



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

PAOLA MIRANDA SULIS

**IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO COM O ÓLEO DE PEIXE E
DA INTERRUPÇÃO DO TRATAMENTO COM FRUTOSE
SOBRE O METABOLISMO DA GLICOSE E LIPÍDEOS EM
RATOS SUBMETIDOS À INGESTÃO CRÔNICA DE FRUTOSE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Florianópolis
2016**

Paola Miranda Sulis

**IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO COM O ÓLEO DE PEIXE E
DA INTERRUPÇÃO DO TRATAMENTO COM FRUTOSE
SOBRE O METABOLISMO DA GLICOSE E LIPÍDEOS EM
RATOS SUBMETIDOS À INGESTÃO CRÔNICA DE FRUTOSE**

Dissertação submetida à Banca Examinadora do programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas

Orientador: Prof. Dr. Alex Rafacho.

Co-orientador: Prof. Dr. Everson Nunes.

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Miranda Sulis, Paola
IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO COM O ÓLEO DE PEIXE E DA
INTERRUPÇÃO DO TRATAMENTO COM FRUTOSE SOBRE O METABOLISMO
DA GLICOSE E LIPÍDEOS EM RATOS SUBMETIDOS À INGESTÃO CRÔNICA
DE FRUTOSE / Paola Miranda Sulis ; orientador, Alex
Rafacho ; coorientador, Éverson Nunes. - Florianópolis, SC,
2016.

84 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas.

Inclui referências

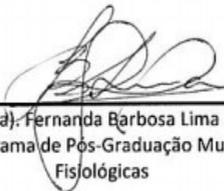
1. Ciências Fisiológicas. 2. Síndrome Metabólica. 3.
Frutose. 4. Óleo de Peixe. 5. Reversibilidade. I. Rafacho,
Alex. II. Nunes, Éverson. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em
Ciências Fisiológicas. IV. Título.

"Impacto da suplementação com o óleo de peixe e da interrupção do tratamento com frutose sobre o metabolismo da glicose e lipídeos em ratos submetidos à ingestão crônica de frutose"

Por

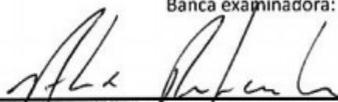
Paola Miranda Sulis

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (05/PPGMCF/2016) do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas - UFSC.

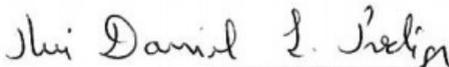


Prof(a). Dr(a). Fernanda Barbosa Lima Christian
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas

Banca examinadora:



Dr(a) Alex Rafacho (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Rui Daniel Schroder Prediger (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Fernanda Barbosa Lima Christian (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Gabriel Forato Anhô (Universidade Estadual de Campinas)

Florianópolis, 12 de Agosto de 2016.

AGRADECIMENTOS

Aos meus guias espirituais e à Nossa Senhora de Lourdes, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

Ao meu pai, que sempre me incentivou a progredir, a estudar e sem esquecer de que precisamos estar felizes nas nossas escolhas. À minha mãe, pelo exemplo de força e pelo amor que me mostrou a direção correta e me ensinou a ter fé na vida.

Ao meu querido Miguel, por ter cuidado do Carlinhos nas minhas ausências, por ter acreditado em mim mais do que eu mesma acreditava e pelo amor que dispensa a mim e aos nossos filhos. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

À minha irmã, Natássia, pelo amor que tem pelos meus filhos e por estar ao meu lado nos meus momentos mais intensos, fossem eles felizes ou tristes.

Aos meus dois gurizinhos, Carlos e Joaquim, que hoje representam o meu riso fácil e preenchem o meu dia-a-dia de vida!

Ao meu orientador, professor Dr. Alex Rafacho, pela oportunidade de realizar este objetivo, por todos os ensinamentos e confiança a mim depositados e pelas palavras de motivação e incentivo em muitos momentos deste ciclo.

À UFSC e ao PPGMCF por ter me aberto portas e pela oportunidade de aprendizado técnico e científico.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro e concessão de bolsa de estudo.

Aos professores Dr. Rui Prediger, Dra. Fernanda Lima Christian, Dr. Gabriel Forato Anê e Dr. Gustavo Jorge dos Santos por aceitarem compor a minha banca de defesa, contribuindo para que este trabalho fique o melhor possível.

