, me incentivou a não desistir, sempre me fazendo acreditar e confiar mais em mim.

Aos amigos do PPGCF por todos os momentos compartilhados, pelos desesperos, alegrias, dúvidas e emoções. Obrigada a todos os alunos de cada laboratório do programa que ajudaram de alguma forma, seja emprestando diversas vezes alguns materiais, equipamentos, ajudando nos estudos das disciplinas e incentivando e apoiando sempre.

Aos professores do PPGCF, secretários e funcionários, em especial ao Anderson pelo apoio técnico e ao médico veterinário Rodolfo e demais funcionários do biotério que sempre nos atenderam prontamente.

A UFES e ao PPGCF por toda estrutura que permitiram a minha formação e a realização deste trabalho. Em especial, a população que contribui para existência e manutenção desta instituição. E também a CAPES, CNPq e FAPES pelo apoio financeiro fornecido a essa e a tantas outras pesquisas em nossa instituição [nº FAPES/CNPq 591/18 e FAPES 220/2019].

A todos meus amigos, por serem grandes incentivadores e por toda compreensão, principalmente nos momentos de ausência. Em especial a Mayelle, Lohanna e Paola.

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

Certamente aqui não consta o nome de todas as pessoas que merecem ser agradecidas, então, agradeço a todos que, embora não nomeados, de alguma forma tornaram possível a conclusão deste trabalho e toda a caminhada até chegar aqui.

Meu sincero MUITO OBRIGADA!!!

*“Não é sobre chegar no topo do mundo, saber que venceu
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu
É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações
E assim ter amigos contigo em todas as situações”*

Ana Vilela

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 FRUTOSE.....	21
1.1.1 Características Gerais e Aspectos Bioquímicos do Metabolismo da Frutose	21
1.2 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA (SRAA), SINDROME METABÓLICA E FRUTOSE	25
1.3 HIPÓTESE.....	29
2 OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	31
3.1.1 Declaração de Reutilização de Dados	31
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	31
3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	31
3.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS.....	33
3.4.1 Evolução ponderal e coleta de amostras	33
3.4.2 Glicemia em Jejum, Teste de Tolerância à Glicose e Insulina	33
3.4.3 Medidas de Pressão Arterial Sistólica (PAS)	34
3.5 PREPARAÇÃO DO LEITO VASCULARE MESENTÉRICO(LVM).....	35
3.5.1 Reatividade vascular no LVM	36
3.5.2 Análise dos resultados de reatividade vascular	36
3.6 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTERN BLOT.....	37
3.6.1 Extração das proteínas	37

3.6.2 Dosagem das proteínas.....	37
3.6.3 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE).....	38
3.6.4 Transferência das proteínas.....	38
3.6.5 Incubação dos anticorpos.....	39
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4 RESULTADOS.....	40
4.1 PARÂMETROS PONDERAIS.....	40
4.2 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓICA.....	42
4.3 CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS.....	42
4.3.1 Glicemia de jejum.....	42
4.3.2 Teste de Tolerância à Glicose.....	43
4.3.3 Teste de Sensibilidade à Insulina.....	44
4.3 REATIVIDADE VASCULAR DO LEITO MESENTÉRICO.....	45
4.3.1 Reatividade Vascular em resposta à NOR.....	45
4.3.2 Reatividade vascular em resposta a ACh	49
4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE VASOS MESENTÉRICOS..	52
5 DISCUSSÃO.....	54
6 RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias metabólicas da frutose e a inter-relação com o metabolismo lipídico e glicídico.....	24
Figura 2: Organograma do Protocolo Experimental.....	32
Figura 3: Plestismógrafo de cauda para medidas de pressão arterial sistólica.....	34
Figura 4: Fotografia da artéria mesentérica superior e do leito mesentérico.....	35
Figura 5: Valores de peso corporal final e delta do peso corporal (ganho de peso) nos grupos CON, FRU, F-ENA e F-ESP.....	40
Figura 6: Deposição de gorduras: gordura retroperitoneal, gordura epididimal, gordura mesentérica e gordura visceral nos grupos CON, FRU, F-ENA F-ESP.....	41
Figura 7: Pressão Arterial Sistólica nos grupos CON, FRU, F-ENA e F-ESP.....	42
Figura 8: Glicemia de jejum nos grupos nos grupos CON, FRU, F-ENA e F-ESP.....	43
Figura 9: Teste de tolerância à glicose nos grupos CON, FRU, F-ENA e F-ESP.....	44
Figura 10: Teste de sensibilidade à insulina nos grupos CON, FRU, F-ENA e F-ESP....	45
Figura 11: Efeitos da ingestão de frutose e tratamentos farmacológicos na curva concentração-resposta de vasoconstrição induzida por NOR no leito vascular mesentérico dos grupos CON, FRU, F-ENA e F-ESP na ausência de inibidores.....	46
Figura 12: Efeitos da ingestão de frutose e tratamentos farmacológicos na curva concentração-resposta de vasoconstrição induzida por NOR no leito vascular mesentérico dos grupos CON, FRU, F-ENA e F-ESP na presença de L-NAME.....	47
Figura 13: Efeitos da ingestão de frutose e tratamentos farmacológicos na curva concentração-resposta de vasoconstrição induzida por NOR no leito vascular mesentérico dos grupos CON, FRU, F-ENA e F-ESP na presença de indometacina (INDO).....	48
Figura 14: Efeitos da ingestão de frutose e tratamentos farmacológicos na curva concentração-resposta de relaxamento induzido por ACh no leito vascular mesentérico dos grupos CON, FRU, F-ENA e F-ESP na ausência de inibidores.....	49

Figura 15: Efeitos da ingestão de frutose e tratamentos farmacológicos na curva concentração-resposta de relaxamento induzido por ACh no leito vascular mesentérico dos grupos CON, FRU, F-ENA e F-ESP na presença de L-NAME.....	50
Figura 16 Efeitos da ingestão de frutose e tratamentos farmacológicos na curva concentração-resposta de relaxamento induzido por ACh no leito vascular mesentérico dos grupos CON, FRU, F-ENA e F-ESP na presença de indometacina (INDO).....	51
Figura 17: Efeitos do enalapril e espironolactona na expressão das proteínas (A) iNOS, (B) TNF α e (C) COX-2 em ramos vasculares mesentéricos dos grupos CON, FRU, F-ENA e F-ESP.....	52
Figura 18: Efeitos do enalapril e espironolactona na expressão das proteínas (A) SOD-1, (B) SOD-2, (C) Catalase e (D) Defesa Antioxidante Global em ramos vasculares mesentéricos dos grupos CON, FRU, F-ENA e F-ESP.....	53
Figura 19: Mecanismo proposto da relação entre o consumo excessivo de frutose, resistência insulina, sistema nervoso simpático, sistema renina angiotensina, disfunção endotelial e Hipertensão.....	58
Figura 20: Cascata de sinalização envolvendo a ativação de COX-2 pelas vias ERK, MAPK, NF- κ B e EROs.....	63
Figura 21: Resumo gráfico dos efeitos cardiometabólicos do bloqueio do SRAA em modelo experimental que mimetiza os estágios iniciais da síndrome metabólica por sobrecarga de frutose.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Ácido araquidônico

ACh: Acetilcolina

ATP: Trifosfato de adenosina

AUC: Área abaixo da curva

CON: Grupo controle

COX: Ciclooxigenase

COX-2: Ciclooxigenase 2

dAUC: Diferenças das áreas abaixo das curvas

DCV: Doenças cardiovasculares

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial

EROs: Espécies reativas do oxigênio

ERK: Quinase regulada por sinais extracelulares

ET-1: Endotelina 1

FRU: Grupo fructose

F-ENA: Grupo fructose + enalapril

F-ESP: Grupo fructose + espironolactona

GLUT-2: Transportador de glicose tipo 2

GLUT-5: Transportador de glicose tipo 5

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

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

IL-6: Interleucina 6

INDO: Indometacina

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

LVM: Leito vascular mesentérico

MCP-1: Proteína quimiotóxica de monócitos

NF- κ B: fator de transcrição kappa B

NO: Óxido nítrico

NOR: Noradrenalina

NOS: Óxido nítrico sintase

O₂⁻: Ânion superóxido

ONOO⁻: Peroxinitrito

PGG₂: Prostaglandina G₂

PGH₂: Prostaglandina H₂

PGI₂: Prostaciclina

PLA₂: Fosfolipase A₂

PLC: Fosfolipase C

RI: Resistência à insulina

SSBs: Bebidas açucaradas (do inglês *Sugar-Sweetened Beverages*)

SM: Síndrome metabólica

SRAA: Sistema renina angiotensina aldosterona

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TXA₂: Tromboxano A₂

SOD: Superóxido dismutase

SOD-1: Superóxido dismutase -1

SOD-2: Superóxido dismutase -2

RESUMO

Introdução: A alta ingestão crônica de frutose mimetiza os estágios iniciais da síndrome metabólica (SM), levando a alterações cardiometabólicas progressivas. Uma vez que o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) está relacionado as doenças cardiovasculares em geral, levantamos a hipótese de que o tratamento com enalapril e espironolactona atenuaria as alterações vasculares e metabólicas da sobrecarga de frutose.

Metodologia: Ratos Wistar com seis semanas de idade foram designados para receber água potável (controles: CON) ou solução de frutose a 10% (FRU) por 6 semanas. Durante as últimas três semanas, uma amostra de ratos FRU recebeu enalapril (F-ENA) ou espironolactona (F-ESP). A pressão arterial sistólica (PAS) foi avaliada por pletismografia da cauda. A glicemia de jejum, a tolerância à insulina e glicose foram medidas no final do acompanhamento por glicosímetro à base de tiras. A reatividade do leito vascular mesentérico foi avaliada em um sistema de perfusão. A análise de Western Blot foi realizada para iNOS, TNF- α , COX-2, SOD-1, SOD-2 e Catalase.

Resultados: A frutose aumentou a gordura visceral sem afetar o ganho de peso corporal, enquanto apenas o enalapril evitou o acúmulo excessivo de gordura e também diminuiu o peso corporal. A pressão arterial permaneceu inalterada em todos os grupos durante as seis semanas. O grupo FRU apresentou aumento da glicemia de jejum, que foi atenuado apenas pela espironolactona. A frutose também reduziu tanto a tolerância à glicose quanto a sensibilidade à insulina, que foi revertida pelo enalapril, enquanto a espironolactona apenas preveniu as alterações na tolerância à glicose. Ratos FRU tiveram aumento da vasoconstrição induzida pela noradrenalina, que foi totalmente prevenida pelo enalapril, mas não pela espironolactona. As diferenças entre os grupos foram mantidas após a inibição da óxido nítrico sintase e desapareceram após a inibição da ciclooxigenase (COX). As defesas antioxidantes foram afetadas pela frutose, mas pouco pelos tratamentos.

Conclusões: As alterações metabólicas por sobrecarga de frutose foram acompanhadas de aumento da vasoconstrição relacionada aos prostanóides constritores. Essas alterações foram fortemente relacionadas à angiotensina-II, mas pouco aos mineralocorticóides.

Palavras-chave: Frutose, Síndrome Metabólica, Função Vascular, Enalapril, Espironolactona, Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

ABSTRACT

Introduction: Chronic high fructose intake mimics the early stages of metabolic syndrome (MS), leading to progressive cardiometabolic changes. Since the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) is implicated in cardiovascular diseases in general, we hypothesized that treatment with enalapril and spironolactone would blunt the vascular and metabolic alterations of fructose overload.

Methodology: Six-week-old male Wistar rats were assigned to receive drinking water (controls: CON) or 10% fructose solution (FRU) for 6 weeks. During the last three weeks, a sample of FRU rats received enalapril (F-ENA) or spironolactone (F-ESP). Systolic blood pressure was evaluated by tail plethysmography. Fasting glucose, insulin and glucose tolerance were measured at the end of the follow-up by strip-based glucometer. Mesenteric vascular bed reactivity was evaluated in a perfusion system. Western Blot analysis were performed for TNF- α , COX-2, SOD-1, SOD-2 and Catalase.

Results: Fructose increased visceral fat without affecting body weight gain, while only enalapril prevented excessive fat accumulation and also decreased body weight. Blood pressure remained unchanged in all groups during the six weeks. FRU group had increased blood fasting glucose, which was mitigated only by spironolactone. Fructose also reduced in both glucose tolerance and insulin sensitivity, which was reverted by enalapril, while spironolactone only prevented glucose tolerance changes. FRU rats had increased vasoconstriction elicited by norepinephrine, which was fully prevented by enalapril, but not by spironolactone. Differences among the groups were maintained after nitric oxide synthase inhibition and disappeared after COX inhibition. Antioxidant defenses were affected by fructose but poorly by the treatments.

Conclusions: The metabolic changes by fructose overload were accompanied by increased vasoconstriction related to constrictor prostanoids. These changes were strongly related to angiotensin-II but poorly to mineralocorticoids.

Keywords: Fructose, Metabolic syndrome, Vascular function, Enalapril, Spironolactone, Renin-angiotensin-aldosterone system.

INTRODUÇÃO

Os hábitos alimentares exercem forte influência no metabolismo corporal e os padrões alimentares variam muito dentro e entre as populações (Popkin & Gordon-Larsen, 2004; Cespedes & Hu, 2015). O aumento do consumo de açúcar é considerado, cada vez mais, como um contribuinte para as epidemias mundiais de obesidade, diabetes, hipertensão e seus riscos cardiometabólicos associados. Importante destacar, que tais doenças também podem ser prevenidas ou controladas, ainda que parcialmente, pela prática de hábitos alimentares saudáveis (WHO, 2014; Cespedes & Hu, 2015).

Como resultado de suas propriedades metabólicas únicas, o componente frutose do açúcar pode ser particularmente prejudicial. Dietas ricas em frutose podem produzir rapidamente as principais características da síndrome metabólica (SM). Nas últimas décadas, os hábitos alimentares mudaram em todo o mundo, e o consumo de frutose, principalmente em bebidas açucaradas (SSBs - do inglês Sugar-Sweetened Beverages), aumentou significativamente. As doenças metabólicas crônicas se tornaram em resultado comum do estilo de vida ocidental moderno, marcado pela prevalência de distúrbios metabólicos como a obesidade, resistência à insulina (RI) e doenças complexas como a SM, que pode levar a doenças cardiovasculares (DCV) (Egger & Dixon, 2014).

O consumo elevado de frutose tem sido associado a comprometimento metabólico e desenvolvimento de SM (Bray et al., 2004; Havel et al., 2005; White et al., 2009; Kuzma et al., 2016). De fato, tem havido um aumento progressivo no uso de frutose em bebidas açucaradas e alimentos processados (Bray et al., 2004; Marriott et al., 2009; Walker et al., 2014; Kuzma et al., 2016). O uso de frutose em alimentos processados vem aumentando ao longo do tempo, especialmente em bebidas açucaradas, sendo o xarope de milho rico em frutose (HFCS - do inglês High Fructose Corn Syrup) o adoçante calórico mais comum usado pela indústria de bebidas (Bray, 2008) e tem contribuído significativamente para o aumento do consumo de frutose.

As SSBs são uma importante fonte de adição de açúcar em dietas em todo o mundo e incluem refrigerantes, bebidas com sabor de frutas e bebidas esportivas. Em média, os SSBs contribuem com aproximadamente 7% de calorias diárias (Kit et al., 2013) e quase 50% de açúcares adicionados na dieta (ODPHP, 2015). Embora as tendências no consumo de SSB tenham diminuído nos últimos anos, quase 66% dos jovens dos EUA ainda

consomem pelo menos um SSB por dia (Rosinger et al., 2017). Outros grandes contribuintes para a ingestão de açúcar adicionado incluem doces e sobremesas, contribuindo com aproximadamente 4% a 9% da ingestão de energia em função da idade (ODPHP, 2015; Vos et al., 2016).

As doenças não transmissíveis, que podem envolver a má alimentação e o sedentarismo como as causas mais comuns, estão entre as principais causas de morte em todo o mundo (WHO, 2014). Dentro deste contexto a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a redução de açúcares adicionados ou livres, principalmente em SSBs, como uma das estratégias na prevenção e tratamento de várias doenças. A recomendação é consumir açúcares livres no máximo 10% da ingestão total de energia (WHO, 2015). Entretanto, de acordo com a OMS, o consumo de açúcares livres (por exemplo, frutose) varia especialmente com a idade e o país. Na Europa o consumo varia de 7% a 25% da ingestão total de energia em diferentes países (WHO, 2015) enquanto outros continentes como América do Sul e Oceania (Tappy & Le, 2010) apresentam maior consumo. No Brasil, o consumo de SSBs aumentou aproximadamente 400% de 1974 a 2003 (Levy-Costa et al., 2005). Em 2009, o consumo de SSBs por adultos brasileiros foi de aproximadamente 100 ml/dia (IBGE, 2011).

O maior consumo de SSBs está consistentemente associado a índices de maior risco cardiometabólico. A carga de açúcar contida em bebidas adoçadas pode induzir o rápido aumento de açúcar no sangue, resistência à insulina e levar a mudanças no perfil lipídico e pressão arterial. Por sua vez, hiperglicemia, resistência à insulina, aumento de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos podem desencadear respostas inflamatórias e a produção de radicais livres que afetam as funções vasculares (Malik, et al., 2013). O consumo humano de bebidas adoçadas com açúcar tem sido associado ao ganho de peso e ao risco de sobrepeso e obesidade, bem como ao desenvolvimento de SM e diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Malik et al., 2013).

A SM é uma doença caracterizada pela ocorrência de múltiplos fatores de risco cardiometabólico, incluindo achados clínicos e bioquímicos como a obesidade visceral, intolerância à glicose/resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão, que juntos aumentam o risco de desenvolvimento de DCV e DM2 (Wajchenberg et al., 1994; Ford et al., 2002; Eckel et al., 2005; Huang, 2009). Além dessas doenças, o aumento da reatividade vascular à noradrenalina (Baron et al., 1994) e resistência à insulina associada

com o aumento da atividade simpática (Thorp & Schlaich, 2015) também estão associados a SM.

A SM tornou-se um tema de importante investigação e estudo no âmbito científico (Johnson et al., 2009; Stanhope & Havel, 2009; White, 2009), uma vez que, a doença e suas complicações tem grande relevância para a saúde pública, pois contribui com o aumento dos riscos de desenvolvimento DM2, doenças coronarianas e o consequente aumento da mortalidade atribuída a estas doenças (Cheng et al., 2014).

Modelos experimentais que utilizam dieta rica em frutose são amplamente empregados para mimetizar as desordens metabólicas causadas pela adoção de maus hábitos alimentares observadas em humanos. Em geral são utilizadas para desencadear o aparecimento de sinais característicos da SM, permitindo assim, avaliar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da mesma (Havel, 2005; Tran et al., 2009; Kennedy et al., 2010; Hernández-Salinas et al., 2015; Sil et al., 2015). A ingestão crônica de frutose pode também desencadear aumento no tecido adiposo visceral, considerado uma característica marcante da SM (Bursać et al., 2014).

Estudos utilizando animais experimentais mostraram que o consumo crônico de frutose induz distúrbios metabólicos que mimetizam muitos fatores da SM humana, incluindo hipertensão, trigliceridemia e hiperinsulinemia (Hwang et al., 1987; Nagai et al. 2002). O papel da alta ingestão de frutose no desenvolvimento de condições que mimetizam a SM em humanos tem sido demonstrado em diversos estudos (Qin et al., 2004; Giani et al., 2009; Li et al., 2012; Maithilikarpagaselvi et al., 2015).

1.1 FRUTOSE

1.1.1 Características Gerais e Aspectos Bioquímicos do Metabolismo da Frutose

A frutose tem seu nome originário da palavra latina *fructus*, sendo as frutas uma importante fonte de frutose. Foi isolada pela primeira vez em 1847 a partir da cana-de-açúcar (Wang & Van, 1981). A frutose é um açúcar simples, do grupo das hexoses, apresenta a fórmula química ($C_6H_{12}O_6$) igualmente a da glicose, diferindo apenas pela

posição do grupo carbonila, que na frutose encontra-se no carbono 2 fazendo com que ela pertença ao grupo das cetoses, enquanto na glicose encontra-se no carbono 1 fazendo com que ela pertença ao grupo das aldoses (Lê & Tappy, 2006). Embora a frutose e a glicose sejam ambos monossacarídeos com fórmulas muito semelhantes, suas vias de metabolismo são divergentes tanto nos enterócitos quanto nos hepatócitos (Ferraris et al., 2018; Hannou et al., 2018; Mortera et al., 2019; Hoffman et al., 2019).

As alterações promovidas pela frutose estão diretamente relacionadas ao seu metabolismo. Devido às características peculiares do seu metabolismo, a frutose pode induzir cada um dos fenômenos associados a SM como obesidade visceral, resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão arterial. A maior parte do metabolismo da frutose ocorre no fígado (50-75%), sendo a parte restante metabolizada principalmente pelos rins e adipócitos (Froesch, 1972; Van, 1988). Após ingerida a frutose é absorvida no intestino delgado via difusão facilitada, especialmente via transportador de glicose tipo 5 (GLUT-5) e transportador de glicose tipo 2 (GLUT-2) (Thorens & Mueckler, 2010).

Contrariamente à glicose, o metabolismo da frutose não requer hidrólise de ATP, é independente da absorção de sódio e não depende da estimulação pela insulina (Corpe et al., 1999; Cortez-Pinto et al., 1999; Douard & Ferraris, 2008; Taapy & Lê, 2010). Após a absorção, a frutose é difundida, por meio dos vasos sanguíneos, da veia porta até o fígado sendo transportada pelo GLUT-2 (Mayes, 1993; Tappy & Lê, 2010). A absorção de frutose no fígado e nos músculos ocorre via transportador GLUT-2 e é independente de insulina. A frutose estimula a produção de glicogênio (Petersen et al., 2001) e contribui para o aumento da produção de triglicerídeos e acetil-CoA (Feinman & Fine, 2013).

O primeiro passo no metabolismo da frutose é sua rápida conversão em frutose-1 fosfato pela enzima frutoquinase (Hallfrisch, 1990; Johnson et al., 2013). A frutoquinase possui duas isoformas: tipo A e tipo C. A frutoquinase C é expressa principalmente no fígado e é responsável pela rápida depuração da frutose na circulação. A frutoquinase A é distribuída em compartimentos extra-hepáticos e tem menor afinidade pela frutose, quando comparada à isoforma hepática (Ishimoto et al., 2012). A frutose-1-fosfato é clivada em duas trioses, diidroxiacetona e gliceraldeído-fosfato via enzima aldolase B e esses metabólitos são incorporados por diferentes vias que levam à síntese descontrolada de triglicerídeos, glicose ou glicogênio. (Feinman & Fine, 2013).