À toda equipe do LIDoC, Amanda, Kátia, Júlia, Cris, Thayz, Carolina, Henvet, professores Alex Rafacho e Éverson Nunes e tantos outros colegas que não mais fazem parte do grupo, a minha gratidão e admiração por vocês é imensa. Muito obrigada pela ajuda no desenvolvimento dos meus experimentos e por todo o aprendizado. Às amigas queridas que o mestrado me deu, ganho este tão valioso quanto a realização deste sonho. Amanda, Júlia, Kátia, Cris e Thayz: vocês são especiais e sempre terão um lugar no meu coração! À Júlia e à Amanda um agradecimento bem especial, pelas “acolhidas” nos momentos mais difíceis. Dizem por aí que os amigos verdadeiros são aqueles que

permanecem ao nosso lado na dificuldade... E foi exatamente isso que aconteceu! Quando eu estava maluca com a Fisiologia em Porto Alegre, quando eu soube que esperava o Joaquim, quando meus filhos gritavam sem parar dentro de casa e eu perdida com a dissertação para escrever... Vocês duas estavam aqui, aqui ao meu lado. Vocês sabem qual é o valor disso? Pra mim, incalculável... Muitas vezes eu deixei de acreditar na solidariedade humana, mas depois desta demonstração de carinho, eu acredito! Valeu... (porque o 'muito obrigada' já gastou).

NINGUÉM VENCE SOZINHO! Muito obrigada, à todos vocês!

RESUMO

O consumo regular de bebidas adoçadas com frutose, em especial de refrigerantes, está fortemente associado ao desenvolvimento de distúrbios cardiometabólicos, tais como obesidade, hipertensão, dislipidemia, resistência à insulina e hiperglicemia. Em contrapartida, a suplementação com óleo de peixe tem se mostrado benéfica em atenuar alguns destes parâmetros. A pesquisa teve como objetivo comparar possíveis alterações metabólicas com diferentes concentrações de frutose na água de beber e avaliar os efeitos da suplementação com óleo de peixe. Também, avaliamos a capacidade de manutenção ou recuperação das eventuais alterações metabólicas causadas pela ingestão de frutose após a interrupção do tratamento. Para tal, utilizamos ratos Wistar com aproximadamente 30 dias de vida, distribuídos em 2 lotes experimentais contendo 5 grupos em cada um deles a saber: grupo controle (C) teve livre acesso a água, grupo frutose (F) teve livre acesso a água contendo frutose como será descrito a seguir, grupo frutose + óleo de peixe (FOP) teve livre acesso a água contendo frutose e recebeu suplementação com óleo de peixe como descrito a seguir, grupo óleo de peixe (OP) teve livre acesso a água e foi suplementado com óleo de peixe e grupo frutose/reversibilidade (FR) que teve a retirada da água contendo frutose ao término do tratamento e mantido por mais 60 dias com livre acesso a água. No primeiro lote experimental os ratos F, FOP e FR receberam água acrescida de frutose a 10%, por 60 dias consecutivos, e foram suplementados com óleo de peixe, via gavagem, pelos últimos 30 dias (1 g/kg peso corpóreo). O segundo lote foi nos moldes do primeiro, exceto pela concentração de frutose na água que foi de 30%. Foram avaliadas as variáveis como peso corpóreo, ingestão alimentar, hídrica e energética, glicemia, triacilgliceridemia, insulinemia, gordura hepática, ácido úrico plasmático, peso total de tecido adiposo e lipólise em fragmentos de tecido adiposo (resultados expressos como média \pm erro padrão da média, ANOVA uma via, nível de significância de 95% ($p < 0,05$)). Ao final do tratamento os grupos F e FOP apresentaram alterações de ingestão alimentar e hídrica se comparados aos seus respectivos controles, sem alterações em ingestão calórica e peso corpóreo. Também demonstraram incremento nas concentrações de triacilglicerol a partir do 30º dia de tratamento quando comparados aos grupos C e OP. Os grupos F30% e FOP30% apresentaram incrementos no peso total de tecido adiposo visceral quando comparados aos controles, bem como aumento nos níveis de insulinemia. Os grupos FR10% e FR30% apresentaram diminuição de

ingestão hídrica e níveis de triacilglicerol, e aumento no consumo alimentar imediatamente após a interrupção da água com frutose. Nossos dados demonstram que ambas as concentrações promoveram hipertriacilgliceridemia transitória, alertando para o consumo da frutose em excesso. Neste projeto a suplementação com óleo de peixe demonstrou ineficiência em normalizar as variáveis alteradas.

Palavras-Chave: Síndrome Metabólica, Frutose, Óleo de peixe, Reversibilidade.