As duas trioses poderão seguir três caminhos distintos, com finalidades diferentes: participar da via glicolítica fornecendo piruvato e liberando energia; a diidroxicetona fosfato pode ser reduzida para glicerol-3-fosfato, necessário para a síntese de triacilglicerol (TAG), fosfolipídios e outros lipídios e, finalmente, a diidroxicetona fosfato pode ser condensada pela aldolase até formar a frutose-1,6-bifosfato e, a partir dessa, formar glicose ou glicogênio. Dessa forma, dará origem ao piruvato, lipídios e ao glicogênio. Na Figura 1, estão apresentadas as vias metabólicas da frutose e a inter-relação com o metabolismo lipídico e glicídico. Como o metabolismo da frutose não é afetado pelo passo regulador da glicólise, fosforilações da frutose podem levar à depleção de ATP e ao aumento na síntese de TAG. (Hallfrisch, 1990; Mayes, 1993; Barreiros et al., 2005).

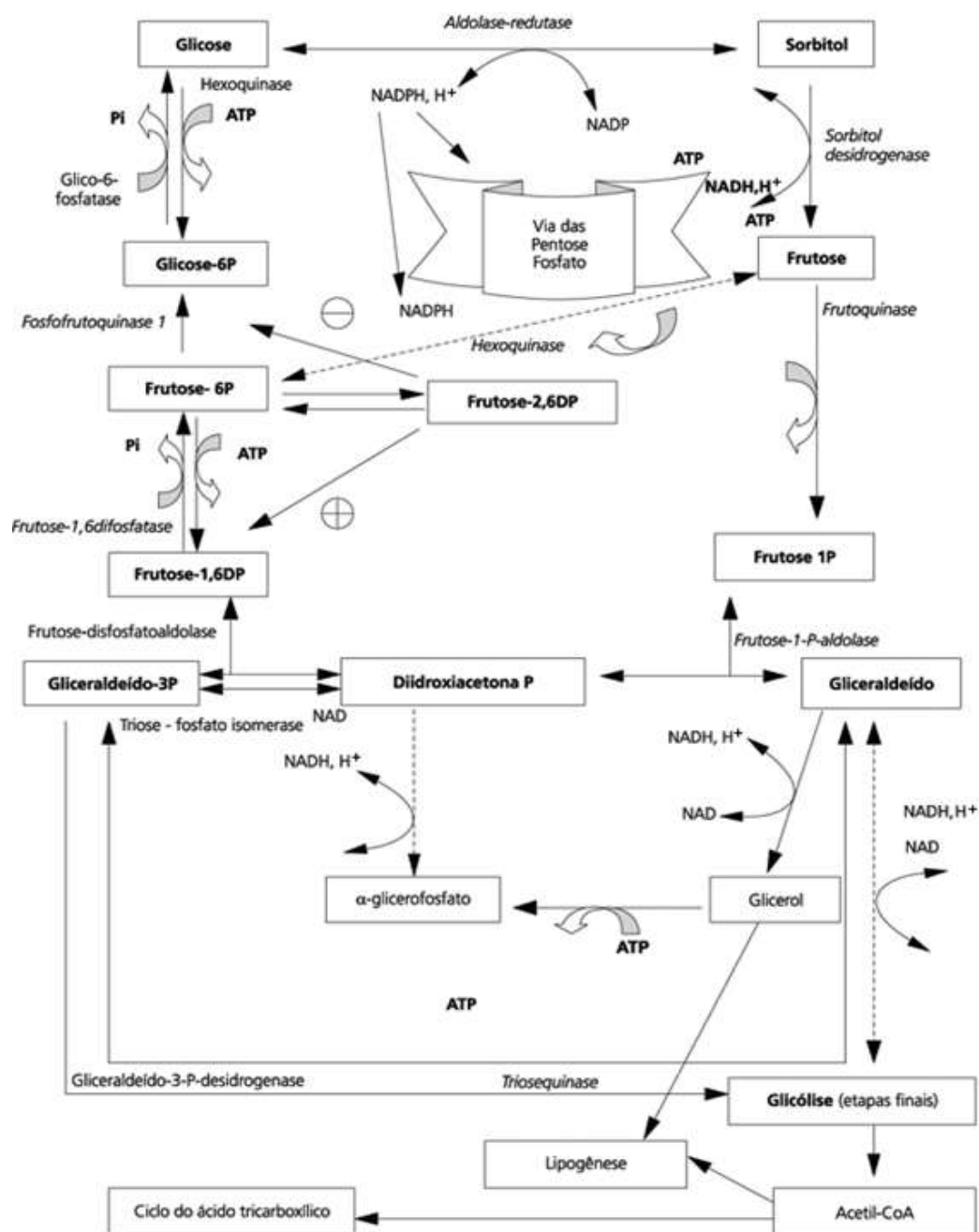


Figura 1: Vias metabólicas da frutose e a inter-relação com o metabolismo lipídico e glicídico. Fonte: Barreiros et al., 2005.

Além disso, a etapa inicial do metabolismo da frutose, sua fosforilação à frutose-1 fosfato, ocorre com hidrólise do ATP, gerando AMP e ácido úrico (Kurtz et al., 1986). Níveis excessivos de ácido úrico, por outro lado, promovem dano oxidativo, proliferação de células musculares lisas e ativação da cascata inflamatória. Por sua vez o aumento do ácido úrico pode contribuir com vários aspectos da SM, incluindo hipertrigliceridemia,

hiperglicemia, resistência à insulina, aterosclerose e hipertensão (Nakagawa et al., 2006; Sánchez-Lozada et al., 2007; Zhang et al., 2017).

No entanto, os mecanismos envolvidos nos efeitos cardiovasculares de uma dieta rica em frutose ainda não foram totalmente esclarecidos. Neste estudo, nós investigamos o papel do SRAA nas alterações cardim metabólicas promovidas pela frutose em nosso modelo experimental, que mimetiza estágio iniciais da SM.

1.2 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA (SRAA), SINDROME METABÓLICA E FRUTOSE

Nosso estudo anterior mostrou que seis semanas de alta ingestão de frutose em ratos Wistar leva a distúrbios metabólicos e aumento da vasoconstrição, que foi relacionada aos prostanóides constritores endoteliais (Sousa et al., 2017). Dados recentes apontam para uma hiperatividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) sob sobrecarga de frutose (Kim et al., 2020), enquanto o SRAA é conhecido por desencadear a ativação da COX-2 para a produção de prostanóides constritores (Quadri et al., 2016). Nesse sentido, aqui, pretendemos explorar o papel do SRAA nas alterações vasculares e metabólicas que encontramos em nosso estudo anterior (Sousa et al., 2017).

Evidências sugerem um papel importante do SRAA nos mecanismos patogênicos envolvidos no modelo de SM induzido por frutose (Miatello et al., 2004) e que o SRAA vascular parece mediar a disfunção vascular e o estresse oxidativo vascular em ratos submetidos a dieta rica em frutose (Nyby et al., 2007). A dieta com frutose aumentou a expressão da enzima conversora de angiotensina (ECA) e do receptor de angiotensina I (AT-1) e diminuiu a expressão da enzima conversora de angiotensina II e do receptor de angiotensina II (AT-2) no coração de ratas ovariectomizadas. Por outro lado, a reposição de estradiol parece reverter os efeitos da dieta com frutose no SRAA (Miatello et al., 2004). Bundalo e colaboradores (2016) mostrou que a dieta rica em frutose induziu mudanças específicas de gênero na expressão de proteínas do SRAA no coração e aorta de ratos machos.

O enalapril, um anti-hipertensivo, inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA) vem sendo relacionado em estudos clínicos e experimentais à melhora de fatores de risco

associados à SM como hiperglicemia, dislipidemia e ganho de peso (Al-thanoon & Mahmood, 2012, Arivazhahan et al., 2017). Al-thanoon & Mahmood (2012) após um estudo realizado com cento e vinte e seis pacientes hipertensos recém-diagnosticados com outros marcadores de SM mostraram que tanto a losartana quanto o enalapril produziram redução significativa dos marcadores da SM sugerindo que podem ser considerados medicamentos eficazes para o tratamento da hipertensão em pacientes com SM. Além de sua utilidade anti-hipertensiva, o enalapril pode ser considerado como componente de esquemas terapêuticos para combater o ganho de peso, hiperglicemia e dislipidemia observados na SM (Arivazhahan et al., 2017). Além disso, o tratamento com enalapril foi eficaz na proteção contra a resistência à insulina e a doença hepática gordurosa não alcoólica, aumentando a ação da insulina hepática, a leptina e a gliconeogênese, e reduzindo a via lipogênica e o acúmulo de lipídios no fígado de camundongos (Frantz et al., 2014).

Estudos mostram que os IECA melhoram a resistência à insulina induzida pela alta ingestão de frutose em ratos e que este efeito é dose-dependente (Erlich et al., 1995). Enalapril e candesartana atenuaram a hipertensão induzida por dieta rica em frutose, albuminúria, hiperfiltração glomerular e dano renal em modelo de ratos sensíveis ao sal (Xu et al., 2021). O tratamento com enalapril melhora os componentes da SM e tem efeitos diretos na redução dos níveis séricos de grelina independentes da SM (Aygen et al., 2015). Além disso, a disfunção endotelial e o aumento do estresse oxidativo em aortas de ratas ovariectomizadas foram inibidos ou revertidos pela inibição crônica do sistema renina angiotensina com enalapril ou valsartana (Yung et al., 2011). Dessa forma, acreditamos que o enalapril tem potencial para promover efeitos benéficos nas alterações metabólicas e vasculares em nosso modelo experimental.

Além disso, evidências apoiam um papel crucial da aldosterona na patogênese e progressão da síndrome cardiometabólica. Conforme descrito por Sowers e colaboradores (2009) níveis plasmáticos elevados de aldosterona contribuem diretamente para a resistência à insulina, disfunção endotelial, hiperfiltração glomerular e excesso de vazamento glomerular e tubular de albumina; processos que levam ao remodelamento cardiovascular e renal. Níveis plasmáticos aumentados de aldosterona estão associados à resistência à insulina independente de outros componentes da síndrome metabólica (Bochud et al., 2006; Giacchetti et al., 2007). Em pacientes com hiperaldosteronismo primário, a ressecção de tumores produtores de aldosterona e o tratamento farmacológico

diminuem os níveis de insulina e glicose no sangue, o que indica uma melhora na sensibilidade à insulina (Catena et al., 2006; Giacchetti et al., 2007).

Adicionalmente, estudos tem mostrado que a aldosterona, por si só promove inflamação e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos vasos (Rajagopalan et al., 2002; Leopold et al., 2007), no rim (Miyata et al., 2005; Fujisawa et al., 2004) e no coração (Sun et al., 2002), independente dos efeitos da angiotensina II. Além disso estudos clínicos mostraram que níveis elevados de aldosterona no plasma podem facilitar o desenvolvimento de resistência à insulina, aumentando o estresse oxidativo e mudando a sinalização da insulina, com conseqüente diminuição do transporte de glicose (Bender et al., 2013). Em condições clínicas caracterizadas por aumento obesidade, a ativação de receptor de mineralocorticóide (MR) por glicocorticóides, além da aldosterona, potencializa ainda mais a inflamação, estresse oxidativo, fibrose e resistência à insulina (Nagase et al., 2006; Fallo et al., 2006). Por sua vez, o bloqueio do receptor de (MR) demonstrou reverter os aumentos relacionados à obesidade nas adipocinas pró-inflamatórias TNF-alfa, MCP-1 e IL-6 e melhorar a expressão de adiponectina. (Campión et al., 1998; Guo et al., 2008).

O papel da aldosterona despertou interesse no contexto da SM a partir de estudos relacionando o bloqueio da aldosterona sendo benéfico na redução da pressão arterial de pacientes com SM (Suzuki et al., 2013). No entanto, o impacto da inibição do receptor de mineralocorticóide no metabolismo lipídico e de glicose, que estão prejudicados na SM, é em grande parte desconhecido, alguns estudos relatam esse papel.

Neste contexto, existem evidências de que a espironolactona, um antagonista do receptor de mineralocorticóide, melhora a glicemia, o metabolismo lipídico, esteatose hepática, inflamação, além de suprimir a gliconeogênese induzida por dieta com alto teor de gordura e dieta rica em frutose (Wada et al., 2010). A espironolactona também foi capaz de melhorar a resistência à insulina e reverter parcialmente a intolerância à glicose diminuída na doença renal crônica em pacientes e ratos (Hosoya et al., 2015). Outros achados evidenciam que o tratamento com espironolactona melhorou significativamente a resistência à insulina em ratos tratados com aldosterona + frutose (Sherajee et al., 2013). Além disso, Neves et al (2003) mostraram que a espironolactona pode diminuir os níveis da pressão arterial, corrigir parcialmente anormalidades estruturais vasculares e reduzir a disfunção endotelial (Neves et al., 2003). Esses resultados indicam que a

inibição do MR pode ser uma abordagem terapêutica benéfica para fenótipos de síndrome metabólica e fígado gorduroso induzidos por dieta.

A espironolactona inicialmente foi amplamente utilizada como diurético poupador de potássio em estados de sobrecarga de volume, como insuficiência cardíaca congestiva, cirrose e hiperaldosteronismo primário (Gasparo et al., 1987; Williams, 2003). Posteriormente, estudos como o RALES (Randomized Aldactone Evaluation Study) mostrou que os antagonistas dos receptores mineralocorticóides reduziram os eventos cardiovasculares. Este estudo demonstrou que uma dose baixa de espironolactona melhorou a morbidade e mortalidade em pacientes com insuficiência cardíaca grave (Pit et al., 1995). Outros estudos também relataram que uma dose baixa de espironolactona tem efeitos benéficos no desenvolvimento de distúrbios cardiometabólicos durante o excesso de andrógeno gestacional e ratas ovariectomizadas (Olatunji et al. 2017; Olatunji et; 2019).

Medicamentos atuais usados para tratar comorbidades associadas à resistência à insulina (como hipertensão) podem afetar a sensibilidade à insulina em alguns indivíduos (Ofili et al., 2011; Campbell & Blumenthal, 2012). Assim, compreender os mecanismos específicos que contribuem para o desenvolvimento da resistência à insulina em um nível individual é essencial para projetar uma prevenção mais eficaz e personalizada e estratégias de tratamento. Alguns estudos mostram que o bloqueio do SRAA previne a resistência à insulina e diabetes tipo 2 (Abuissa et al., 2005; NAVIGATOR Study Group, 2010; van der Zijl et al., 2011), sugerindo que diferenças interindividuais podem contribuir para os efeitos do SRAA no desenvolvimento da resistência à insulina. Estudos *in vitro* e *in vivo* destacam a natureza complexa e os múltiplos mecanismos pelos quais o SRAA influencia a resistência à insulina, proporcionando assim caminhos para futuras investigações em humanos.

Dessa forma, no presente estudo, nós investigamos o papel do SRAA nas alterações cardimetaabólicas promovidas pela frutose em nosso modelo experimental, que mimetiza estágio iniciais da SM, esperançosamente, ao melhorar nossa compreensão dos mecanismos pelos quais a frutose pode causar doenças, seremos capazes de trazer abordagens mais assertivas e abrangentes para lidar melhor com nossas atuais epidemias metabólicas.

1.3 HIPÓTESE

Dessa forma, levantamos a hipótese de que o tratamento farmacológico com enalapril ou espironolactona podem oferecer benefícios terapêuticos significativos para melhora de parâmetros metabólicos e cardiovasculares, em especial sobre a reatividade vascular do leito mesentérico, de ratos normotensos submetidos a dieta rica em frutose e possam atuar como alternativas importantes a serem consideradas para auxílio no controle de parâmetros que caracterizam a SM e suas complicações vasculares relacionadas à disfunção endotelial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel do sistema renina-angiotensina-aldosterona nas alterações vasculares e metabólicas induzidas pela alta ingestão de frutose em ratos normotensos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar os efeitos do tratamento com enalapril e espironolactona em ratos com dieta rica em frutose, em relação:

- A parâmetros ponderais, deposição de gordura visceral, pressão arterial sistólica, glicemia de jejum, teste de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina;
- A resposta vascular de contração à noradrenalina (NOR) e a resposta vascular de relaxamento à acetilcolina (ACh);
- A participação da via do óxido nítrico e dos prostanóides derivados da ciclooxigenase nas respostas à NOR e a ACh;
- A expressão de proteínas: iNOS, COX-2, TNF- α , SOD-1, SOD-2 e Catalase.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), com 6 semanas de idade e peso corporal variando entre 160-180 gramas. Esses animais foram fornecidos pelo Biotério de Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em ambiente com iluminação artificial (ciclo claro-escuro de 12h), temperatura de 20-25 °C e as gaiolas permitiram o livre acesso dos animais à ingestão de água e ração (ração padrão para biotérios, Purina Labina, SP – Brasil). Os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFES (CEUA- UFES) - nº 21/2018 - e conduzidos de acordo com as diretrizes de pesquisa biomédica para cuidado e uso de animais de laboratório, como recomendado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal CONCEA (CONCEA-MCT, 2016).

3.1.1 Declaração de Reutilização de Dados

Este estudo seguiu um desenho otimizado para reduzir o uso de animais, com alguma reutilização de dados após rigorosa verificação estatística. Como já havíamos estudado diferenças entre ratos controle e alimentados com frutose, no presente estudo reutilizamos parte dos dados relacionados à reatividade vascular. Aqui, apresentamos uma continuação desta pesquisa, explorando o SRAA pela inclusão de dois novos grupos.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram aleatoriamente separados em quatro grupos experimentais:

1) CON: grupo controle, mantidos com água potável por seis semanas. A partir da terceira semana foram tratados com o veículo (carboximetilcelulose - 0,5%) via orogástrica por 21 dias.

2) FRU: grupo frutose, mantidos por seis semanas com frutose 10% em água potável. A partir da terceira semana foram tratados com o veículo (carboximetilcelulose - 0,5%) via orogástrica por 21 dias.

3) F-ENA: grupo frutose + enalapril, mantidos por seis semanas com frutose 10% em água potável. A partir da terceira semana foram tratados com enalapril (20 mg/kg/dia) via orogástrica por 21 dias.

4) F-ESP: grupo frutose + espironolactona, mantidos por seis semanas com frutose 10% em água potável. A partir da terceira semana foram tratados com espironolactona (100 mg/kg/dia) via orogástrica por 21 dias.

3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Os experimentos foram realizados seguindo-se o cronograma abaixo (figura 2):



Figura 2: Organograma do Protocolo Experimental. PAS: pressão arterial sistólica; TTG: teste de tolerância à glicose; TTI: Teste de tolerância insulina.

3.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS

3.4.1 Evolução ponderal e coleta de amostras

Os animais foram pesados no início do protocolo experimental e separados aleatoriamente entre os grupos e foram pesados semanalmente durante o acompanhamento. No fim desse período, os animais foram anestesiados com associação de ketamina/xilazina (100/10 mg/kg, *i.p.*) e a gordura visceral foi cuidadosamente dissecada e coletada em seus três componentes (gordura retroperitoneal, mesentérica e epididimal) e pesadas separadamente utilizando uma balança analítica de precisão. Para cálculo da gordura visceral foi realizado uma somatória do peso das gorduras epididimal, retroperitoneal e mesentérica de cada animal. Além disso, em parte dos animais os ramos mesentéricos foram cuidadosamente dissecados sob condições ideais, removidos e armazenados para realização de *Western Blot*.

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

A avaliação da glicemia de jejum e os testes de tolerância à glicose e à insulina foram realizados como descrito por Lírio (2016). A glicemia de jejum foi avaliada na linha de base e após três e seis semanas de protocolo. Após jejum de aproximadamente 12 horas, amostras de sangue foram obtidas da veia da cauda e os níveis de glicemia de jejum foram medidos por glicosímetro à base de tiras (Accu-Chek Active, Roche, Alemanha).

Ao final das seis semanas de acompanhamento o teste de tolerância à glicose (TTG) foi realizado após um período de jejum de 12 horas e consiste na aferição da glicemia basal, antes da administração de glicose (2 mg/kg, *ip*) e nos tempos 5, 10, 20, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração.

Para determinar a tolerância à insulina, insulina exógena (1 UI/kg, *ip*) foi administrada após jejum de 6 h, e amostras de sangue foram coletadas sequencialmente nos intervalos de 0, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos.

Para todos os testes as amostras de sangue foram obtidas da veia da cauda e os níveis de glicemia foram medidos por um glicosímetro (Accu-Chek Active, Roche, Alemanha).

3.4.3 Medidas de Pressão Arterial Sistólica (PAS)

A pressão arterial sistólica (PAS) foi avaliada em três momentos do estudo:

-Basal: no início do estudo

-Terceira semana do estudo: após três semanas de estudo (onde os grupos já recebiam a frutose na água de beber, exceto o grupo controle) e antes de iniciar os tratamentos farmacológicos com enalapril e espironolactona.

-Final: após seis semanas de protocolo experimental.

As medidas foram obtidas, nos animais acordados, por meio de método indireto não invasivo, pletismografia de cauda similar a outros estudos (Baldo et al., 2011; Lírio et al, 2016; Sousa et al, 2017). Conforme mostrado na figura 3, em um aparelho pletismógrafo (Insight, São Paulo, Brasil), os animais foram acondicionados em uma câmara aquecida (38-39 °C), com um *cuff* de pulso pneumático acoplados na região proximal da cauda. Um esfigmomanômetro foi insuflado e desinsuflado automaticamente e o valor da PAS foi obtido através dos sinais do transdutor acoplado a um computador. Todos os animais foram adaptados ao procedimento antes da obtenção dos registros. Após o período de aclimação, onde os animais por três vezes, em dias diferentes, por dez minutos, foram submetidos à mesma situação de medida da PAS e após verificar se todas as condições estavam adequadas (posição, adaptação e relaxamento do rato; temperatura e posição do *cuff*) foram feitas três medidas para o cálculo da média aritmética da PAS de cada animal.



Figura 3: Pletismógrafo de cauda utilizado para medidas de pressão arterial sistólica (PAS).