ABSTRACT

Regular consumption of fructose-sweetened beverages, particularly soft drinks, is strongly associated with the development of cardiometabolic disorders such as obesity, hypertension, dyslipidemia, insulin resistance, and hyperglycemia. However, supplementation with fish oil has been shown to be beneficial in attenuating these parameters. This research aimed to compare metabolic changes with different fructose ingestion regimes (10% and 30% fructose in drinking water) and to evaluate the effects of supplementation with fish oil. Also, we evaluate the maintainability or recovery of any metabolic changes caused by fructose intake after the interruption of the treatment. Therefore, we used Wistar rats approximately 30 days old, which were separated in ten groups: 10% control group and 30% control (C), 10% Fructose group and 30% fructose (F), 10% fructose + oil fish group and 30% fructose + fish oil (FFO), 10% fish oil group and 30% fish oil (FO) and 10% fructose/reversibility and 30% fructose/reversibility (FR). The rats in the first experimental batch received 10% fructose, for 60 consecutive days, and were supplemented with fish oil by intragastric gavage for the last 30 days (1g/kg body weight). The animals of the second experimental batch followed the treatment with fructose 30%, for 60 consecutive days and were supplemented with fish oil by intragastric gavage for the last 30 days (1g/kg body weight). Variables such as body weight, food, water and energy intake, blood glucose, triacylglyceridemia, insulin, liver fat, plasma uric acid, total weight of adipose tissue and lipolysis in adipose tissue fragments were evaluated (results expressed as mean \pm standard error, one-way ANOVA, a significance level of 95%, $p < 0.05$). At the end of treatment, the groups F and FOP had food and water intake alterations compared to their respective controls without changes in caloric intake and body weight. Also showed an increase in triacylglycerol concentrations from the 30th day of treatment compared to C and OP groups. The F30% and FOP30% groups showed increases in total weight of visceral adipose tissue compared to controls, as well as increased levels of insulin. The FR10% groups and FR30% showed a decrease in water intake and triglyceride levels and increased food intake immediately after the interruption the water with fructose. Our data demonstrate that both concentrations promoted transient hypertriacylglyceridemia, warning for the consumption of excess fructose. In this project, supplementation with fish oil was not efficient in normalizing the fructose ingestion metabolic effects.

Keywords: Metabolic Syndrome, Fructose, Fish oil, Reversibility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Metabolismo da Frutose.	23
Figura 2- Período correspondente ao tratamento.....	25
Figura 3- Ingestão hídrica nos grupos que receberam água frutada.	40
Figura 4- Administração crônica de frutose 10% diminui ingestão alimentar.....	42
Figura 5- Administração crônica de frutose 10% e 30% não altera peso corpóreo.	43
Figura 6- Administração crônica de frutose modifica temporariamente ingestão calórica.....	44
Figura 7- Administração crônica de frutose não altera glicose sanguínea.....	45
Figura 8- Administração crônica de frutose 10% induziu hipertriacilgliceridemia transitória.....	46
Figura 9- Administração crônica de frutose 30% induziu aumento de triacilglicerol transitório.....	47
Figura 10- Tratamento com frutose 10% e 30% não induz alterações na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina em ratos...	50
Figura 11- Tratamento com frutose 10% (A) e 30% (B) não induz alterações na sensibilidade à insulina em ratos.	52
Figura 12- Tratamento com frutose 10% não induziu hiperinsulinemia.....	53
Figura 13- Tratamento com frutose 10% não resultou alterações na atividade lipolítica do TAB.....	54
Figura 14- Tratamento com frutose 30% não resultou alterações na atividade lipolítica do TAB.....	55
Figura 15 Trinta, sessenta e cento vinte dias após interrupção da administração de frutose, ratos diminuem ingestão hídrica.....	58
Figura 16- Trinta, sessenta e cento vinte dias após interrupção da administração de frutose, ratos aumentam ingestão alimentar.....	59
Figura 17- Após cento e vinte dias de tratamento com frutose, os ratos apresentam diminuição na ingestão calórica e alteram peso corpóreo.....	60
Figura 18- Interrupção no tratamento com frutose após cento e vinte dias não altera valores de glicose sanguínea (A) e (B).....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Componentes da Síndrome Metabólica.....	13
Tabela 2- Principais estudos relacionando a ingestão de frutose e suas alterações metabólicas.....	14
Tabela 3- Percentual de ácidos graxos presentes no óleo de peixe.....	35
Tabela 4- Concentrações plasmáticas de triacilglicerol de ratos tratados com Frutose 30% e suplementados com óleo de peixe.....	48
Tabela 5- Concentrações plasmáticas de ácido úrico e conteúdo de gordura hepática em ratos tratados com Frutose 10% ou 30% e suplementados com óleo de peixe.	49
Tabela 6- Massa de tecidos e órgãos de ratos tratados com frutose 10% ou 30% e suplementados com óleo de peixe.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	American Diabetes Association
AGPIs	Ácidos graxos polinsaturados
AMP	Monofosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
ASC	Área sob a curva
C	Grupo Controle
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COL	Colesterol total
DAG	Diacilglicerol
DHA	Ácido docosahexaenoico
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNL	Lipogênese <i>de novo</i>
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EPM	Erro padrão da média
F	Grupo Frutose
F10%	Frutose 10%
F30%	Frutose 30%
FR	Grupo Frutose reversibilidade
FR10	Frutose Reversibilidade 10%
FR30	Frutose Reversibilidade 30%
GLUT	Transportador de glicose
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ipITT	Teste de tolerância à insulina intraperitoneal
IRS-1	Substrato do receptor da insulina 1
<i>Kitt</i>	Constante de decaimento de glicose
MAPK	Proteínas cinases ativadas por agentes mitogênicos
NO	Óxido nítrico
oGTT	Teste de tolerância à glicose oral
OP	Grupo Óleo de Peixe
PKC	Proteína cinase C
PPARs	Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos
RI	Resistência à insulina
SM	Síndrome Metabólica
SREBP-1	Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol

TAB	Tecido adiposo branco
TAG	Triacilglicerol
TG	Triglicerídeos
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	CONSUMO EXCESSIVO DE FRUTOSE E ALTERAÇÕES METABÓLICAS	17
1.2	METABOLISMO DA FRUTOSE	22
1.2.1	Consumo de frutose e sensibilidade à insulina	24
1.3	ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS N-3	25
1.3.1	Importância dos ácidos graxos polinsaturados n-3 (AGPIs n-3) como tratamento coadjuvante em contextos de alterações metabólicas	25
1.3.2	Mecanismos de ação dos ácidos graxos polinsaturados n-3 ..	26
1.4	JUSTIFICATIVA	28
2	OBJETIVOS	31
2.1	GERAL	31
2.2	ESPECÍFICOS	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	ANIMAIS	33
3.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS	33
3.3	PARÂMETROS METABÓLICOS	35
3.3.1	Peso corpóreo	35
3.3.2	Ingestão hídrica e alimentar	35
3.3.3	Ingestão calórica	35
3.3.4	Glicose sanguínea, triacilglicerol plasmático, insulinemia e ácido úrico	36
3.3.5	Teste de tolerância à glicose oral (oGTT)	36
3.3.6	Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT)	37
3.3.7	Lipólise do tecido adiposo	37
3.3.8	Gordura Hepática	37
3.4	PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS/ESTRUTURAIS	38
3.4.1	Massa absoluta e relativa de órgãos metabólicos	38
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	38
4	RESULTADOS	39
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL	39
4.1.1	Ingestão hídrica nos grupos que receberam água frutada	39
4.1.2	O consumo de ração é reduzido em animais tratados com frutose	40

4.1.3	O peso corpóreo não altera após consumo de frutose enquanto há discreto aumento no consumo calórico, e suplementação com óleo de peixe não apresenta efeitos sobre estas variáveis.....	42
4.1.4	O triacilglicerol plasmático aumenta durante o tratamento com frutose, mas não a glicose sanguínea, sem efeito do óleo de peixe.....	45
4.1.5	O tratamento com frutose não promoveu hiperuricemia nem alteração do conteúdo de gordura hepática.....	48
4.1.6	Tolerância à glicose e sensibilidade periférica à insulina	49
4.1.9	Insulinemia.....	52
4.1.7	O consumo de frutose não altera a atividade lipolítica de tecido adiposo e a suplementação com óleo de peixe também não exerce nenhum efeito.....	53
4.1.8	Consumo de frutose (30%) resulta em aumento da adiposidade visceral e o óleo de peixe não previne esta alteração.....	56
4.2	GRUPO FRUTOSE – REVERSIBILIDADE	57
4.2.1	A interrupção de água frutada resulta em normalização dos valores de ingestão hídrica.....	57
4.2.2	A ingestão alimentar é normalizada após interrupção da oferta de água frutada.....	58
4.2.3	Peso corpóreo e ingestão calórica.....	59
4.2.4	Glicemia e Triacilgliceridemia	60
5	DISCUSSÃO.....	63
6	CONCLUSÃO	71
7	PERSPECTIVAS	73
	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSUMO EXCESSIVO DE FRUTOSE E ALTERAÇÕES METABÓLICAS