3.5 PREPARAÇÃO DO LEITO VASCULAR MESENTÉRICO (LVM)

O leito vascular mesentérico (LVM) foi isolado segundo descrição de McGregor (1965). Após a anestesia com associação de ketamina/xilazina (100/10 mg/kg, *i.p.*), foi realizada laparotomia para permitir acessar a artéria mesentérica superior. Posteriormente a artéria mesentérica superior foi isolada e cateterizada com uma cânula de polietileno (PE50) em sua porção mais distal, enquanto sua porção mais proximal será coletada para outras finalidades. Imediatamente, por meio de uma bomba peristáltica (Ismatec AS Laboratorium Stechnik, Switzerland), o leito foi perfundido (4,0 mL/min) com solução nutritora Krebs-Henseleit modificada, gaseificada por borbulhamento com carbogênio (95% O₂, 5% CO₂) e mantida a 37°C. Então o leito como um todo foi cuidadosamente removido, liberado em sua borda dos intestinos, e colocado num banho de órgão isolado. A pressão de perfusão foi medida por meio de um transdutor de pressão (TSD104A; BIOPAC Inc., USA) conectado a um sistema de aquisição de dados (MP100; BIOPAC Inc., USA) e os dados foram registrados via software (Acqknowledge 3.9 for Windows; Biopac Inc.).

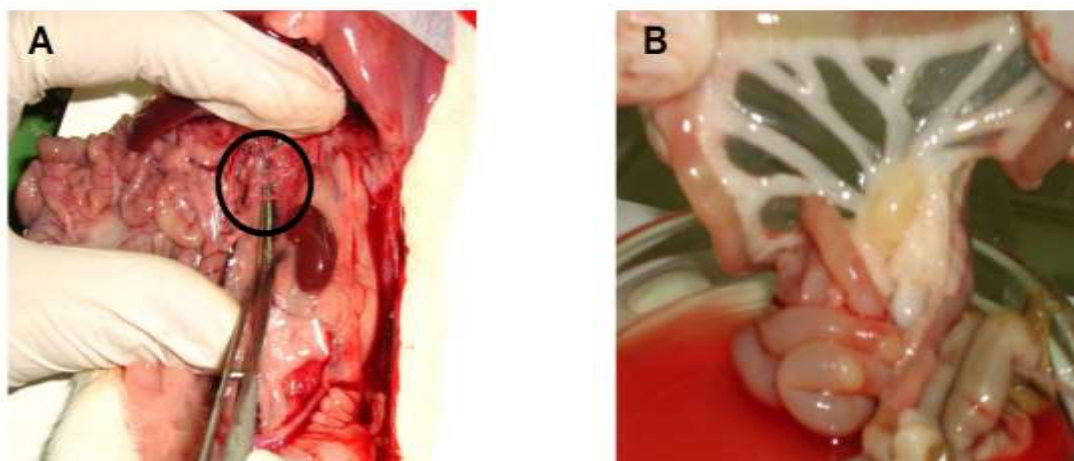


Figura 4: Fotografia da artéria mesentérica superior e do leito mesentérico. (A) artéria mesentérica superior. (B) leito mesentérico, após cateterização da artéria mesentérica, sendo perfundido pela solução nutritora. Fonte: acervo do Laboratório de Hipertensão Experimental-UFES.

3.5.1 Reatividade vascular no LVM

Para a avaliação da reatividade vascular a pressão de perfusão (PP) dos LVMs foi medida por meio de um transdutor (TSD104A - Biopac® Systems, inc.) ligado a um sistema de aquisição de dados (MP100 - Biopac® Systems, inc.) e utilizando o software AcqKnowledge 3.9.1 (Biopac Software de Aquisição e Análise de Dados). Após 30 minutos de estabilização, foram obtidas curvas concentração-resposta por injeções *in bolus* (0,1 ml, $\sim 10^{-10}$ > 10^{-2} M) de noradrenalina (NOR - Hipolabor, Belo Horizonte, MG) e (0,1 mL, 10^{-10} > 10^{-2} M) acetilcolina (ACh - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diretamente na corrente de perfusão. Para ACh, o PP basal foi previamente elevado por vasoconstrição provocada com NOR (6-30 μ M) adicionado na solução fisiológica. As respostas à NOR e ACh foram estudadas em ausência de inibidores farmacológicos (curva controle) e posteriormente, após 20 minutos de bloqueio, foram realizadas novamente em presença de inibidores. Foram utilizados os seguintes inibidores farmacológicos para o bloqueio das vias:

- N^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μ M - μ M - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) – Inibidor não seletivo da oxido nítrico sintase (NOS);

- Indometacina (INDO, 10 μ M - Farmácia Alquimia, Vitória, ES, Brasil) – Inibidor não seletivo da ciclooxigenase (COX).

3.5.2 Análise dos resultados de reatividade vascular

Para a análise de respostas de vasoconstrição induzida por fármaco, cada dose de fármaco administrada sob perfusão de pressão basal (P1) conduz a uma elevação na perfusão de pressão (P2). A resposta de vasoconstrição foi calculada como o Δ PP evocado, como se segue: Δ PP = P2-P1. Para a análise de respostas de relaxamento induzida por fármaco, a perfusão de pressão basal (P1) foi elevada (P2) constantemente pela adição de NOR na solução fisiológica. Em cada dose de fármaco administrada, a pressão elevada anterior foi reduzida (P3). O relaxamento (%) foi calculado como queda percentual no PP pela administração do fármaco em relação à pré-contração prévia de NOR, como se segue:

relaxamento (%) = $100 * (P2-P3)/(P2-P1)$. Para cada curva dose-resposta foi calculada a área abaixo da curva (AUC) e diferença entre as AUCs (dAUC) em relação AUC da curva controle.

3.6 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA POR *WESTERN BLOT*

Para análise da expressão de iNOS, TNF- α , COX-2, SOD-1, SOD-2 e Catalase. A técnica utilizada foi a de *Western Blot* sendo utilizado o sistema descrito por Laemmli (1970).

3.6.1 Extração das proteínas

Os LVMs de ratos anestesiados foram isolados e a árvore mesentérica foi dissecada e separada de seus tecidos conectivos, de forma que as os ramos de primeira, segunda, terceira e quarta ordem fossem representativos entre as amostras. Posteriormente as amostras foram armazenadas no freezer -80 ° C e mantidas até o momento da homogeneização, que foi em 150 μ L tampão de extração [Tris-HCL pH 7,4 (10 mM), PMSF (1 mM), NaVO₃ (1 mM), SDS (1%), DTT (0,5 mM), EDTA (5 mM) e coquetel de inibidor de protease Diluição 1: 100]. A homogeneização foi realizada utilizando-se um banho ultra-sônico, sendo seguida de centrifugação a 6000 rpm, 4°C por 10 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados em alíquotas a -80 °C. Este extrato total foi utilizado para realização da expressão das proteínas analisadas.

3.6.2 Dosagem das proteínas

A determinação do conteúdo de proteína total nos ramos mesentéricos foi realizada por meio do método descrito por Bradford (1976). O ensaio de Bradford foi realizado em placa de ELISA, consistindo num volume final de 200 μ L para cada poço da placa. A solução padrão foi obtida a partir de diluições de albumina do soro bovino (BSA) em água destilada com concentração estoque final de 1mg/mL. Essa solução foi diluída para

a obtenção da curva padrão com as seguintes concentrações de BSA: 0,10 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,75 mg/mL; 1,0 mg/mL; além do branco (somente água destilada). Aliquotas dos homogenatos dos ramos mesentéricos foram utilizadas como amostras. Aplicou-se 5 μ L das amostras de proteína em cada placa e adicionou-se 195 μ L de reagente Bradford. Após 5 minutos foi efetuada a leitura da absorbância no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro. Todas as amostras foram feitas em duplicata.

3.6.3 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)

Foram realizados testes preliminares de forma a alcançar e estabelecer as melhores condições de separação, qualidade da banda e diluições do anticorpo e assim obter uma melhor otimização das condições do *Western Blot*. Foi feita a eletroforese em gel (acrilamida/bisacrilamida 30%), com gel de separação a 10% nos extratos proteicos 25 μ g. O gel de separação foi preparado em tampão contendo 1,5 M tris-HCl pH 8,6 e 0,1% de SDS e o gel de empacotamento a 4% em tampão 0,5 M tris-HCl pH 6,8 e 0,1% de SDS. As amostras foram aplicadas nos géis na presença de tampão de amostra (Tris-HCl, SDS, DTT e azul de bromofenol). Antes da aplicação no gel as amostras foram aquecidas a 100 °C durante 5 min. A eletroforese foi realizada utilizando-se o tampão de eletroforese (25 mM de tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS), sendo esta realizada inicialmente em 60 volts por 30 minutos e posteriormente em 80 volts até a finalização da separação.

3.6.4 Transferência das proteínas

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

3.6.5 Incubação dos anticorpos

Após a transferência das bandas de proteínas, as membranas de nitrocelulose, foram incubadas por 4 h em uma solução de leite livre de gorduras (5%) em tampão TBS- tween 0,1% (20 mM de tris-HCl pH 7,4 e 150 mM de NaCl), 4 °C sob agitação leve para realização do bloqueio de sítios inespecíficos. Em seguida, foi realizada a incubação com os seguintes anticorpos primários: anti-iNOS (1:500, BD Transduction Laboratories); anti-COX-2 (1: 200, Cayman Chemical); anti-TNF- α (1:200, Santa Cruz, Biotecnologia), anti-SOD-1 (1:2000, Sigma Aldrich), anti-SOD-2 (1:1000, BD Transduction Laboratories), anti-Catalase (1:20000, Sigma Aldrich) anti- β -actina (1: 1500, Santa Cruz Biotecnologia) *overnight* à 4 °C sob agitação leve.

Após este período, as membranas foram lavadas em tampão TBS-tween 0,1%, sob agitação leve em temperatura ambiente (aproximadamente 20 a 24°C) e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1: 5000, Abcam Inc) por 1 hora, à temperatura ambiente (aproximadamente 20 a 24°C), sob agitação suave, seguida de lavagem com tampão TBS-tween 0,1%, e posteriormente com tampão TBS. Para a detecção da ligação proteína-anticorpo foi realizada a incubação das membranas com ECL para geração de sinal fluorescência enzimática e depois foram analisadas em ChemiDoc Imaging Systems (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Os sinais de imunoblot foram quantificados utilizando o software Bio-Rad Image Lab 5.2.1 e os níveis de expressão das proteínas foram normalizados para β -actina. Os dados são de quatro experimentos independentes (Géis).

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). As curvas dose-resposta foram analisadas por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido do teste de Bonferroni e para as demais comparações foi utilizado ANOVA de uma via seguido do teste de Bonferroni ou Tukey, ambos analisados via software (Graphpad Prism, versão 8.0, GraphPad, EUA). O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 PARÂMETROS PONDERAIS

Os animais iniciaram o protocolo experimental com peso corporal semelhante. Ao final de 6 semanas, os grupos CON e FRU não tratados apresentaram peso corporal semelhante, animais tratados com espironolactona seguiram o mesmo padrão, enquanto animais tratados com enalapril tiveram menor peso corporal final e tiveram menor ganho de peso (figura 5A-B).

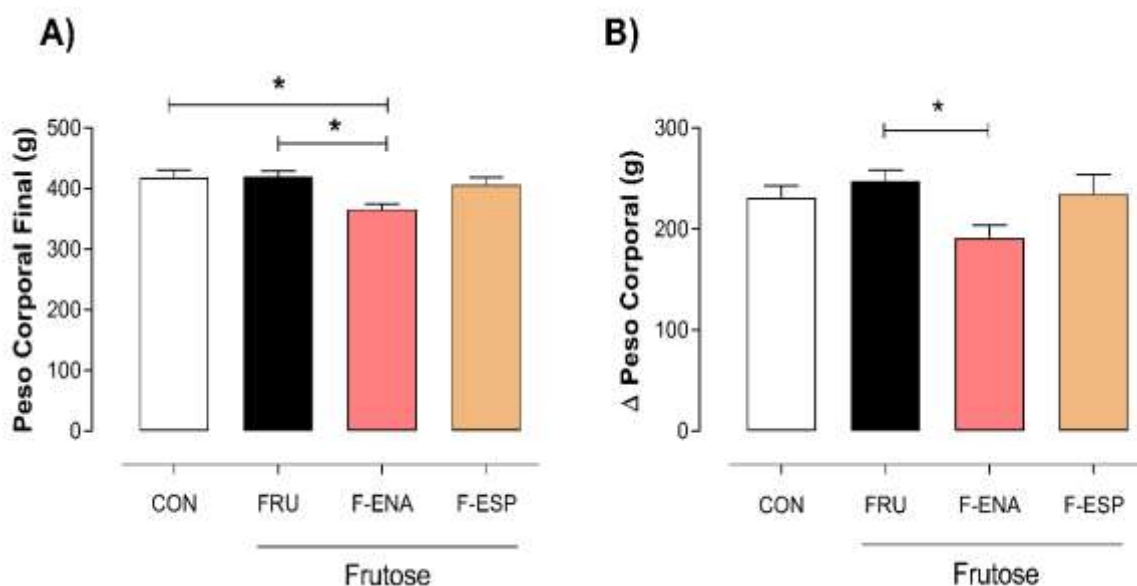


Figura 5: Parâmetros básicos. Valores de peso corporal em gramas (g) nos grupos (○) CON, (●) FRU, (□) F-ENA (▪) F-ESP, ao final de 6 semanas de seguimento. (A) Valores de peso corporal final. (B) Delta do peso corporal (Ganho de peso). Dados foram expressos como média ± EPM, n= (10) por grupo. *p<0,05 entre os grupos.

Embora observada tendência em aumento na deposição das gorduras analisadas de forma isolada (Figura 6A-C), pela frutose as diferenças estatísticas foram evidenciadas apenas na gordura visceral, onde os animais submetidos à dieta rica em frutose apresentaram aumento da gordura visceral (Figura 6D), que foi fortemente neutralizado pelo enalapril, mas não pela espironolactona. Além disso, o enalapril teve menor acúmulo da gordura mesentérica quando comparado ao grupo FRU.

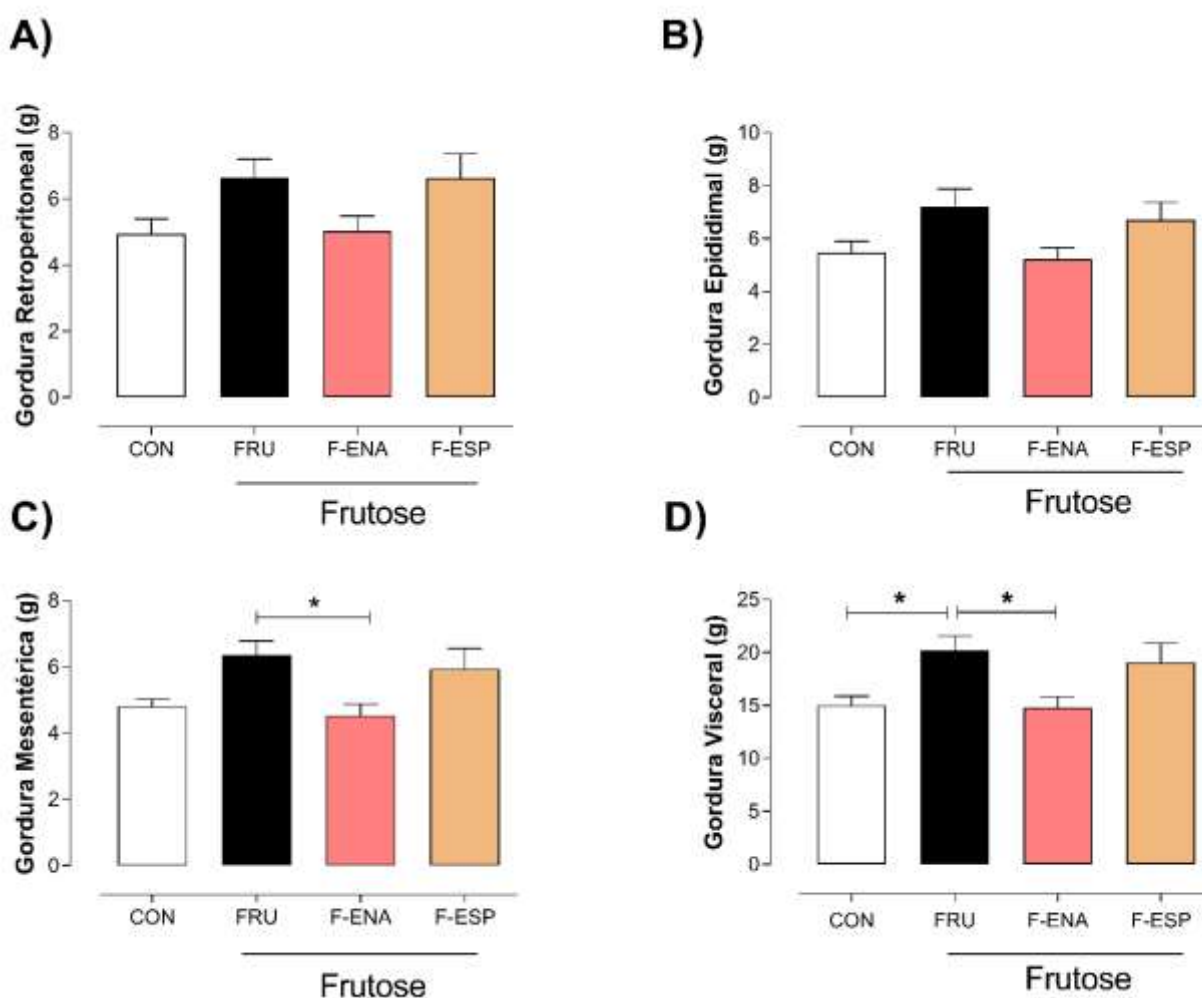


Figura 6: Deposição de gordura em gramas (g) nos grupos (○) CON, (●) FRU, (□) F-ENA (■) F-ESP, ao final de 6 semanas de seguimento. (A) Valores de gordura Retroperitoneal. (B) Gordura Epididimal. (C) Gordura mesentérica. (D) Gordura Visceral. Dados foram expressos como média ± EPM, n= (10) por grupo. *p<0,05 entre os grupos.

4.2 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS)

Em nosso estudo não houve alterações nos valores da pressão arterial sistólica. Nem a sobrecarga de frutose nem os tratamentos farmacológicos promoveram alterações pressóricas durante o protocolo experimental (figura 7A-B).

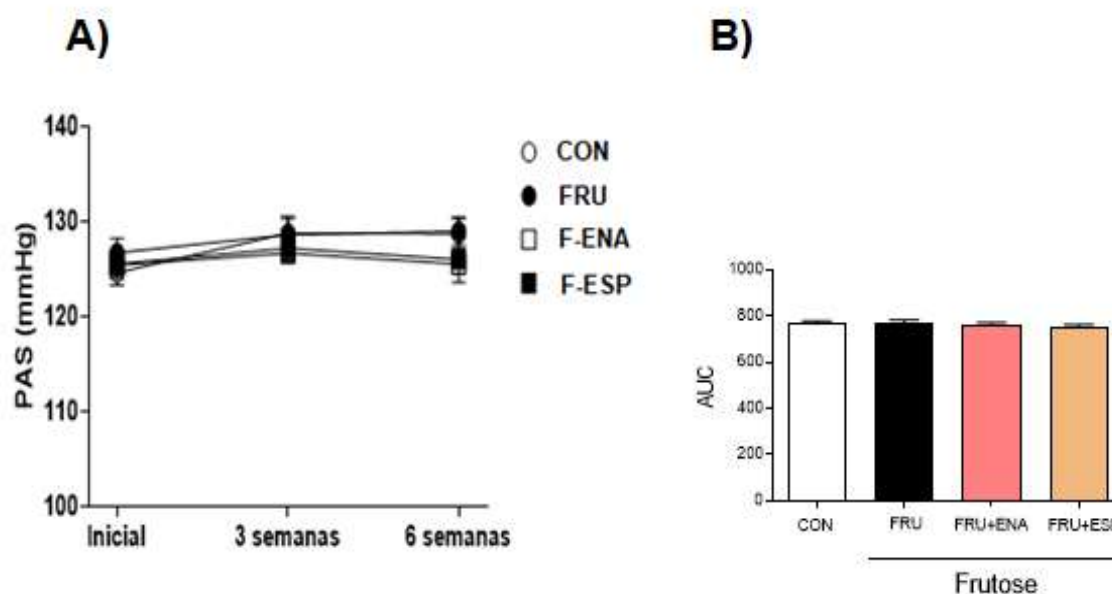


Figura 7: Pressão Arterial Sistólica nos grupos (○) CON, (●) FRU, (□) F-ENA e (■) F-ESP. Dados foram expressos como média \pm EPM, n= (10) por grupo.

4.3 CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS

4.3.1 Glicemia de jejum

A glicemia de jejum foi analisada no início do estudo, e foi acompanhada durante o protocolo, na terceira e sexta semana. Conforme apresentado na figura 8, todos os animais partiram de valores iguais de glicemia. Após três semanas de sobrecarga de frutose, observou-se aumento da glicemia de jejum que perdurou até o final do seguimento.

Embora os animais tenham sido mantidos por seis semanas com frutose 10% em água potável, somente a partir da terceira semana foram iniciados os tratamentos farmacológicos com enalapril ou com espironolactona, que durou 21 dias. Assim, as

diferenças entre os grupos FRU, F-ENA e F-ESP foram evidenciadas somente a partir da terceira semana de estudo. A espironolactona reduziu ligeiramente os valores de glicemia de jejum ao final do protocolo, enquanto o enalapril não teve efeito (Figura 8).

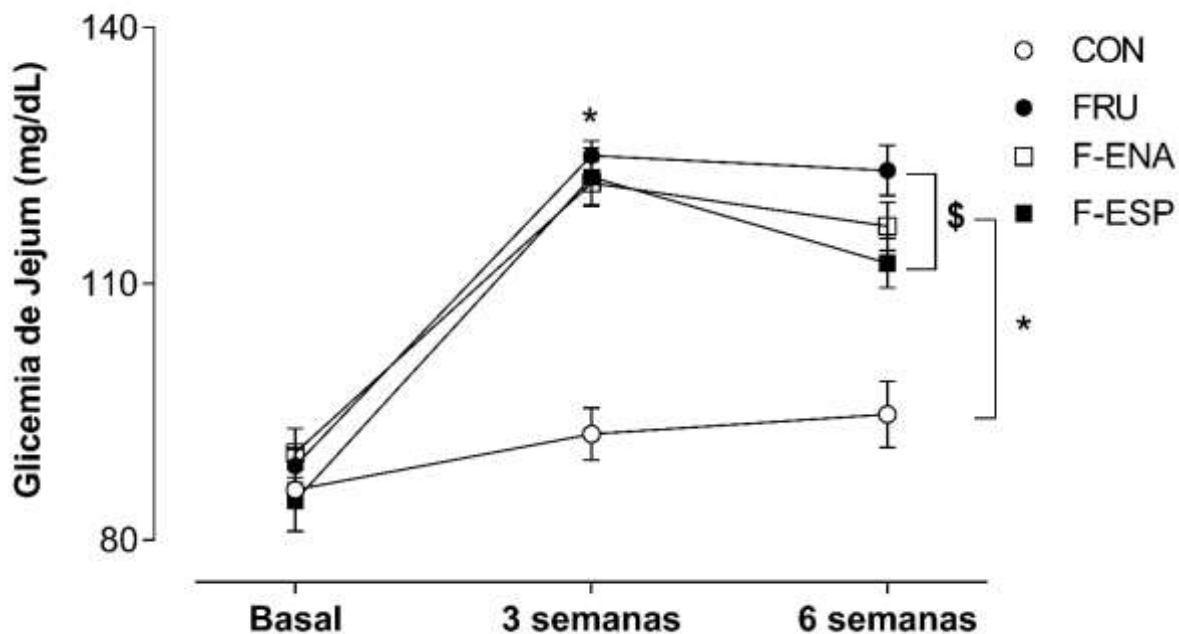


Figura 8: Glicemia após 12h de jejum nos grupos (○) CON, (●) FRU, (□) F-ENA (■) F-ESP. Dados foram expressos como média \pm EPM, $n = (10)$ por grupo. * $p < 0,05$ vs. CON; \$ $p < 0,05$ FRU vs. F-ESP.

4.3.2 Teste de Tolerância à Glicose

Para avaliar a sensibilidade à glicose foi realizado um teste de tolerância à glicose por injeção de solução de alta concentração de glicose (2g/kg, *ip*). A figura 9A mostra o decurso no tempo da glicose no sangue após da injeção da solução.

O teste de tolerância à glicose mostrou um deslocamento para cima na curva de glicose no sangue naqueles com sobrecarga de frutose (Figura 9A), com aumento da área abaixo da curva (AUC) no grupo FRU (Figura 9B), mostrando que a tolerância à glicose está reduzida no grupo FRU uma vez que este grupo mostrou uma menor capacidade em reduzir a glicose no sangue no decorrer do tempo ao longo do teste, enquanto os tratamentos neutralizaram modestamente esse efeito (Figura 9B).

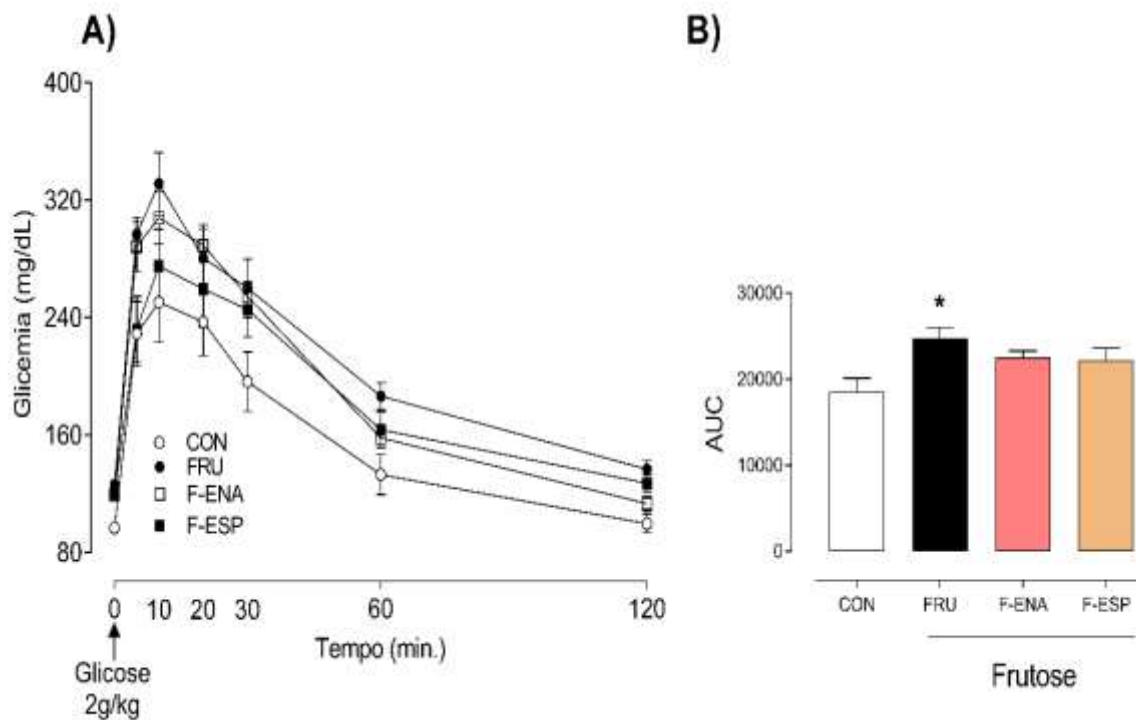


Figura 9: Teste de tolerância a glicose nos grupos (○) CON, (●) FRU, (□) F-ENA e (■) F-ESP. (A) Curva do teste de tolerância a glicose. (B) AUC do teste de tolerância a glicose. Dados foram expressos como média ± EPM, n= (10) por grupo. *p<0,05 vs. CON.

4.3.3 Teste de Sensibilidade à Insulina

Para avaliar a sensibilidade à insulina foi realizado o monitoramento dos níveis de glicose no sangue após a injeção de insulina exógena (1U/kg, *ip*). A sensibilidade à insulina foi prejudicada pela sobrecarga de frutose, como visto pelo declínio da curva (Figura 10A). A AUC está aumentada no grupo FRU e F-ESP mostrando uma menor capacidade destes grupos em reduzir a glicose no sangue mesmo após a ingestão de insulina o que demonstra menor sensibilidade à insulina nestes animais. (Figura 10B). A comparação entre os valores de AUC mostra que o enalapril, mas não a espironolactona, melhorou esse desfecho (Figura 10B), sugerindo um envolvimento do SRAA, especialmente da angiotensina-II, nessas anormalidades metabólicas.

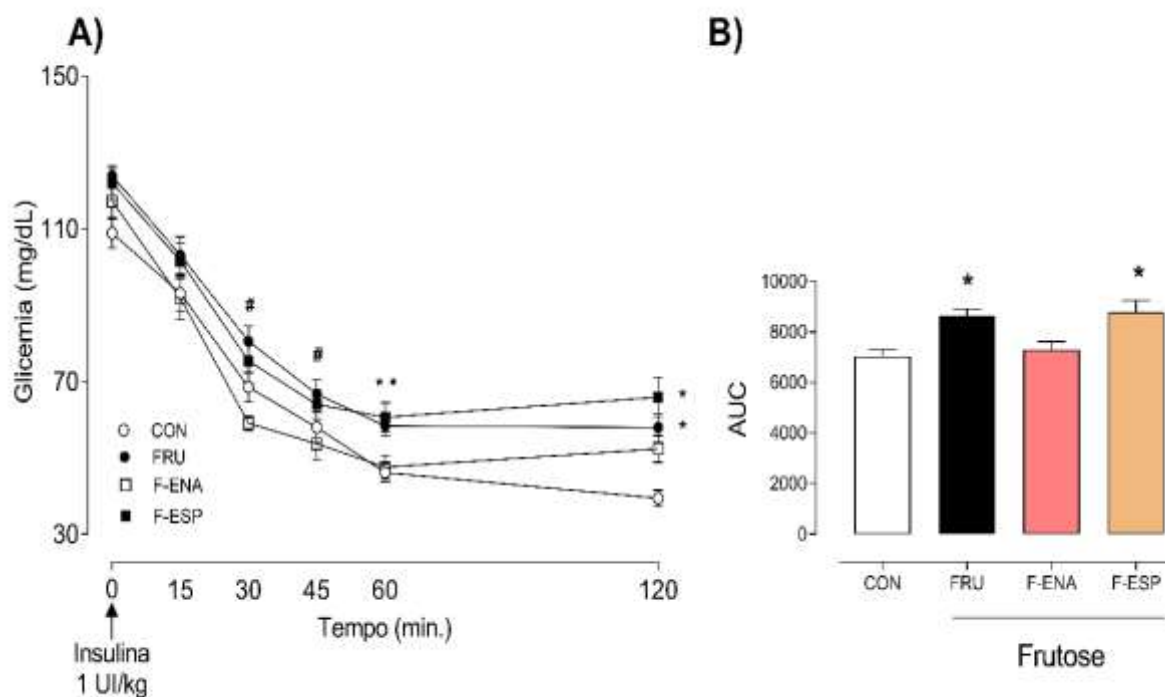


Figura 10: Teste de sensibilidade a insulina nos grupos (○) CON, (●) FRU, (□) F-ENA e (■) F-ESP. (A) Curva do teste de sensibilidade a insulina. (B) AUC do teste de sensibilidade a insulina. Dados foram expressos como média ± EPM, n= (10) por grupo. *p<0,05 vs. CON; #p<0,05 vs. F-ENA.

Tomados em conjunto estes dados mostraram que a frutose promoveu aumento na AUC dos testes de tolerância à insulina e glicose (Figura 9 e 10) indicando resistência à insulina. Os tratamentos promoveram melhoras parciais dos testes avaliados. Sendo que a espironolactona melhorou a sensibilidade a glicose no pico da curva glicêmica enquanto o enalapril parece ter sido mais eficiente em melhorar a sensibilidade a insulina.

4.3 REATIVIDADE VASCULAR DO LEITO MESENTÉRICO

4.3.1 Reatividade Vascular em resposta à NOR

Para avaliar a função vascular mesentérica, construímos curvas concentração-resposta à NOR. A resposta mediada pela NOR (Figura 11) produziu contração no LVM dependente da concentração da droga em todos os grupos estudados.

A curva de vasoconstrição induzida por NOR está aumentada em ratos alimentados com frutose como observado (Figura 11A-B) pelo desvio da curva para esquerda e no maior valor da área abaixo da curva (AUC). O enalapril foi capaz de prevenir totalmente as alterações promovidas pela frutose na contração à NOR enquanto este parâmetro permaneceu inalterado pela espironolactona, conforme confirmado pelas AUCs (Figura 11A-B).

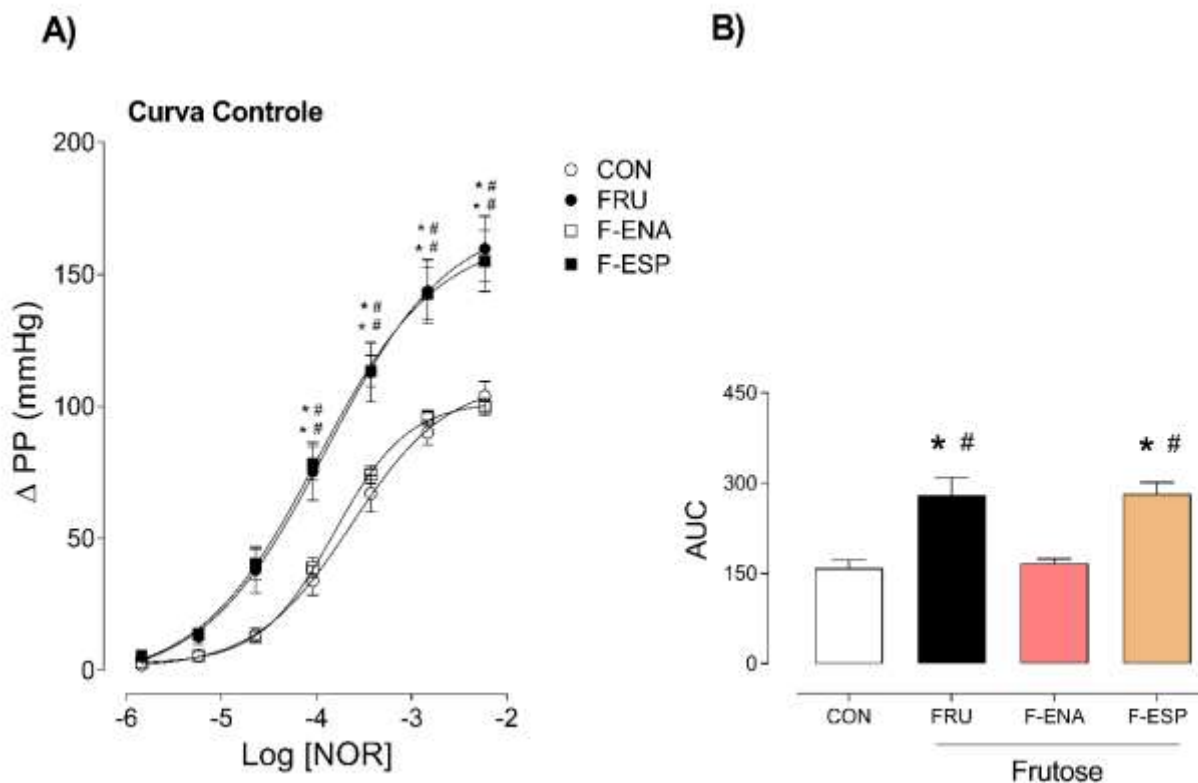


Figura 11: Efeitos da ingestão de frutose e tratamentos farmacológicos na curva concentração-resposta de vasoconstrição induzida por NOR no leito vascular mesentérico dos grupos (○) CON, (●) FRU, (□) F-ENA e (■) F-ESP na ausência de inibidores. (A) Curva controle de NOR. (B) Área abaixo da curva (AUC) da curva controle de NOR. Dados foram expressos como média \pm EPM, $n=14$ por grupo, $*p<0,05$ vs. CON; $\#p<0,05$ vs. F-ENA.

Conforme esperado a incubação com o inibidor L-NAME potencializou a ação da NOR em todos os grupos quando comparados as curvas na ausência do inibidor (Figura 12A-C). Além disso, podemos observar que este aumento na contração evocado pelo bloqueio com L-NAME apresenta uma magnitude semelhante nos grupos mantendo as diferenças entre os grupos observadas nas curvas controle (na ausência de L-NAME) (Figura 12A-C).

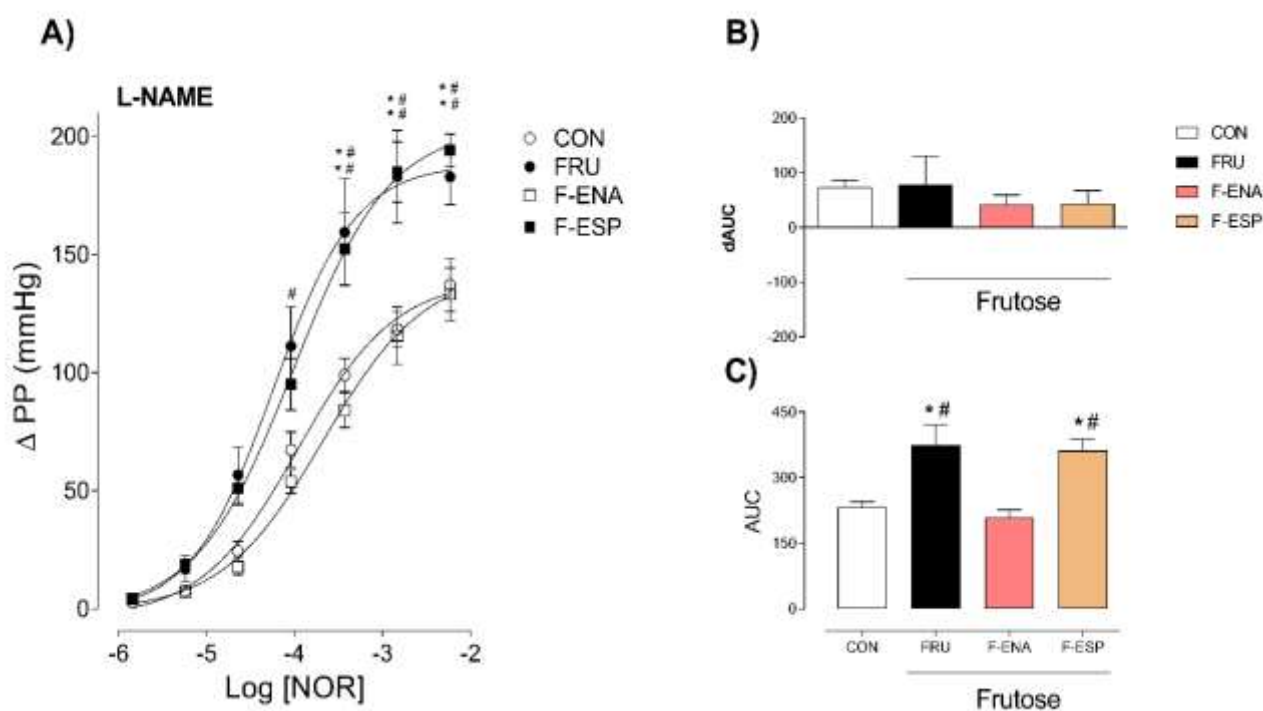


Figura 12: Efeitos da ingestão de frutose e tratamentos farmacológicos na curva concentração-resposta de vasoconstrição induzida por NOR no leito vascular mesentérico dos grupos (○) CON, (●) FRU, (□) F-ENA e (■) F-ESP na presença de L-NAME. (A) Curva de NOR na presença de L-NAME. (B) Diferença de Área abaixo da curva (dAUC) na presença e na ausência de L-NAME e Área abaixo da curva (AUC) da curva dos grupos após inibição com L-NAME. Dados foram expressos como média \pm EPM, n=7 por grupo, *p<0,05 vs. CON ; #p<0,05 vs. F-ENA.

Por outro lado, a inibição da COX pela indometacina levou a redução das respostas vasoconstritoras em todos os grupos (Figura 13A-B), e as diferenças entre os grupos não foram mais observadas, sugerindo importante participação desta via nas diferenças antes observadas entre os grupos. Após o bloqueio com INDO a redução na resposta foi maior no grupo FRU e F-ESP, que partiram de valores maiores e se igualaram aos demais grupos conforme mostrado dAUC antes e após e inibição com INDO (Figura 13B).

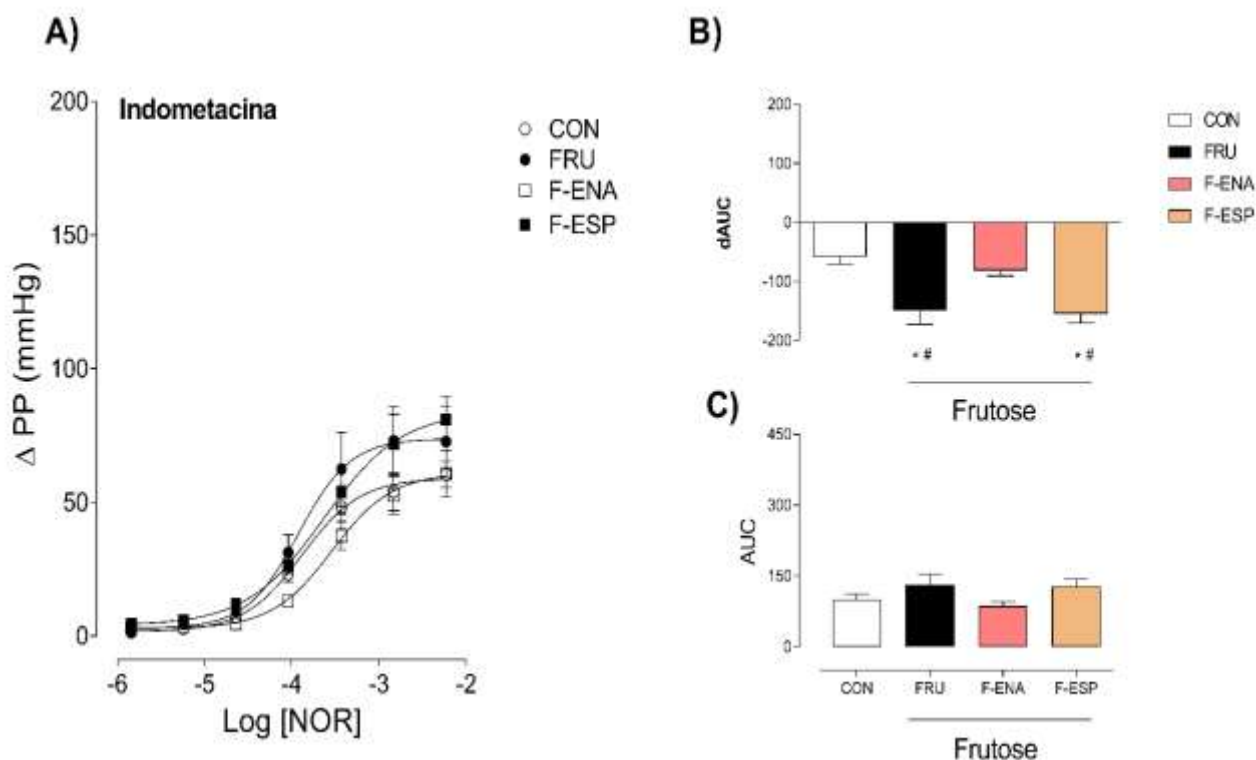


Figura 13: Efeitos da ingestão de frutose e tratamentos farmacológicos na curva concentração-resposta de vasoconstrição induzida por NOR no leito vascular mesentérico dos grupos (○) CON, (●) FRU, (□) F-ENA e (■) F-ESP na presença de Indometacina (INDO). (A) Curva de NOR na presença de INDO. (B) Diferença de Área abaixo da curva (dAUC) na presença e na ausência de INDO e Área abaixo da curva (AUC) da curva dos grupos após inibição com INDO. Dados foram expressos como média ± EPM, n=7 por grupo, *p<0,05 vs. CON ; #p<0,05 vs. F-ENA.

De modo geral, as diferenças entre os grupos foram mantidas após a inibição da óxido nítrico sintase e desapareceram após a inibição da COX, mostrando que, pelo menos no início, tais diferenças estavam relacionadas aos prostanóides constritores endoteliais.

Nossos resultados, até o momento, mostraram que apenas a inibição da ECA pelo enalapril foi capaz de anular esse efeito, enquanto o bloqueio do receptor de mineralocorticóides pela espironolactona não foi efetivo neste parâmetro.

4.3.2 Reatividade vascular em resposta à ACh

As respostas de relaxamento evocadas pela ACh foram expressas como porcentagem de relaxamento à pré-contracção obtida pela noradrenalina.

A resposta mediada pela ACh (Figura 14 A-B) produziu relaxamento no LVM dependente da concentração da droga em todos os grupos estudados e não foram detectadas diferenças entre os grupos.

Como relatamos anteriormente, a frutose não altera a resposta de relaxamento à acetilcolina em nossas condições experimentais. No presente estudo observamos que nem enalapril nem espironolactona afetaram a resposta de relaxamento em condições basais (Figura 14 A-B).

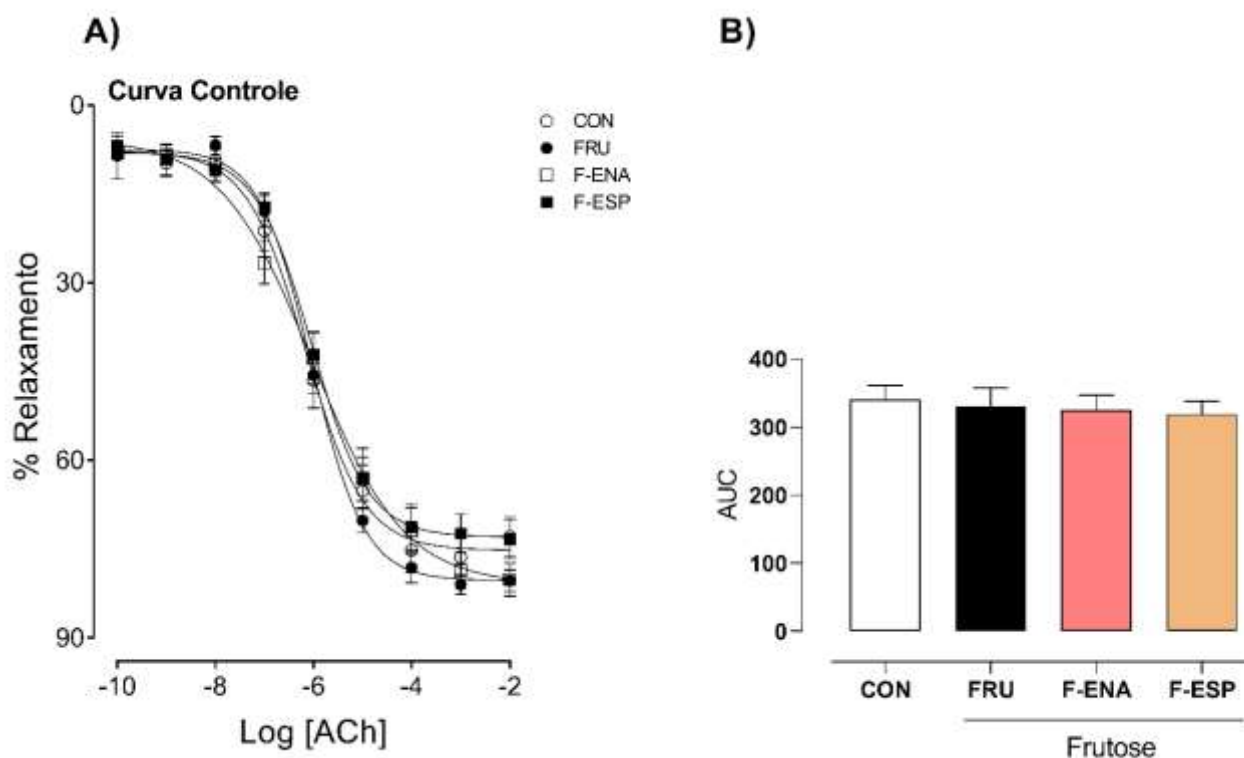


Figura 14: Efeitos da ingestão de frutose e tratamentos farmacológicos na curva concentração-resposta de relaxamento induzido por ACh no leito vascular mesentérico dos grupos (○) CON, (●) FRU, (□) F-ENA e (■) F-ESP na ausência de inibidores. (A) Curva controle de ACh. (B) Área abaixo da curva (AUC) da curva controle de ACh. Dados foram expressos como média \pm EPM, $n=14$ por grupo.

A incubação com L-NAME reduziu acentuadamente o relaxamento induzido por ACh (Figura 15 A-B) demonstrando a participação da via do NO no relaxamento do LVM de todos os grupos estudados e não houve diferença entre os grupos.

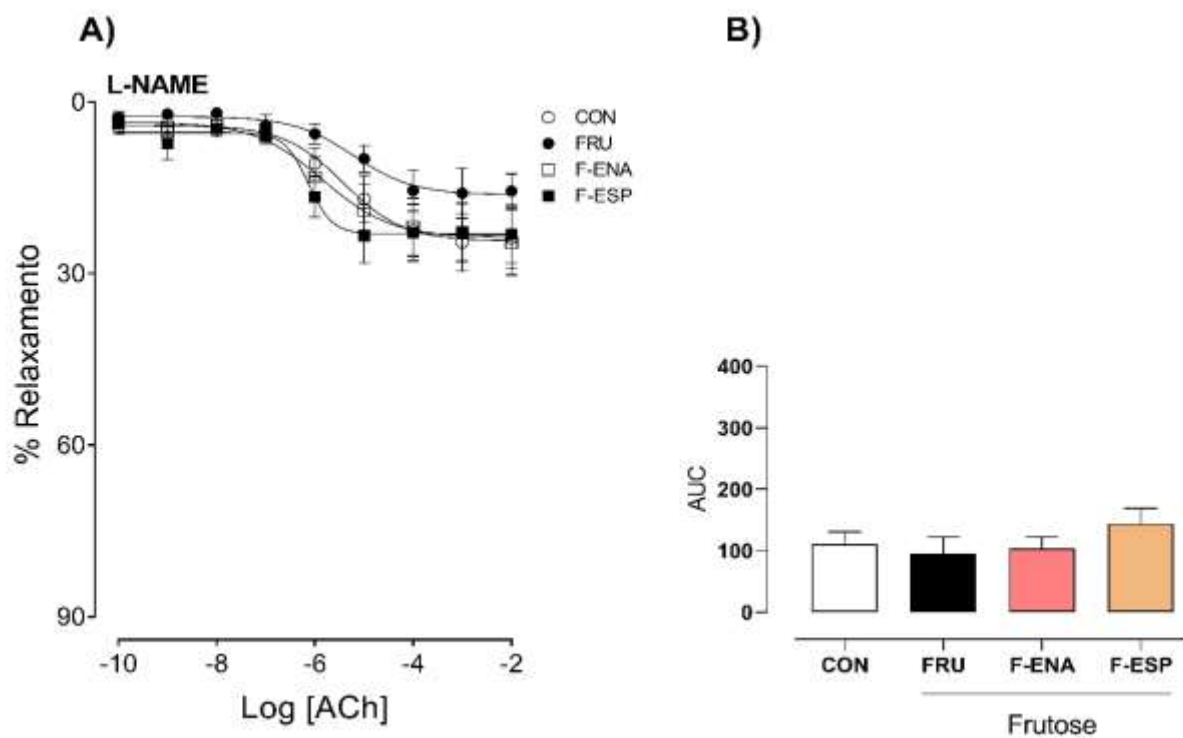


Figura 15: Efeitos da ingestão de frutose e tratamentos farmacológicos na curva concentração-resposta de relaxamento induzido por ACh no leito vascular mesentérico dos grupos (○) CON, (●) FRU, (□) F-ENA e (■) F-ESP na presença de L-NAME. (A) Curva de ACh na presença de L-NAME. (B) Área abaixo da curva (AUC) da curva dos grupos após inibição com L-NAME. Dados foram expressos como média \pm EPM, $n=7$ por grupo.

O bloqueio com INDO levou a diminuição do relaxamento induzido por ACh em todos os grupos (Figura 16 A-B) demonstrando que esta via também apresenta participação no relaxamento do LVM de todos os grupos estudados. Não houve diferença entre os grupos.

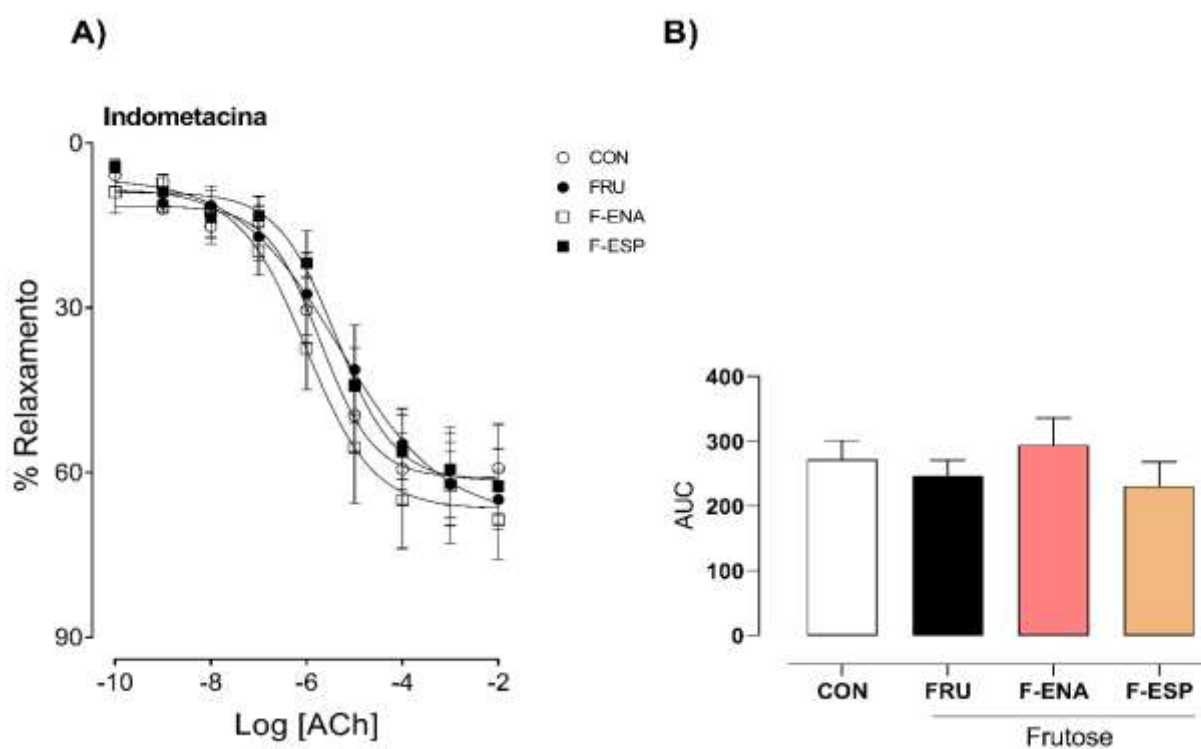


Figura 16: Efeitos da ingestão de frutose e tratamentos farmacológicos na curva concentração-resposta de relaxamento induzido por ACh no leito vascular mesentérico dos grupos (○) CON, (●) FRU, (□) F-ENA e (■) F-ESP na presença de Indometacina (INDO). (A) Curva de ACh na presença de INDO. (B) Área abaixo da curva (AUC) da curva dos grupos após inibição com INDO. Dados foram expressos como média ± EPM, n=7 por grupo.

4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE VASOS MESENTÉRICOS

A análise da expressão proteica foi realizada por *Western Blot*. Em relação a expressão tecidual nas artérias mesentéricas, não houve diferença entre os grupos nos níveis das proteínas pró-inflamatórias iNOS, TNF α e COX-2 (figura 17A-B-C).

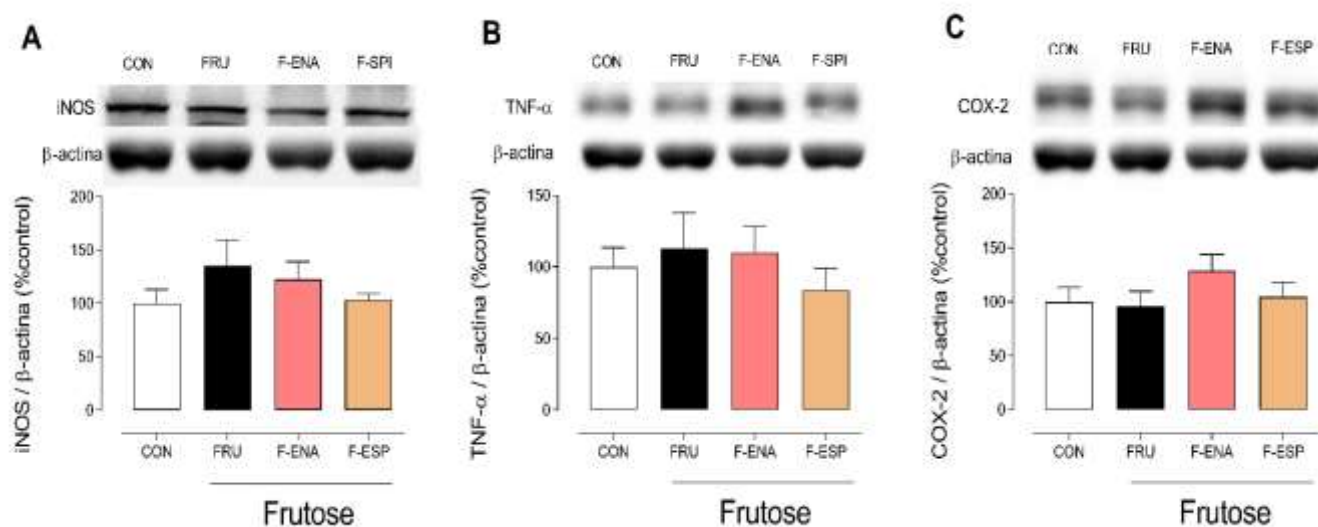


Figura 17: Efeitos do enalapril e espironolactona na expressão de proteínas em ramos vasculares mesentéricos de ratos com sobrecarga de frutose. (A) iNOS, (B) TNF α , (C) COX-2. Os dados são expressos como média \pm EPM, n= 8 por grupo.

Em relação as proteínas do sistema antioxidante, a frutose reduziu os níveis de SOD-1, que foram apenas levemente afetados pelo bloqueio do SRAA por ambas as drogas aqui utilizadas (Figura 18A). Os níveis de SOD-2 e Catalase permaneceram inalterados, mas com tendências de alterações (Figura 18B-C). Nesse sentido, calculamos um índice global representando o sistema de defesa antioxidante somando os níveis de expressão dessas três proteínas que o compõem, o que destacou o comprometimento causado pela sobrecarga de frutose e um efeito modesto dos tratamentos (Figura 18D).

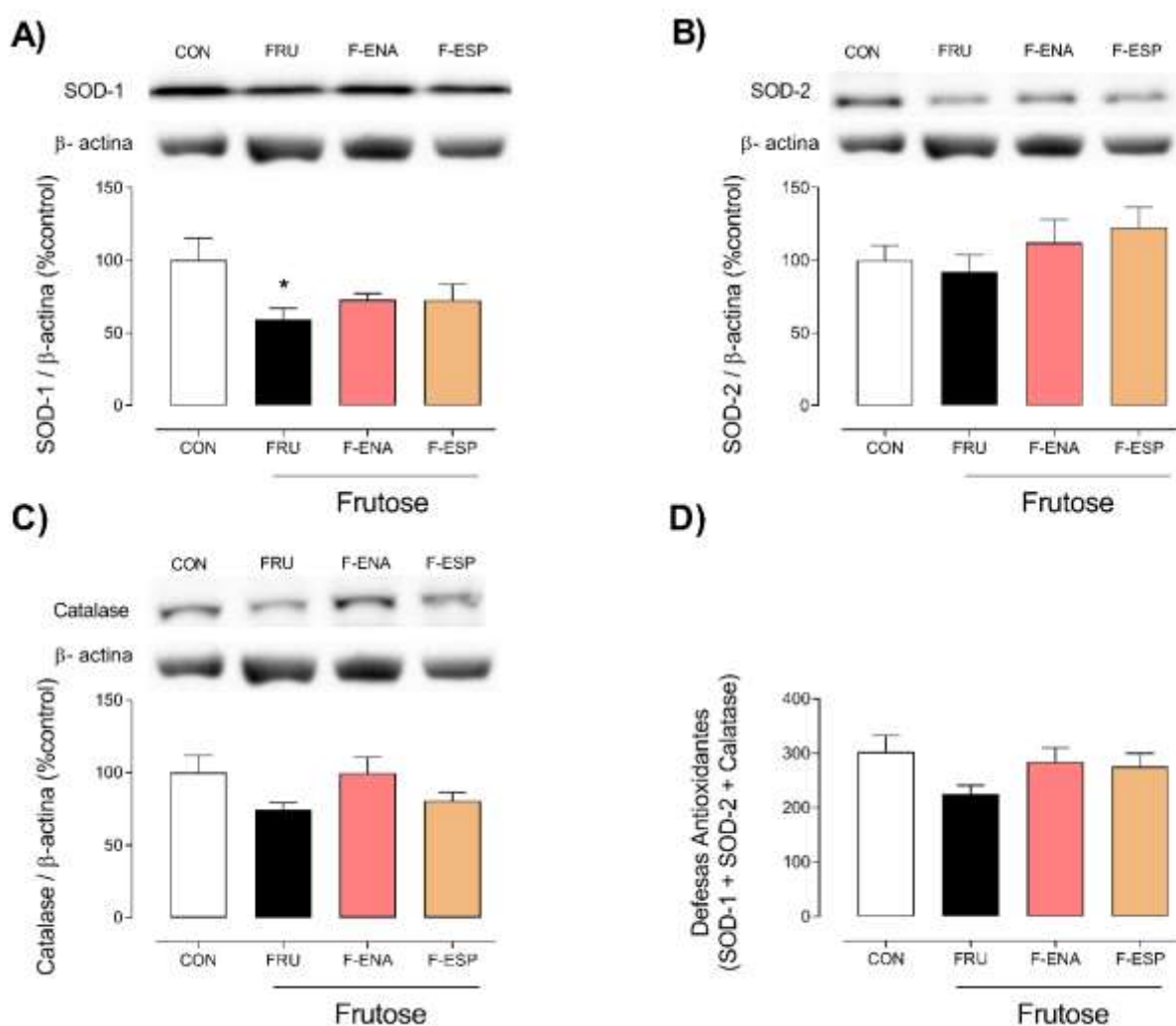


Figura 18: Efeitos do enalapril e espironolactona na expressão de proteínas em ramos vasculares mesentéricos de ratos com sobrecarga de frutose. (A) SOD-1, (B) SOD-2, (C) Catalase e (D) Defesa Antioxidante Global. Os dados foram expressos como média \pm EPM, $n = 8$ por grupo. * $p < 0,05$ vs. CON.

5 DISCUSSÃO

Em estudo anterior nosso grupo mostrou que a ingestão elevada de frutose em ratos por seis semanas leva a distúrbio metabólico associado à resistência à insulina e aumento de gordura visceral, sem hipertensão, semelhante aos estágios iniciais da SM. Essas alterações metabólicas foram acompanhadas de aumento da vasoconstrição relacionada aos prostanóides constritores (Sousa et al., 2017). No presente estudo, exploramos o papel do SRAA nessas alterações, mostrando grande envolvimento da angiotensina-II de acordo com os efeitos do enalapril, enquanto os mineralocorticóides parecem pouco envolvidos pela falta de resposta à espironolactona.

A sobrecarga de frutose, embora não tenha levado ao aumento do peso corporal, induziu o acúmulo de gordura visceral e resistência à insulina, conforme relatado anteriormente e por outros autores (Sousa et al., 2017; Kim et al., 2020). O aumento da gordura visceral é consistente com o metabolismo hepático da frutose que pode aumentar a lipogênese hepática e aumentar os níveis de triglicerídeos e levar a dislipidemia, resistência à insulina e síndrome metabólica (Bray et al., 2007; Stanhope et al., 2016). Além disso, tem sido bem descrito que a obesidade e/ou o acúmulo de gordura visceral estão associados ao estado de RI, que é um importante fator de risco para DCV (Ginsberg et al., 2000).

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

O enalapril, mas não a espironolactona, reduziu o peso corporal e a adiposidade central, sugerindo que a angiotensina-II pode estar envolvida nas anormalidades causadas pela frutose e que os parâmetros melhorados nos animais tratados com enalapril, podem ao menos em parte ter relação com a redução da gordura corporal. De fato, muitos estudos mostraram efeitos semelhantes de IECAs ou bloqueadores de AT1 em diferentes condições (Al-Thanoon & Mahmood, 2012; Arivazhahan et al., 2017). Tanto o enalapril

quanto a losartana reduziram significativamente marcadores da SM em pacientes hipertensos recém-diagnosticados (Al-Thanoon & Mahmood, 2012). Além do uso como anti-hipertensivo, o enalapril vem sendo considerado como importante componente de esquemas terapêuticos para combater o ganho de peso, hiperglicemia e dislipidemia observados na SM e estes efeitos parecem ser dose-dependente. Em modelo experimental de SM induzida por olanzapina em ratos Wistar o enalapril na dose de 20 mg/kg/dia mostrou-se eficaz na reversão do ganho de peso, hiperglicemia e hipercolesterolemia, sem alterações nos triglicerídeos, lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL). Enquanto a dose 10 mg/kg/dia de enalapril preveniu qualquer aumento adicional no peso corporal, glicemia, colesterol total e triglicerídeos séricos, já na dose 1 mg/kg/dia de enalapril foi ineficaz (Arivazhahan et al., 2017).

A ativação do sistema renina-angiotensina SRAA tem sido relacionada a vários aspectos da SM. Frantz e colaboradores (2014) mostraram efeitos comparativos dos bloqueadores do SRAA em modelo de RI induzida por dieta e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) em camundongos C57BL/6. Neste estudo foram utilizados alisquireno (50 mg/kg/dia), enalapril (30 mg/kg/dia) ou losartana (10 mg/kg/dia) por 6 semanas e todos os tratamentos restauraram a regulação positiva do SRAA hepático. Entretanto somente o tratamento com enalapril, mas não com alisquireno ou losartana, foi eficaz na melhora da leptina, intolerância à glicose, RI, esteatose hepática e triglicerídeos e na prevenção do aumento dos níveis de proteína hepática de fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), glicose 6-fosfatase (G6Pase) e do transportador de glicose GLUT-2. O enalapril foi o tratamento de maior sucesso na proteção contra RI hepática e DHGNA, aumentando a ação hepática da insulina, leptina e gliconeogênese e reduzindo a via lipogênica e o acúmulo de lipídios no fígado (Frantz et al., 2014). Estes dados corroboram os nossos onde o enalapril também se mostrou mais eficiente em melhorar os parâmetros estudados, apontando para um papel importante da Ang II nas alterações avaliadas, uma vez que ao utilizar um IECA os resultados encontrados são mais promissores do que com o bloqueio do SRAA em outros componentes.

Semelhantemente a RI e a hiperlipidemia há diversos estudos relacionando o consumo excessivo de frutose e a hipertensão (Hwang et al., 1987; Vasdev et al., 2002; Kim et al., 2010). No presente estudo a pressão arterial (PA) permaneceu inalterada em animais tratados com frutose, o que já foi demonstrado pelo nosso grupo (Sousa et al., 2017) e por outros estudos (Bezerra et al., 2001; D'Angelo et al., 2005), enquanto outros pesquisadores encontraram PA aumentada (Vasdev et al., 2002; Kim et al., 2010; Shaligram et al., 2018; Kim et al., 2020). Esse conflito vem sendo atribuído a componentes da dieta (Santuré et al., 2002; Nishimoto et al., 2002; Shapiro et al., 2008), diferentes linhagens e idade dos animais (Kotchen et al., 1997), diferentes técnicas usadas para medir a pressão arterial (Brands et al., 1994; D'Angelo et al., 2005) bem como o tempo de exposição à frutose.

Apesar das incertezas quanto aos mecanismos pelo qual o consumo de frutose pode produzir elevação da PA, diversas possibilidades foram propostas por Abdulla et al. (2011), incluindo atenuação do baroreflexo e aumento da atividade do sistema nervoso simpático (DeAngelis, 2012), elevação de catecolaminas circulantes (Tran et al., 2009), elevação da atividade do sistema renina-angiotensina (Kobayashi et al., 1993), reabsorção de sódio aumentada (Baum, 1987), produção aumentada de ácido úrico (Nakagawa et al., 2006) e disfunção endotelial (Takagawa et al., 2002). Além disso há evidência de que hiperinsulinemia, isoladamente, pode causar hipertensão, uma vez que administração de insulina pode elevar pressão sanguínea de ratos (Brands et al., 1991; 1992). Aqui, o efeito nulo do bloqueio do SRAA na PA pode ser explicado pelo fato desses animais permanecerem normotensos após 6 semanas de sobrecarga de frutose. Além disso é importante destacar que os resultados obtidos com os tratamentos nos outros parâmetros avaliados em nosso estudo, são independentes de alterações na PA, uma vez que não houve alterações pressóricas nem com a sobrecarga de frutose e nem com o uso dos tratamentos farmacológicos.

Além disso, embora não analisado por nosso grupo, é importante ressaltar que diversos estudos com humanos demonstram que a frutose pode induzir aumento do ácido úrico, resultado do seu próprio metabolismo (Fox & Kelley, 1972; Emmerson, 1974; Turner et al., 1979). Essa alta quantidade de ácido úrico pode promover danos oxidativos como proliferação de células musculares lisas e endoteliais, liberação de substâncias pró-inflamatórias e redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (Dornas et al., 2015). Assim, quando há diminuição de NO, a captação de glicose diminui e mais insulina é

segregada para compensar, ocorrendo hiperinsulinemia e RI (Heinig & Johnson, 2006; Nakagawa et al., 2005). O ácido úrico também pode induzir RI por seus efeitos diretos no adipócito como aumento do estresse oxidativo, resposta pró-inflamatória e a diminuição de adiponectina (Johnson et al., 2009). Por outro lado, a diminuição das concentrações de ácido úrico melhora função do endotélio, enquanto a disfunção endotelial induzida por ácido úrico com diminuição da produção de NO pode participar no desenvolvimento da RI em ratos alimentados com frutose (Butler et al., 2000; Doehner et al., 2002; Farquharson et al., 2002). Assim, podemos destacar que tanto a frutose como o ácido úrico apresentam importante participação no desenvolvimento da SM.

A resistência à insulina e a hiperinsulinemia podem ser responsáveis pela disfunção endotelial e, assim, participar da elevação da pressão arterial. Mais importante ainda, a hiperatividade do sistema nervoso simpático devido à ingestão de frutose tem sido associada à resistência à insulina e pode contribuir para o aparecimento e manutenção de complicações cardiovasculares e renais (Abdulla et al., 2011). A Figura 19 apresenta alguns dos mecanismos propostos que podem explicar as respostas vasculares diminuídas a compostos vasoativos em ratos alimentados com frutose. Podemos destacar um papel central relacionando frutose à resistência à insulina, aumento da ativação do SRAA, aumentando a Ang II que por sua vez pode estar relacionada a mecanismos que envolvem a disfunção vascular e hipertensão. Esses mecanismos propostos corroboram nossos resultados, uma vez que ao utilizarmos o IECA obtivemos resultados promissores quanto a melhora na RI e a reversão completa da hipercontratilidade à NOR, ocasionada pela frutose, em nosso modelo experimental.

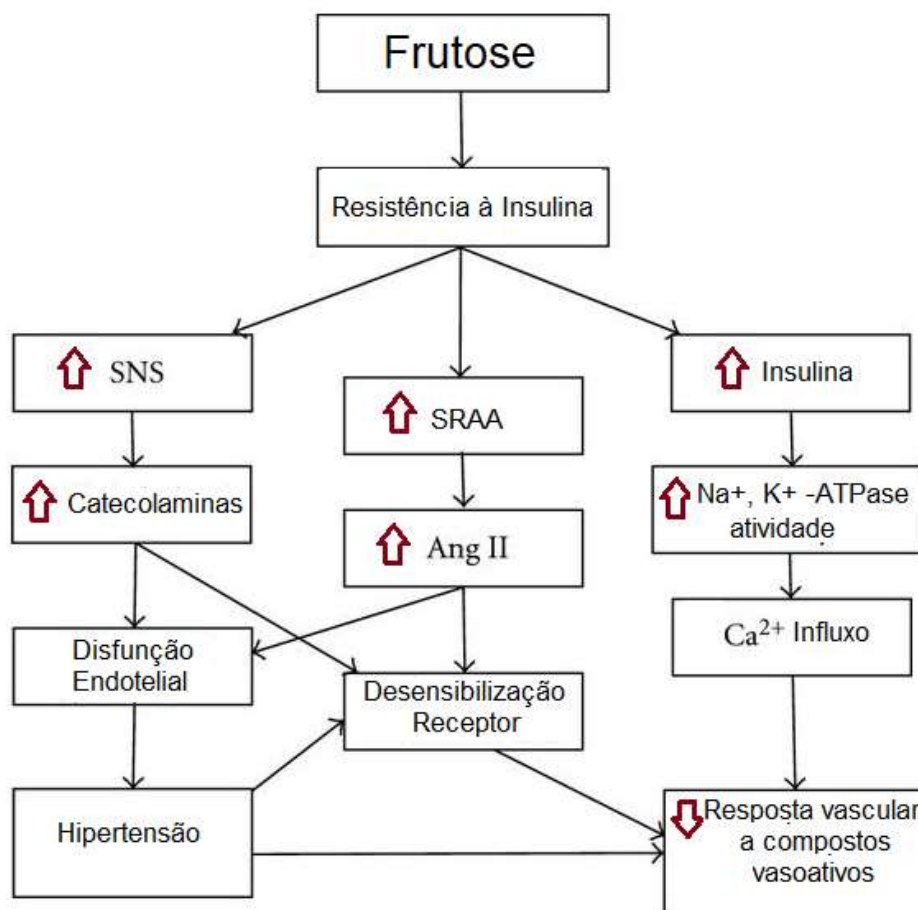


Figura 19: Mecanismo proposto da relação entre o consumo excessivo de frutose, Resistência Insulina, Sistema Nervoso Simpático (SNS); Sistema Renina Angiotensina (SRAA), Disfunção endotelial e Hipertensão. Fonte: adaptado de Abdulla et al (2011).

A sobrecarga de frutose tem sido consistentemente associada ao comprometimento da sinalização de insulina, o que pode levar a doenças cardiometabólicas (Lelis et al., 2020). Nossos resultados revelaram que o enalapril pode melhorar a sensibilidade à insulina. De fato, o enalapril tem sido associado à melhora dos fatores de risco para SM, como hiperglicemia, dislipidemia e ganho de peso (Al-Thanoon & Mahmood, 2012; Arivazhahan et al., 2017). Nossos resultados corroboram dados anteriores de Erlich e Rosenthal (1995), que mostraram que os inibidores da ECA melhoram a resistência à insulina induzida pela alta ingestão de frutose em ratos.

Os dois fármacos escolhidos para o nosso estudo, são utilizados como anti-hipertensivos e sugerimos que possam ser usados para tratar pacientes hipertensos que apresentam resistência à insulina. Nossos dados reforçam esse uso, demonstrando que o enalapril afetou favoravelmente a sensibilidade à insulina em modelo de alta ingestão de frutose e mesmo a espironolactona, apesar de não alterar este parâmetro, não causou maior prejuízo

ao metabolismo da glicose, inclusive obteve melhor resultado no nível de glicose de jejum basal ao final do tratamento.

Estudos clínicos demonstraram que o bloqueio do SRAA com IECAs ou bloqueadores AT-1 melhora a homeostase da glicose e reduz a incidência de DM2 em indivíduos com alto risco de eventos cardiovasculares (DREAM Trial Investigators et al., 2006; Sowers et al., 2010). Enquanto isso, os mineralocorticóides tem sido relacionado a prejuízos na sinalização da insulina e no metabolismo da glicose, Giacchetti e colaboradores (2007) mostraram que a remoção do excesso de aldosterona em pacientes com adenoma produtor de aldosterona (APA) induz a regressão das complicações cardíacas e metabólicas, indicando a aldosterona como principal determinante dessas alterações. Os antagonistas dos receptores de mineralocorticóides (MRA), embora ineficazes em algumas condições metabólicas (pacientes com hiperaldosteronismo idiopático) onde não houve melhoras na sensibilidade à insulina (Sindelka et al., 2000), podem melhorar a RI, a tolerância à glicose e diminuir os níveis de triglicédeos em ratos obesos (Hirata et al., 2009) e neutralizar distúrbios cardiometabólicos durante o excesso de androgênio gestacional em ratas ovariectomizadas (Olatunji et al., 2017; Olatunji et al., 2019).

Relatamos anteriormente que as alterações metabólicas causadas por sobrecarga de frutose – um modelo que mimetiza os estágios iniciais da SM – foi acompanhada por aumento da vasoconstrição relacionada aos prostanóides constritores (Sousa et al., 2017). Aqui, mostramos que a angiotensina II parece estar fortemente envolvida nessas alterações, pois o tratamento com enalapril as previnem, enquanto os mineralocorticóides parecem pouco envolvidos, pois a espironolactona não teve efeito. Esses achados são apoiados por Potenza et al. (2006), que observaram relação entre disfunção endotelial e RI em ratos hipertensos (SHR). Além disso, esses autores relataram que o enalapril (30 mg/kg/dia, 3 semanas) melhorou a RI e reduziu os níveis de endotelina-1 (um potente vasoconstritor), enquanto tanto o enalapril quanto a rosiglitazona aumentaram a resposta de relaxamento à insulina (Potenza et al., 2006). Tais achados podem ser relevantes para o direcionamento e manejo de estratégias terapêuticas mais assertivas para a SM.

Neste sentido, conforme já mostramos em estudo anterior (Sousa et al., 2017), a dieta rica com frutose leva à RI, aumento da glicemia de jejum e acúmulo de gordura visceral e especulamos que essas alterações podem estar associadas ao aumento da vasoconstrição à noradrenalina observada nos animais. No presente estudo somente o IECA foi capaz de normalizar a RI e prevenir o acúmulo de gordura mesentérica e visceral nos ratos

submetidos a sobrecarga de frutose. Esse efeito dos IECA sobre RI já foi mostrado em outras situações inclusive relacionado ao seus efeitos benéficos sobre os vasos (Potenza et al., 2006) onde o tratamento de SHRs por três semanas com rosiglitazona e/ou enalapril reduziu significativamente a pressão arterial, resistência à insulina, insulina em jejum e níveis de ET-1 além de aumentar os níveis de adiponectina para valores comparáveis aos observados em seus controles normotensos Wistar Kyoto tratados com veículo. A terapia de SHRs com rosiglitazona e/ou enalapril também melhorou as respostas vasodilatadoras à insulina no leito vascular mesentérico (Potenza et al., 2006). Reforçando mais uma vez o papel da Ang II nas alterações neste modelo experimental, bem como os benefícios do enalapril nestas condições.

Foi relatado que o enalapril melhora a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), enquanto alguns dados apontam para um prejuízo na via do NO por sobrecarga de frutose (Miller e Adeli, 2008). Em contraste, nossos resultados não mostraram envolvimento do NO nas alterações vasculares induzidas pela frutose. Semelhante aos nossos achados outro estudo sobre frutose encontrou vasoconstrição aumentada à endotelina e fenilefrina em anéis de artérias mesentéricas de fêmeas Sprague-Dawley suplementadas com 20% de frutose em água potável por 8 semanas. Além disso também mostraram que vasodilatação dependente do endotélio para acetilcolina e bradicinina, bem como as respostas de relaxamento ao nitroprussiato de sódio, doador de NO, foram prejudicadas pela sobrecarga de frutose, o que estava ausente em nossa investigação (Shaligram et al., 2018). Enquanto isso, esse mesmo grupo de pesquisa (Sangüesa et al., 2017) relatou que a sobrecarga de frutose (frutose 20% – por 8 semanas) não alterou a resposta de relaxamento à ACh ou vasoconstrição nos anéis aórticos, nem a contribuição da via do NO na função vascular. Em conjunto esses dados reforçam que pode haver diferenças nas respostas vasculares encontradas nos diferentes vasos estudados (leito mesentérico, anéis mesentéricos e anéis aórticos). Vale ainda destacar que em nosso modelo experimental foram utilizados machos Wistar com a dose e o tempo de suplementação de frutose distintos (frutose 10% - por 6 semanas) podendo aos menos em parte influenciar em alguns resultados divergentes, além do nosso estudo ser no leito vascular mesentérico e não em anéis isolados.

Uma vez que a via do NO não estava envolvida nas alterações vasculares induzidas pela frutose em nosso estudo, isso sugere que o NO não foi reduzido pelo estresse oxidativo, o que é apoiado por nossos dados anteriores medindo os níveis teciduais de estresse oxidativo em ratos alimentados com frutose (Sousa et. al., 2017). No entanto, o estresse oxidativo deve ser um processo em desenvolvimento, evidenciado pelas reduções na maquinaria antioxidante, com um efeito benéfico modesto do bloqueio do SRAA. De fato, resultados semelhantes foram relatados em outros estudos sobre sobrecarga de frutose especialmente uma atividade reduzida da enzima superóxido dismutase (SOD) sem alterações na catalase (Bernardes et al., 2018). Abdelrahman e colaboradores (2018) mostraram que além da RI, aumento na pressão arterial, frequência cardíaca, ácido úrico uma dieta de 60% frutose na alimentação por 8 semanas também diminuiu as atividades da superóxido SOD e da catalase. Enquanto Prado e colaboradores (2019) mostraram que a suplementação com frutose reduziu os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS - do inglês Thiobarbituric acid reactive substances) – que são formadas como um subproduto da peroxidação lipídica, isto é, como produtos de degradação de gorduras - no fígado e as atividades da catalase e SOD no músculo gastrocnêmio de ratos Wistar.

Enquanto isso, o enalapril demonstrou melhorar as defesas antioxidantes em algumas condições como em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (STZ) sendo capaz de prevenir a nefropatia induzida por diabetes por meio da melhora do estado glicêmico, do sistema de defesa antioxidante, juntamente com a supressão do estresse oxidativo, inflamação e apoptose (Ahemed et al., 2019). Já em ratos SHR o tratamento com enalapril (30 mg/kg/dia) aumentou o status antioxidante total e a atividade da SOD, além de reduzir os níveis de TBARS e também preveniu a disfunção renal e alterações histopatológicas. Os resultados indicam que, além de seus efeitos hipotensores e renoprotetores, o tratamento com enalapril também diminuiu o estresse oxidativo nos rins (Chandran et al., 2014).

Ressalta-se que a inibição da COX pela indometacina igualou a resposta vasoconstritora induzida pela NOR entre os grupos estudados, podendo indicar maior influência de prostanóides vasoconstritores na reatividade desses animais. Mais importante ainda, mostramos que o bloqueio do SRAA com enalapril, mas não com espirolactona, melhorou essa resposta ao neutralizar o aumento de prostanóides vasoconstritores devido à sobrecarga de frutose, e não por um efeito compensatório em outras vias. Os

prostanóides são mediadores lipídicos cíclicos (superfamília dos eicosanoides) derivados da ciclo-oxigenação enzimática (via da ciclooxigenase - COX), de ácidos graxos polinsaturados lineares como o ácido araquidônico (AA). Liberados pela parede vascular, predominantemente pelo endotélio, tem papel importante na regulação do tônus vasomotor (Alvarez et al., 2005; Alvarez et al., 2007; Horikami et al., 2020).

Os componentes catalisadores (COX-1 e COX-2) influenciam diretamente na sinalização da cascata dos eicosanoides. Inicialmente, ocorre a liberação do AA a partir dos fosfolipídios de membrana, por ação da fosfolipase A₂ (PLA₂). Em seguida, o AA é convertido a endoperóxido prostaglandina G₂ (PGG₂), produto intermediário da reação, por ação da COX (COX-1 e COX-2), para então formar prostaglandina H₂ (PGH₂) sob ação de peroxidases. PGH₂ é um produto vasoconstritor precursor imediato de muitas outras prostaglandinas e tromboxanos, que também são vasoconstritores. Por fim, ocorre a conversão de PGH₂ para produtos finais de prostanóides, biologicamente ativos, por ação de sintases ou isomerases específicas (Chang et al., 1987; Bos et al., 2004). Sob condições de doença, comumente participam de anormalidades vasculares, incluindo vasoconstrição aumentada (Wong et al., 2009). Curiosamente, a expressão da COX-2 – principal isoforma envolvida no desequilíbrio dos prostanóides – permaneceu inalterada, apontando para um possível aumento de sua atividade.

De fato, sabe-se que o SRAA pode desencadear a ativação da COX-2 via angiotensina II para a produção de prostanóides constritores (Quadri et al., 2016). Além disso, vale destacar que a Ang II ativa o AT-1, que então inicia a cascata de sinalização envolvendo a ativação de diversas vias ERK, MAPK, NF-κB e EROs, que por sua vez ativam a COX-2 (Quadri et al., 2016). A figura 20 apresenta de forma esquemática as vias envolvidas. Em nosso modelo experimental esta ativação da COX-2 parece não ser via EROs, mas sugerimos que pode haver o envolvimento de outras vias que não investigamos conforme indicadas na figura 20. Entretanto apesar de não encontramos alteração na expressão da COX-2, sua atividade pode estar exacerbada por ativação via Ang II.

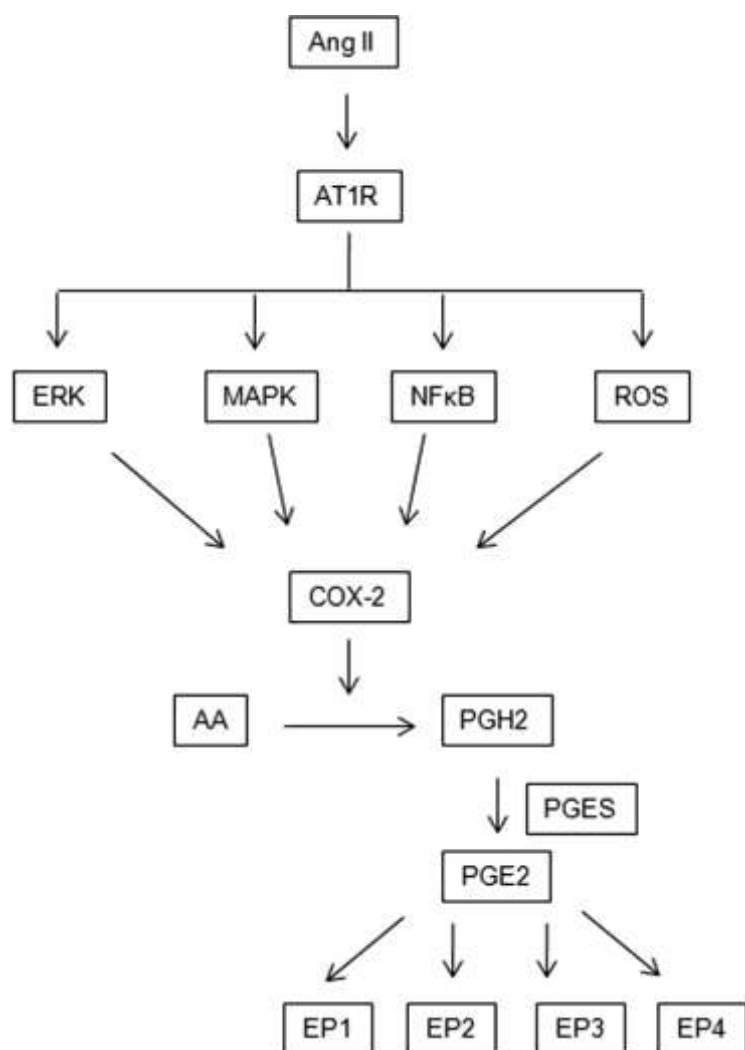


Figura 20: Receptor de angiotensina tipo I (AT1R) Regula a sinalização da Prostaglandina E2 (PGE2). A Ang II ativa o AT1R, que então inicia a cascata de sinalização envolvendo a ativação de MAPK/ROS/NF-κB, que por sua vez ativa a ciclooxigenase-2 induzível (COX-2). A COX-2 catalisa a conversão do ácido araquidônico (AA) em prostaglandina H2 (PGH2). A PGH2 é convertida em PGE2 pela PGE sintase terminal (PGES). Os sinais de PGE2 ocorrem através de quatro diferentes receptores acoplados à proteína G, EP1R-EP4R, cada um dos quais possui múltiplas variantes com diferentes propriedades de sinalização. Fonte: Quadri et al., 2016.

Em relação a avaliação da expressão proteica de enzimas antioxidantes, nossos resultados mostram que o grupo frutose reduziu a defesa antioxidante, uma vez que, diminuiu a expressão da SOD-1, que foi apenas levemente afetada pelo bloqueio do SRAA por ambas as drogas aqui utilizadas. Os níveis de SOD-2 e catalase permaneceram inalterados, mas com tendências de alterações. Ao somar os níveis de expressão dessas três proteínas que o compõem o sistema antioxidante foi evidenciado tendência do comprometimento causado pela frutose e um efeito modesto dos tratamentos. É reportado na literatura que a frutose diminuiu significativamente as atividades de SOD e catalase

no plasma (Abdelrahma et al., 2018); fígado e músculo gastrocnêmio (Prado et al., 2019). E por sua vez, as atividades da catalase em ratos diabéticos foram melhoradas pelo tratamento com enalapril (Ahemed et al., 2019), além disso este IECA aumentou o status antioxidante total e a atividade SOD renal em SHR (Chandran et al., 2014).

Mikrut e colaboradores (2016) sugerem a existência de efeito antioxidante independente da bradicinina dos IECA em condições hiperglicêmicas, o que não está relacionado à mediação da bradicinina e à estrutura da molécula do fármaco. Estes autores mostraram que em ratos com hiperglicemia induzida por estreptozotocina, os IECA reduziram significativamente a concentração de H_2O_2 , enquanto aumentaram significativamente a atividade de SOD e glutathione peroxidase. O grupo hiperglicêmico tratado simultaneamente com IECA e antagonistas dos receptores de bradicinina B1 e B2 mostrou uma diminuição significativa na concentração de H_2O_2 em comparação com o grupo controle hiperglicêmico. (Mikrut et al, 2016). Foi mostrado que os IECA captopril e enalapril parecem proteger o endotélio contra EROS de forma dose-dependente. O estudo foi realizado em aortas abdominais isoladas de coelhos expostas a EROS por eletrólise após pré-tratamento agudo com várias concentrações de captopril e enalapril. Este efeito protetor está relacionado à eliminação do ânion superóxido, avaliados utilizando inibidores da SOD e catalase (Kim et al, 2013). Além disso, o bloqueio do receptor mineralocorticóide e do receptor AT-1 protege contra a geração de EROs em excesso e a remodelação vascular resultante (Wehling et al., 1992; Cooper et al., 2007; Wei et al., 2009).

Costa e colaboradores (2002) investigaram a atividade das enzimas antioxidantes e a produção de radicais livres em coração de ratos tratados com enalapril e losartana para testar a hipótese de aumento da atividade das enzimas antioxidantes e a participação das mitocôndrias nos efeitos de tratamentos crônicos com inibidores da angiotensina II. Os resultados encontrados não suportam a hipótese de um aumento na atividade das enzimas antioxidantes pelo tratamento de longo prazo com inibidores da angiotensina II como sugerido anteriormente, e apontam para um papel do NO produzido pela sintase do óxido nítrico mitocondrial (mtNOS) no efeito protetor dessas drogas.

Curiosamente, foi relatado recentemente que a sobrecarga de frutose aumenta os níveis de renina e Ang-II, mas não de aldosterona (Kim et al., 2020). No geral, esses dados apoiam fortemente nossos resultados, especialmente em relação à função vascular. Portanto, os efeitos positivos observados aqui com o bloqueio do SRAA parecem de fato

relacionados a inibição da ação mecanicista da sobrecarga de frutose, ao invés de um efeito compensatório em outros mecanismos.

Assim, nosso estudo demonstra que enzimas antioxidantes, parâmetros metabólicos e reatividade vascular foram afetados pela suplementação de frutose e evidenciam que no leito vascular mesentérico, o tratamento com enalapril reverte o aumento da vasoconstrição à NOR induzida por frutose, possivelmente por aumentar as defesas antioxidantes e normalizar a via dos prostanoídes. Enquanto a espironolactona não foi capaz de alterar a reatividade vascular, sugerindo que a redução da síntese de Ang-II mas não o bloqueio dos receptores da aldosterona parece ser eficaz na normalização da vasoconstrição em ratos tratados com frutose.

6 RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

Tanto o enalapril como a espironolactona promoveram melhora em alguns parâmetros metabólicos avaliados. A espironolactona atenuou a glicemia de jejum aumentada pela frutose e ambos os fármacos melhoram a tolerância à glicose. Além disso o enalapril também aumentou a sensibilidade à insulina, evidenciando sua capacidade para atuar na melhora da resistência à insulina.

O enalapril reverteu as alterações promovidas pela frutose na resposta contrátil à noradrenalina, sugerindo seu potencial para atuar sobre as complicações vasculares relacionadas à disfunção endotelial neste modelo experimental. Além disso, a expressão de SOD-1 foi apenas levemente afetada pelo bloqueio do SRAA.

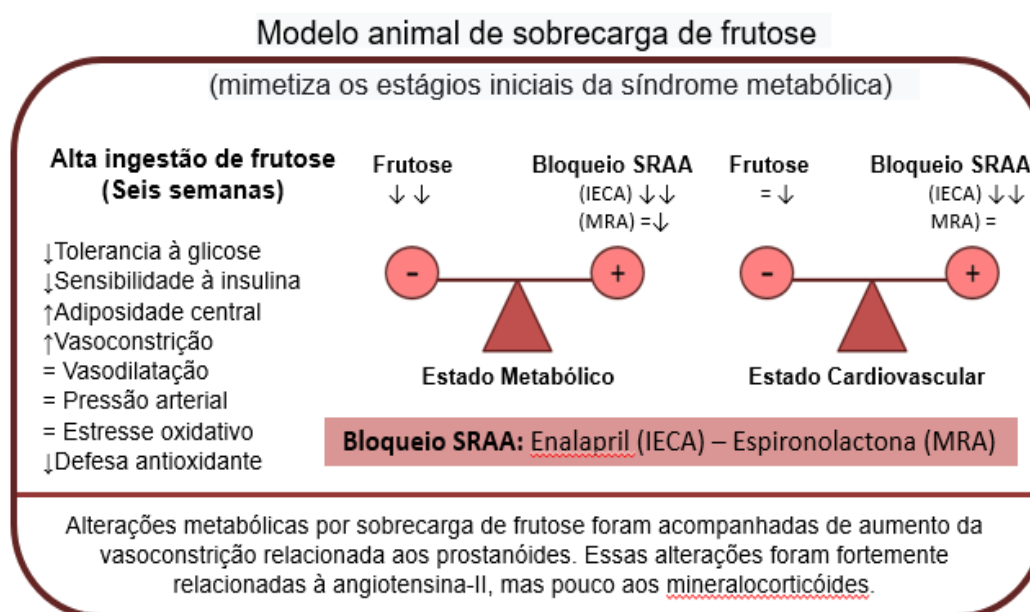


Figura 21: Resumo gráfico dos efeitos cardiometabólicos do bloqueio do SRAA em modelo experimental que mimetiza os estágios iniciais da síndrome metabólica por sobrecarga de frutose.

Como conclusões do presente estudo podemos destacar que as alterações metabólicas induzidas pela sobrecarga de frutose foram acompanhadas de aumento da vasoconstrição relacionada aos prostanóides constritores. Essas alterações foram fortemente relacionadas à angiotensina-II, mas pouco aos mineralocorticóides. O presente estudo demonstra que a resistência à insulina e a disfunção vascular induzida pela alta ingestão de frutose em ratos podem ser melhoradas por IECA.

Finalmente, nossos resultados podem estender as perspectivas para entender a progressão da SM e possibilitar o desenvolvimento de melhores abordagens e novas estratégias terapêuticas nos anos iniciais da doença.

REFERÊNCIAS

- Abdelrahman AM, Al Suleimani YM, Ashique M, Manoj P, Ali BH. Effects of infliximab and tocilizumab on fructose-induced hyperinsulinemia and hypertension in rats. *Biomed Pharmacother.* 2018;105:182-186. doi:10.1016/j.biopha.2018.05.118.
- Abdulla MH, Sattar MA, Johns EJ. The Relation between Fructose-Induced Metabolic Syndrome and Altered Renal Haemodynamic and Excretory Function in the Rat. *Int J Nephrol.* 2011;2011:934659. doi:10.4061/2011/934659.
- Abuissa H, Jones PG, Marso SP, O'Keefe JH Jr. Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention of type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(5):821-826. doi:10.1016/j.jacc.2005.05.051.
- Ahmed OM, Ali TM, Abdel Gaid MA, Elberry AA. Effects of enalapril and paricalcitol treatment on diabetic nephropathy and renal expressions of TNF- α , p53, caspase-3 and Bcl-2 in STZ-induced diabetic rats. *PLoS One.* 2019;14(9):e0214349. doi:10.1371/journal.pone.0214349.
- Al-Thanoon ZA, Mahmood IH. Effects of Losartan vs. Enalapril on the Markers of Metabolic Syndrome. *Oman Med J.* 2012;27(1):27-30. doi:10.5001/omj.2012.05.
- Alvarez Y, Briones AM, Balfagón G, Alonso MJ, Salaices M. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hypertens.* 2005;23(4):767-77. doi: 10.1097/01.hjh.0000163145.12707.63.
- Alvarez Y, Pérez-Girón JV, Hernanz R, Briones AM, García-Redondo A, Beltrán A, Alonso MJ, Salaices M. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;321(1):381-8. doi: 10.1124/jpet.106.115287.
- Arivazhahan A, Bairy LK, Nayak V, Kunder SK. A Study to Assess the Therapeutic Effect of Enalapril on Olanzapine Induced Metabolic Syndrome in Wistar Rats. *J Clin Diagn Res.* 2017; 11(2):FF01-FF06. doi: 10.7860/JCDR/2017/24049.9380.
- Arivazhahan A, Bairy LK, Nayak V, Kunder SK. A Study to Assess the Therapeutic Effect of Enalapril on Olanzapine Induced Metabolic Syndrome in Wistar Rats. *J Clin Diagn Res.* 2017;11(2):FF01-FF06. doi:10.7860/JCDR/2017/24049.9380.
- Aygen B, Kucuksu M, Aydin S, Ozercan IH. Effect of enalapril maleate on ghrelin levels in metabolic syndrome in rats. *Peptides.* 2015;67:39-44. doi:10.1016/j.peptides.2015.03.002.
- Baldo MP, Forechi L, Morra EA, Zaniqueli D, Machado RC, Lunz W, Rodrigues SL, Mill JG. Long-term use of low-dose spironolactone in spontaneously hypertensive rats: effects on left ventricular hypertrophy and stiffness. *Pharmacol Rep.* 2011;63(4):975-82. doi: 10.1016/s1734-1140(11)70613-2.
- Baron AD, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Henry DP, Steinberg HO. Interactions between insulin and norepinephrine on blood pressure and insulin sensitivity. Studies in lean and obese men. *J Clin Invest.* 1994;93(6):2453-2462. doi:10.1172/JCI117254.
- Barreiros RC, Bossolan G, Trindade CEP. Fructose in humans: metabolic effects, clinical utilization, and associated inherent errors. *Rev. Nutr.* 2005, 18(3):377-389. doi.org/10.1590/S1415-52732005000300010.

Bender SB, McGraw AP, Jaffe IZ, Sowers JR. Mineralocorticoid receptor-mediated vascular insulin resistance: an early contributor to diabetes-related vascular disease? *Diabetes*. 2013;62(2):313-9. doi: 10.2337/db12-0905.

Bernardes N, da Silva Dias D, Stoyell-Conti FF, de Oliveira Brito-Monzani J, Malfitano C, Caldini EG, Ulloa L, Llesuy SF, Irigoyen MC, De Angelis K. Baroreflex Impairment Precedes Cardiometabolic Dysfunction in an Experimental Model of Metabolic Syndrome: Role of Inflammation and Oxidative Stress. *Sci Rep*. 2018; 8(1):8578. doi: 10.1038/s41598-018-26816-4.

Bezerra RM, Ueno M, Silva MS, Tavares DQ, Carvalho CR, Saad MJ, et al. A high-fructose diet induces insulin resistance but not blood pressure changes in normotensive rats. *Braz J Med Biol Res*. 2001; 34:1155-60.

Bochud M, Nussberger J, Bovet P, et al. Plasma aldosterone is independently associated with the metabolic syndrome. *Hypertension*. 2006;48(2):239-245. doi:10.1161/01.HYP.0000231338.41548.fc.

Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(7):1187-1205. doi:10.1016/j.biocel.2003.08.006.

Brands MW, Garrity CA, Holman MG, Keen HL, Alonso-Galicia M, Hall JE. High-fructose diet does not raise 24-hour mean arterial pressure in rats. *Am J Hypertens*. 1994;7(1):104-109. doi:10.1093/ajh/7.1.104.

Brands MW, Hildebrandt DA, Mizelle HL, Hall JE. Hypertension during chronic hyperinsulinemia in rats is not salt-sensitive. *Hypertension*. 1992;19(1 Suppl):I83-I89. doi:10.1161/01.hyp.19.1_suppl.i83.

Brands MW, Hildebrandt DA, Mizelle HL, Hall JE. Sustained hyperinsulinemia increases arterial pressure in conscious rats. *Am J Physiol*. 1991;260(4 Pt 2):R764-R768. doi:10.1152/ajpregu.1991.260.4.R764.

Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(4):537-43. doi: 10.1093/ajcn/79.4.537.

Bray GA. Fructose: should we worry? *Int J Obes (Lond)*. 2008;32 Suppl 7:S127-S131. doi:10.1038/ijo.2008.248.

Bray GA. How bad is fructose? *Am J Clin Nutr*. 2007;86(4):895-6. doi: 10.1093/ajcn/86.4.895.

Bundalo MM, Zivkovic MD, Romić SDj, et al. Fructose-rich diet induces gender-specific changes in expression of the renin-angiotensin system in rat heart and upregulates the ACE/AT1R axis in the male rat aorta. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2016;17(2):1470320316642915. doi:10.1177/1470320316642915.

Bursać BN, Vasiljević AD, Nestorović NM, et al. High-fructose diet leads to visceral adiposity and hypothalamic leptin resistance in male rats--do glucocorticoids play a role? *J Nutr Biochem*. 2014;25(4):446-455. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.12.005.

Butler R, Morris AD, Belch JJ, Hill A, Struthers AD. Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension. *Hypertension*. 2000;35(3):746-751. doi:10.1161/01.hyp.35.3.746.

- Campbell CY, Blumenthal RS. Pharmacogenetics of antihypertensive response. *Hypertension*. 2012;59(6):1094-1096. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.192559.
- Campión J, Lahera V, Cachofeiro V, et al. In vivo tissue specific modulation of rat insulin receptor gene expression in an experimental model of mineralocorticoid excess. *Mol Cell Biochem*. 1998;185(1-2):177-182. doi:10.1023/a:1006871309864.
- Catena C, Lapenna R, Baroselli S, et al. Insulin sensitivity in patients with primary aldosteronism: a follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(9):3457-3463. doi:10.1210/jc.2006-0736.
- Cespedes EM, Hu FB. Dietary patterns: from nutritional epidemiologic analysis to national guidelines. *Am J Clin Nutr*. 2015;101(5):899-900. doi:10.3945/ajcn.115.110213.
- Chandran G, Sirajudeen KN, Yusoff NS, Swamy M, Samarendra MS. Effect of the antihypertensive drug enalapril on oxidative stress markers and antioxidant enzymes in kidney of spontaneously hypertensive rat. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:608512. doi:10.1155/2014/608512.
- Chang J, Musser JH, McGregor H. Phospholipase A2: function and pharmacological regulation. *Biochem Pharmacol*. 1987;36(15):2429-2436. doi:10.1016/0006-2952(87)90512-0.
- Cheng SM, Cheng YJ, Wu LY, et al. Activated apoptotic and anti-survival effects on rat hearts with fructose induced metabolic syndrome. *Cell Biochem Funct*. 2014;32(2):133-141. doi:10.1002/cbf.2982.
- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA-MCT. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA. *In Brazilian Government*, p. 1–50, 2016.
- Cooper SA, Whaley-Connell A, Habibi J, et al. Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(4):H2009-H2023. doi:10.1152/ajpheart.00522.2007.
- Corpe CP, Burant CF, Hoekstra JH. Intestinal fructose absorption: clinical and molecular aspects. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999;28(4):364-374. doi:10.1097/00005176-199904000-00004.
- Cortez-Pinto H, Chatham J, Chacko VP, Arnold C, Rashid A, Diehl AM. Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *JAMA*. 1999;282(17):1659-1664. doi:10.1001/jama.282.17.1659.
- Costa LE, La-Padula P, Lores-Arnaiz S, et al. Long-term angiotensin II inhibition increases mitochondrial nitric oxide synthase and not antioxidant enzyme activities in rat heart. *J Hypertens*. 2002;20(12):2487-2494. doi:10.1097/00004872-200212000-00029.
- D'Angelo G, Elmarakby AA, Pollock DM, Stepp DW. Fructose feeding increases insulin resistance but not blood pressure in Sprague-Dawley rats. *Hypertension*. 2005;46(4):806-811. doi:10.1161/01.HYP.0000182697.39687.34.
- De Angelis K, Senador DD, Mostarda C, Irigoyen MC, Morris M. Sympathetic overactivity precedes metabolic dysfunction in a fructose model of glucose intolerance in

mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012;302(8):R950-R957. doi:10.1152/ajpregu.00450.2011.

de Gasparo M, Joss U, Ramjouwé HP, et al. Three new epoxy-spirolactone derivatives: characterization in vivo and in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987;240(2):650-656.

Doehner W, Schoene N, Rauchhaus M, et al. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol on endothelial function and peripheral blood flow in hyperuricemic patients with chronic heart failure: results from 2 placebo-controlled studies. *Circulation*. 2002;105(22):2619-2624. doi:10.1161/01.cir.0000017502.58595.ed.

Dornas WC, de Lima WG, Pedrosa ML, Silva ME. Health implications of high-fructose intake and current research. *Adv Nutr*. 2015;6(6):729-737. Published 2015 Nov 13. doi:10.3945/an.114.008144

Douard V, Ferraris RP. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295(2):E227-E237. doi:10.1152/ajpendo.90245.2008.

DREAM Trial Investigators, Bosch J, Yusuf S, Gerstein HC, Pogue J, Sheridan P, Dagenais G, Diaz R, Avezum A, Lanas F, Probstfield J, Fodor G, Holman RR. Effect of ramipril on the incidence of diabetes. *N Engl J Med*. 2006;355(15):1551-62. doi:10.1056/NEJMoa065061.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005;365(9468):1415-1428. doi:10.1016/S0140-6736(05)66378-7.

Egger G, Dixon J. Beyond obesity and lifestyle: a review of 21st century chronic disease determinants. *Biomed Res Int*. 2014;2014:731685. doi:10.1155/2014/731685.

Emmerson BT. Effect of oral fructose on urate production. *Ann Rheum Dis*. 1974;33(3):276-280. doi:10.1136/ard.33.3.276.

Erlich Y, Rosenthal T. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on fructose induced hypertension and hyperinsulinaemia in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*. 1995;22(1):S347-S349. doi:10.1111/j.1440-1681.1995.tb02949.x.

Fallo F, Veglio F, Bertello C, et al. Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(2):454-459. doi:10.1210/jc.2005-1733.

Farquharson CA, Butler R, Hill A, Belch JJ, Struthers AD. Allopurinol improves endothelial dysfunction in chronic heart failure. *Circulation*. 2002;106(2):221-226. doi:10.1161/01.cir.0000022140.61460.1d.

Feinman RD, Fine EJ. Fructose in perspective. *Nutr Metab (Lond)*. 2013;10(1):45. Published 2013 Jul 1. doi:10.1186/1743-7075-10-45.

Ferraris RP, Choe JY, Patel CR. Intestinal Absorption of Fructose. *Annu Rev Nutr*. 2018;38:41-67. doi:10.1146/annurev-nutr-082117-051707.

Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*. 2002;287(3):356-359. doi:10.1001/jama.287.3.356.

Fox IH, Kelley WN. Studies on the mechanism of fructose-induced hyperuricemia in man. *Adv Exp Med Biol*. 1974;41:463-470. doi:10.1007/978-1-4757-1433-3_11.

- Frantz ED, Penna-de-Carvalho A, Batista Tde M, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Comparative effects of the renin-angiotensin system blockers on nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance in C57BL/6 mice. *Metab Syndr Relat Disord*. 2014;12(4):191-201. doi: 10.1089/met.2013.0129.
- Froesch ER. Fructose metabolism in adipose tissue. *Acta Med Scand Suppl*. 1972;542:37-46. doi:10.1111/j.0954-6820.1972.tb05317.x.
- Fujisawa G, Okada K, Muto S, et al. Spironolactone prevents early renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int*. 2004;66(4):1493-1502. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00913.x.
- Giacchetti G, Ronconi V, Turchi F, et al. Aldosterone as a key mediator of the cardiometabolic syndrome in primary aldosteronism: an observational study. *J Hypertens*. 2007;25(1):177-186. doi:10.1097/HJH.0b013e3280108e6f.
- Giani JF, Mayer MA, Muñoz MC, Silberman EA, Höcht C, Taira CA, Gironacci MM, Turyn D, Dominici FP. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(2):E262-71. doi: 10.1152/ajpendo.90678.2008.
- Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest*. 2000;106(4):453-8. doi: 10.1172/JCI10762.
- Guo C, Ricchiuti V, Lian BQ, et al. Mineralocorticoid receptor blockade reverses obesity-related changes in expression of adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, and proinflammatory adipokines. *Circulation*. 2008;117(17):2253-2261. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.748640.
- Hallfrisch J. Metabolic effects of dietary fructose. *FASEB J*. 1990;4(9):2652-2660. doi:10.1096/fasebj.4.9.2189777.
- Hannou SA, Haslam DE, McKeown NM, Herman MA. Fructose metabolism and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2018;128(2):545-555. doi:10.1172/JCI96702.
- Havel PJ. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev*. 2005;63(5):133-157. doi:10.1301/nr.2005.may.133-157.
- Heinig M, Johnson RJ. Role of uric acid in hypertension, renal disease, and metabolic syndrome. *Cleve Clin J Med*. 2006;73(12):1059-1064. doi:10.3949/ccjm.73.12.1059.
- Hernández-Salinas R, Decap V, Leguina A, et al. Antioxidant and anti hyperglycemic role of wine grape powder in rats fed with a high fructose diet. *Biol Res*. 2015;48:53. doi:10.1186/s40659-015-0045-4.
- Hirata A, Maeda N, Hiuge A, et al. Blockade of mineralocorticoid receptor reverses adipocyte dysfunction and insulin resistance in obese mice. *Cardiovasc Res*. 2009;84(1):164-172. doi:10.1093/cvr/cvp191.
- Hoffman S, Alvares D, Adeli K. Intestinal lipogenesis: how carbs turn on triglyceride production in the gut. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2019;22(4):284-288. doi:10.1097/MCO.0000000000000569.
- Horikami D, Kobayashi K, Murata T. [Prostanoids regulate vascular permeability]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 2020;155(6):395-400. doi: 10.1254/fpj.20045.

- Hosoya K, Minakuchi H, Wakino S, et al. Insulin resistance in chronic kidney disease is ameliorated by spironolactone in rats and humans. *Kidney Int.* 2015;87(4):749-760. doi:10.1038/ki.2014.348.
- Huang PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech.* 2009;2(5-6):231-237. doi:10.1242/dmm.001180.
- Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, Reaven GM. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension.* 1987;10(5):512-516. doi:10.1161/01.hyp.10.5.512.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009 : análise do consumo alimentar pessoal no Brasil / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. - Rio de Janeiro : IBGE, 2011. 150 p.
- Ishimoto T, Lanasma MA, Le MT, et al. Opposing effects of fructokinase C and A isoforms on fructose-induced metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(11):4320-4325. doi:10.1073/pnas.1119908109.
- Johnson RJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, et al. Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity. *Diabetes.* 2013;62(10):3307-3315. doi:10.2337/db12-1814.
- Johnson RJ, Perez-Pozo SE, Sautin YY, et al. Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocr Rev.* 2009;30(1):96-116. doi:10.1210/er.2008-0033.
- Kennedy AJ, Ellacott KL, King VL, Hasty AH. Mouse models of the metabolic syndrome. *Dis Model Mech.* 2010;3(3-4):156-166. doi:10.1242/dmm.003467.
- Kim HY, Okubo T, Juneja LR, Yokozawa T. The protective role of amla (*Emblca officinalis* Gaertn.) against fructose-induced metabolic syndrome in a rat model. *Br J Nutr.* 2010;103(4):502-512. doi:10.1017/S0007114509991978.
- Kim JH, Kim H, Kim YH, Chung WS, Suh JK, Kim SJ. Antioxidant effect of captopril and enalapril on reactive oxygen species-induced endothelial dysfunction in the rabbit abdominal aorta. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013;46(1):14-21. doi:10.5090/kjtcs.2013.46.1.14.
- Kim M, Do GY, Kim I. Activation of the renin-angiotensin system in high fructose-induced metabolic syndrome. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2020;24(4):319-328. doi:10.4196/kjpp.2020.24.4.319.
- Kit BK, Fakhouri TH, Park S, Nielsen SJ, Ogden CL. Trends in sugar-sweetened beverage consumption among youth and adults in the United States: 1999-2010. *Am J Clin Nutr.* 2013;98(1):180-188. doi:10.3945/ajcn.112.057943.
- Kobayashi R, Nagano M, Nakamura F, et al. Role of angiotensin II in high fructose-induced left ventricular hypertrophy in rats. *Hypertension.* 1993;21(6 Pt 2):1051-1055. doi:10.1161/01.hyp.21.6.1051.
- Kotchen TA, Kotchen JM. Dietary sodium and blood pressure: interactions with other nutrients. *Am J Clin Nutr.* 1997;65(2 Suppl):708S-711S. doi:10.1093/ajcn/65.2.708S.
- Kurtz TW, Kabra PM, Booth BE, et al. Liquid-chromatographic measurements of inosine, hypoxanthine, and xanthine in studies of fructose-induced degradation of adenine nucleotides in humans and rats. *Clin Chem.* 1986;32(5):782-786.

- Kuzma JN, Cromer G, Hagman DK, Breymer KL, Roth CL, Foster-Schubert KE, Holte SE, Weigle DS, Kratz M. No differential effect of beverages sweetened with fructose, high-fructose corn syrup, or glucose on systemic or adipose tissue inflammation in normal-weight to obese adults: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2016; 104(2):306-14. doi: 10.3945/ajcn.115.129650.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685. doi:10.1038/227680a0.
- Lê KA, Tappy L. Metabolic effects of fructose. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006;9(4):469-475. doi:10.1097/01.mco.0000232910.61612.4d.
- Lelis DF, Andrade JMO, Almenara CCP, Broseguini-Filho GB, Mill JG, Baldo MP. High fructose intake and the route towards cardiometabolic diseases. *Life Sci.* 2020;259:118235. doi:10.1016/j.lfs.2020.118235.
- Leopold JA, Dam A, Maron BA, et al. Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity [published correction appears in *Nat Med.* 2009 Sep;15(9):1093]. *Nat Med.* 2007;13(2):189-197. doi:10.1038/nm1545.
- Levy-Costa RB, Sichieri R, Pontes Ndos S, Monteiro CA. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: distribuição e evolução (1974-2003) [Household food availability in Brazil: distribution and trends (1974-2003)]. *Rev Saude Publica.* 2005;39(4):530-540. doi:10.1590/s0034-89102005000400003.
- Li P, Koike T, Jiang HY, Wang ZH, Kawata Y, Oshida Y. Acute treatment with candesartan cilexetil, an angiotensin II type 1 receptor blocker, improves insulin sensitivity in high-fructose-diet-fed rats. *Horm Metab Res.* 2012;44(4):286-290. doi:10.1055/s-0032-1304321.
- Lírio LM, Forechi L, Zanardo TC, Batista HM, Meira EF, Nogueira BV, Mill JG, Baldo MP. Chronic fructose intake accelerates non-alcoholic fatty liver disease in the presence of essential hypertension. *J Diabetes Complications.* 2016;30(1):85-92. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2015.10.008.
- Maithilikarpagaselvi N, Sridhar MG, Swaminathan RP, Zachariah B. Curcumin prevents inflammatory response, oxidative stress and insulin resistance in high fructose fed male Wistar rats: Potential role of serine kinases. *Chem Biol Interact.* 2016;244:187-94. doi: 10.1016/j.cbi.2015.12.012.
- Malik VS, Pan A, Willett WC, Hu FB. Sugar-sweetened beverages and weight gain in children and adults: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2013;98(4):1084-102. doi: 10.3945/ajcn.113.058362.
- Marriott BP, Cole N, Lee E. National estimates of dietary fructose intake increased from 1977 to 2004 in the United States. *J Nutr.* 2009;139(6):1228S-1235S. doi: 10.3945/jn.108.098277.
- Mayes PA. Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr.* 1993;58(5 Suppl):754S-765S. doi:10.1093/ajcn/58.5.754S.
- McGregor DD. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor response in the perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J Physiol.* 1965;177(1):21-30. doi: 10.1113/jphysiol.1965.sp007572.
- Miatello R, Cruzado M, Risler N. Mechanisms of cardiovascular changes in an experimental model of syndrome X and pharmacological intervention on the renin-

- angiotensin-system. *Curr Vasc Pharmacol.* 2004;2(4):371-377. doi:10.2174/1570161043385510.
- Mikrut K, Kupsz J, Kozlik J, Krauss H, Pruszyńska-Oszmałek E, Gibas-Dorna M. Angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce oxidative stress intensity in hyperglycemic conditions in rats independently from bradykinin receptor inhibitors. *Croat Med J.* 2016;57(4):371-380. doi:10.3325/cmj.2016.57.371.
- Miller A, Adeli K. Dietary fructose and the metabolic syndrome. *Curr Opin Gastroenterol.* 2008;24(2):204-9. doi: 10.1097/MOG.0b013e3282f3f4c4.
- Miyata K, Rahman M, Shokoji T, et al. Aldosterone stimulates reactive oxygen species production through activation of NADPH oxidase in rat mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(10):2906-2912. doi:10.1681/ASN.2005040390.
- Mortera RR, Bains Y, Gugliucci A. Fructose at the crossroads of the metabolic syndrome and obesity epidemics. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2019;24(2):186-211. doi:10.2741/4713.
- Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T, Maegawa H, Kikkawa R, Kashiwagi A. Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPARalpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282(5):E1180-E1190. doi:10.1152/ajpendo.00471.2001.
- Nagase M, Yoshida S, Shibata S, et al. Enhanced aldosterone signaling in the early nephropathy of rats with metabolic syndrome: possible contribution of fat-derived factors. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(12):3438-3446. doi:10.1681/ASN.2006080944.
- Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, et al. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;290(3):F625-F631. doi:10.1152/ajprenal.00140.2005.
- Nakagawa T, Tuttle KR, Short RA, Johnson RJ. Hypothesis: fructose-induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2005;1(2):80-86. doi:10.1038/ncpneph0019.
- NAVIGATOR Study Group, McMurray JJ, Holman RR, et al. Effect of valsartan on the incidence of diabetes and cardiovascular events [published correction appears in *N Engl J Med.* 2010 May 6;362(18):1748]. *N Engl J Med.* 2010;362(16):1477-1490. doi:10.1056/NEJMoa1001121.
- Neves MFT, Mandarim-de-lacerda CA, Schiffrin EL. Papel da aldosterona nas alterações vasculares induzidas pela angiotensina II em artérias de resistência. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto.* 2003; 2(1):36-42.
- Nishimoto Y, Tomida T, Matsui H, Ito T, Okumura K. Decrease in renal medullary endothelial nitric oxide synthase of fructose-fed, salt-sensitive hypertensive rats. *Hypertension.* 2002;40(2):190-194. doi:10.1161/01.hyp.0000024267.71656.0d.
- Nyby MD, Abedi K, Smutko V, Eslami P, Tuck ML. Vascular Angiotensin type 1 receptor expression is associated with vascular dysfunction, oxidative stress and inflammation in fructose-fed rats. *Hypertens Res.* 2007;30(5):451-457. doi:10.1291/hypres.30.451.

Office of Disease Prevention and Health Promotion. Dietary Guidelines for Americans 2015–2020. ODPHP Website. <http://health.gov/dietaryguidelines/2015/guidelines/>. Acesso: fevereiro, 2022.

Ofili EO, Oparil S, Giles T, et al. Moderate versus intensive treatment of hypertension using amlodipine/valsartan and with the addition of hydrochlorothiazide for patients uncontrolled on angiotensin receptor blocker monotherapy: results in racial/ethnic subgroups. *J Am Soc Hypertens*. 2011;5(4):249-258. doi:10.1016/j.jash.2011.02.007.

Olatunji LA, Adeyanju OA, Michael OS, Usman TO, Tostes RC, Soladoye AO. Ameliorative effect of low-dose spironolactone on obesity and insulin resistance is through replenishment of estrogen in ovariectomized rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2019;97(1):65-74. doi:10.1139/cjpp-2018-0416.

Olatunji LA, Usman TO, Akinade AI, Adeyanju OA, Kim I, Soladoye AO. Low-dose spironolactone ameliorates insulin resistance and suppresses elevated plasminogen activator inhibitor-1 during gestational testosterone exposure. *Arch Physiol Biochem*. 2017; 123(5):286-292. doi: 10.1080/13813455.2017.1320681.

Petersen KF, Laurent D, Yu C, Cline GW, Shulman GI. Stimulating effects of low-dose fructose on insulin-stimulated hepatic glycogen synthesis in humans. *Diabetes*. 2001;50(6):1263-1268. doi:10.2337/diabetes.50.6.1263.

Pitt D. ACE inhibitor co-therapy in patients with heart failure: rationale for the Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES). *Eur Heart J*. 1995;16 Suppl N:107-110. doi:10.1093/eurheartj/16.suppl_n.107.

Popkin BM, Gordon-Larsen P. The nutrition transition: worldwide obesity dynamics and their determinants. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004;28 Suppl 3:S2-S9. doi:10.1038/sj.ijo.0802804.

Potenza MA, Marasciulo FL, Tarquinio M, Quon MJ, Montagnani M. Treatment of spontaneously hypertensive rats with rosiglitazone and/or enalapril restores balance between vasodilator and vasoconstrictor actions of insulin with simultaneous improvement in hypertension and insulin resistance. *Diabetes*. 2006;55(12):3594-603. doi: 10.2337/db06-0667.

Prado VC, Quines CB, Rosa SG, Cechella JL, Nogueira CW. Oxidative stress and metabolic parameters are differently affected by fructose when rats were kept sedentary or underwent swimming exercise. *Can J Physiol Pharmacol*. 2019;97(8):721-728. doi: 10.1139/cjpp-2018-0620.

Qin B, Nagasaki M, Ren M, Bajotto G, Oshida Y, Sato Y. Cinnamon extract prevents the insulin resistance induced by a high-fructose diet. *Horm Metab Res*. 2004;36(2):119-25. doi: 10.1055/s-2004-814223.

Quadri SS, Culver SA, Li C, Siragy HM. Interaction of the renin angiotensin and cox systems in the kidney. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2016;8(2):215-226. doi:10.2741/s459.

Rajagopalan S, Duquaine D, King S, Pitt B, Patel P. Mineralocorticoid receptor antagonism in experimental atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(18):2212-2216. doi:10.1161/01.cir.0000015854.60710.10.

Rosinger A, Herrick K, Gahche J, Park S. Sugar-sweetened Beverage Consumption Among U.S. Youth, 2011-2014. *NCHS Data Brief*. 2017;(271):1-8.

Sánchez-Lozada LG, Tapia E, Jiménez A, et al. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292(1):F423-F429. doi:10.1152/ajprenal.00124.2006.

Sangüesa G, Shaligram S, Akther F, Roglans N, Laguna JC, Rahimian R, Alegret M. Type of supplemented simple sugar, not merely calorie intake, determines adverse effects on metabolism and aortic function in female rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017; 312(2):H289-H304. doi: 10.1152/ajpheart.00339.2016.

Santuré M, Pitre M, Marette A, et al. Induction of insulin resistance by high-sucrose feeding does not raise mean arterial blood pressure but impairs haemodynamic responses to insulin in rats. *Br J Pharmacol*. 2002;137(2):185-196. doi:10.1038/sj.bjp.0704864.

Shaligram S, Sangüesa G, Akther F, Alegret M, Laguna JC, Rahimian R. Differential effects of high consumption of fructose or glucose on mesenteric arterial function in female rats. *J Nutr Biochem*. 2018; 57:136-144. doi:10.1016/j.jnutbio.2018.03.021.

Shapiro A, Mu W, Roncal C, Cheng KY, Johnson RJ, Scarpace PJ. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295(5):R1370-R1375. doi:10.1152/ajpregu.00195.2008.

Sherajee SJ, Rafiq K, Nakano D, et al. Aldosterone aggravates glucose intolerance induced by high fructose. *Eur J Pharmacol*. 2013;720(1-3):63-68. doi:10.1016/j.ejphar.2013.10.051.

Sil R, Ray D, Chakraborti AS. Glycyrrhizin ameliorates metabolic syndrome-induced liver damage in experimental rat model. *Mol Cell Biochem*. 2015;409(1-2):177-189. doi:10.1007/s11010-015-2523-y.

Sindelka G, Widimský J, Haas T, Prázný M, Hilgertová J, Skrha J. Insulin action in primary hyperaldosteronism before and after surgical or pharmacological treatment. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2000;108(1):21-5. doi: 10.1055/s-0032-1329211.

Sousa GJ, Oliveira PWC, Nogueira BV, et al. Fructose intake exacerbates the contractile response elicited by norepinephrine in mesenteric vascular bed of rats via increased endothelial prostanoids. *J Nutr Biochem*. 2017;48:21-28. doi:10.1016/j.jnutbio.2017.06.005.

Sowers JR, Raj L, Jialal I, Egan BM, Ofili EO, Samuel R, Zappe DH, Purkayastha D, Deedwania PC. Angiotensin receptor blocker/diuretic combination preserves insulin responses in obese hypertensives. *J Hypertens*. 2010;28(8):1761-9. doi: 10.1097/HJH.0b013e32833af380.

Stanhope KL, Havel PJ. Fructose consumption: considerations for future research on its effects on adipose distribution, lipid metabolism, and insulin sensitivity in humans. *J Nutr*. 2009;139(6):1236S-1241S. doi:10.3945/jn.109.106641.

Stanhope KL. Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2016;53(1):52-67. doi: 10.3109/10408363.2015.1084990.

Sun SZ, Empie MW. Fructose metabolism in humans - what isotopic tracer studies tell us. *Nutr Metab (Lond)*. 2012;9(1):89. Published 2012 Oct 2. doi:10.1186/1743-7075-9-89.

- Suzuki H, Shuto H, Shuto C, Ohara I, Inokuma S, Abe Y, Sukigara M. Eplerenone, an aldosterone blocker, is more effective in reducing blood pressure in patients with, than without, metabolic syndrome. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2012;6(4):141-7. doi:10.1177/1753944712452191.
- Takagawa Y, Berger ME, Tuck ML, Golub MS. Impaired endothelial alpha-2 adrenergic receptor-mediated vascular relaxation in the fructose-fed rat. *Hypertens Res.* 2002;25(2):197-202. doi:10.1291/hypres.25.197.
- Tappy L, Lê KA. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev.* 2010;90(1):23-46. doi:10.1152/physrev.00019.2009.
- Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298(2):E141-E145. doi:10.1152/ajpendo.00712.2009.
- Thorp AA, Schlaich MP. Relevance of Sympathetic Nervous System Activation in Obesity and Metabolic Syndrome. *J Diabetes Res.* 2015;2015:341583. doi:10.1155/2015/341583.
- Tran LT, Yuen VG, McNeill JH. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem.* 2009;332(1-2):145-159. doi:10.1007/s11010-009-0184-4.
- Turner JL, Bierman EL, Brunzell JD, Chait A. Effect of dietary fructose on triglyceride transport and gluoregulatory hormones in hypertriglyceridemic men. *Am J Clin Nutr.* 1979;32(5):1043-1050. doi:10.1093/ajcn/32.5.1043.
- van der Zijl NJ, Moors CC, Goossens GH, Hermans MM, Blaak EE, Diamant M. Valsartan improves β -cell function and insulin sensitivity in subjects with impaired glucose metabolism: a randomized controlled trial. *Diabetes Care.* 2011;34(4):845-851. doi:10.2337/dc10-2224.
- Van Schaftingen E. Découverte et rôle du fructose-2,6-bisphosphate [The discovery and role of fructose-2,6-diphosphate]. *Acta Gastroenterol Belg.* 1988;51(2):141-146.
- Vasdev S, Gill V, Parai S, Longerich L, Gadag V. Dietary vitamin E and C supplementation prevents fructose induced hypertension in rats. *Mol Cell Biochem.* 2002;241(1-2):107-114. doi:10.1023/a:1020835229591.
- Vos MB, Kaar JL, Welsh JA, et al. Added Sugars and Cardiovascular Disease Risk in Children: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation.* 2017;135(19):e1017-e1034. doi:10.1161/CIR.0000000000000439.
- Wada T, Kenmochi H, Miyashita Y, et al. Spironolactone improves glucose and lipid metabolism by ameliorating hepatic steatosis and inflammation and suppressing enhanced gluconeogenesis induced by high-fat and high-fructose diet. *Endocrinology.* 2010;151(5):2040-2049. doi:10.1210/en.2009-0869.
- Wajchenberg BL, Malerbi DA, Rocha MS, Lerario AC, Santomauro AT. Syndrome X: a syndrome of insulin resistance. Epidemiological and clinical evidence. *Diabetes Metab Rev.* 1994;10(1):19-29. doi:10.1002/dmr.5610100103.
- Walker RW, Dumke KA, Goran MI. Fructose content in popular beverages made with and without high-fructose corn syrup. *Nutrition.* 2014;30(7-8):928-35. doi:10.1016/j.nut.2014.04.003.

Wang YM, van Eys J. Nutritional significance of fructose and sugar alcohols. *Annu Rev Nutr.* 1981;1:437-475. doi:10.1146/annurev.nu.01.070181.002253.

Wehling M, Christ M, Theisen K. Membrane receptors for aldosterone: a novel pathway for mineralocorticoid action. *Am J Physiol.* 1992;263(5 Pt 1):E974-E979. doi:10.1152/ajpendo.1992.263.5.E974.

Wei Y, Whaley-Connell AT, Habibi J, et al. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates vascular apoptosis and injury via rescuing protein kinase B activation. *Hypertension.* 2009;53(2):158-165. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.121954.

White JS. Misconceptions about high-fructose corn syrup: is it uniquely responsible for obesity, reactive dicarbonyl compounds, and advanced glycation endproducts? *J Nutr.* 2009;139(6):1219S-1227S. doi: 10.3945/jn.108.097998.

Williams JS, Williams GH. 50th anniversary of aldosterone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(6):2364-2372. doi:10.1210/jc.2003-030490.

Wong SL, Leung FP, Lau CW, Au CL, Yung LM, Yao X, Chen ZY, Vanhoutte PM, Gollasch M, Huang Y. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin F2alpha mediates endothelium-dependent contractions in the aortae of hamsters with increased impact during aging. *Circ Res.* 2009; 104(2):228-35. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.179770.

World Health Organization, WHO *Guideline: Sugars Intake for Adults and Children.* Geneva: World Health Organization; 2015. doi:978 92 4 154902 8.

World Health Organization, WHO. Calls on Countries to Reduce Sugars Intake among Adults and Children, World Heal. Organ, 2016.

World Health Organization, WHO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases report of the joint WHO/FAO expert consultation, WHO, <https://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/trs916/summary/en/>, (2014). Acesso: fevereiro, 2022.

Xu L, Hu G, Qiu J, et al. High Fructose-Induced Hypertension and Renal Damage Are Exaggerated in Dahl Salt-Sensitive Rats via Renal Renin-Angiotensin System Activation. *J Am Heart Assoc.* 2021;10(14):e016543. doi:10.1161/JAHA.120.016543.

Yung LM, Wong WT, Tian XY, Leung FP, Yung LH, Chen ZY, Yao X, Lau CW, Huang Y. Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats. *PLoS One.* 2011;6(3):e17437. doi: 10.1371/journal.pone.0017437.

Zhang DM, Jiao RQ, Kong LD. High Dietary Fructose: Direct or Indirect Dangerous Factors Disturbing Tissue and Organ Functions. *Nutrients.* 2017;9(4):335. Published 2017 Mar 29. doi:10.3390/nu9040335.