O consumo excessivo de frutose nas dietas ocidentais tem contribuído para o aumento na incidência de sobrepeso e obesidade nos países desenvolvidos (MELANSON, et al. 2007) e em desenvolvimento (GAINO, SILVA; 2011). Nos últimos anos houve aumento progressivo da ingestão calórica diária em dietas ocidentais, em contrapartida, a ingestão de ácidos graxos insaturados diminuiu consideravelmente nos últimos 30 anos (LICHTENSTEIN, et al.1998). O Centro Nacional de Estatística em Saúde, nos Estados Unidos, relatou aumento de 67,7g na ingestão diária de carboidratos em homens e aumento de 62,4g em mulheres, entre o período de 1971 e 2004 (CHARREZ; QUIO; HEBBARD, 2015). Assim, o consumo de dieta rica em carboidratos está entre as principais causas no aumento da ingestão calórica.

O aumento do consumo de frutose deve-se a sua maior ação edulcorante, maior palatibilidade e reduzido custo relacionado à sacarose (TAPPY; LÊ, 2010). Os seres humanos consomem, em média, 500 ml/dia de bebidas adoçadas com frutose (BRAY, 2013), e a mesma pode ser ingerida como sacarose (constituída por 50% de frutose e 50% de glicose) ou xarope de milho concentrado em frutose (55% ou 65% de frutose). O aumento paralelo do consumo de xarope de milho concentrado em frutose e da prevalência de obesidade nos últimos anos sugere uma correlação entre a ingestão de açúcares e a progressão de síndrome metabólica (SM). Em humanos, a síndrome metabólica é caracterizada por um conjunto de alterações cardiometabólicas, cuja base reside na resistência à insulina (RI) e adiposidade visceral. A predisposição genética associada à alimentação inadequada e sedentarismo formam os pilares para a instalação da SM que deve conter pelo menos duas alterações conjuntas além do aumento da circunferência abdominal, a saber: dislipidemia (hipertriacilgliceridemia e/ou hipercolesterolemia), hipertensão arterial e hiperglicemia de jejum alterada (NCEP-ATP III, 2001) (Tabela 1).

Tabela 1- Componentes da Síndrome Metabólica.

Componentes	Valores de referência
Circunferência abdominal	
Homens	> 102 cm
Mulheres	> 88 cm
Triglicerídeos (ambos os gêneros)	≥ 150 mg/dL ou Rx
HDL – colesterol	
Homens	< 40 mg/dL ou Rx
Mulheres	< 50 mg/dL ou Rx
Pressão arterial (ambos os gêneros)	≥ 130 mmHg ou ≥ 85 mmHg ou Rx
Glicemia de jejum (ambos os gêneros)	≥ 100 mg/dL ou Rx

Valores estimados para caracterização da SM conforme NCEP-ATP III (2001). Rx: tratamento farmacológico.

Estudos realizados em ratos indicam o consumo crônico de açúcares refinados como fator contribuinte para a desregulação cardiometabólica. Portanto, o aumento do consumo de bebidas adoçadas com frutose e sua influência sobre o aumento da incidência e prevalência da obesidade, SM e diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) demonstra a importância de se investigar em modelos experimentais as consequências do consumo de açúcares, em especial da frutose (STANHOPE; HAVEL, 2008). Estudos epidemiológicos constataram que há uma relação estreita entre o consumo de adoçantes calóricos e o ganho de adiposidade visceral e, conseqüentemente, o desenvolvimento de doenças crônicas como o diabetes *mellitus* tipo 2 e doenças cardiovasculares comuns na SM (HU; MALIK, 2010).

Há evidências consideráveis de que a frutose seja mais deletéria do que a glicose em termos de riscos cardiovasculares como a hipertensão arterial (DULLOO; MONTANI, 2008). Segundo Basciano et al. (2005), o metabolismo de carboidratos no fígado é projetado para metabolizar glicose ativamente com uma capacidade limitada de pequenas doses diárias de frutose. Quando ocorre ingestão excessiva de frutose há sobrecarga hepática, alterando o metabolismo de carboidratos, causando disfunções na homeostase glicêmica e, conseqüentemente elevação da

lipogênese *de novo* (DNL) hepática e a instalação de resistência à insulina.

A SM pode ser reproduzida experimentalmente a partir da oferta de sacarose na ração de ratos, por efeito da frutose. Sheludiakova e Boakes (2012) demonstraram que ratos machos submetidos a uma dieta contendo 5% de frutose associado à 5% de glicose na água de beber por 56 dias consecutivos, apresentavam maiores riscos para o desenvolvimento de DM2 e alterações cardiovasculares, pois houve aumento nos níveis de triglicerídeos plasmático e gordura hepática, aumento de adiposidade retroperitoneal e intolerância à glicose. Modelos animais com roedores submetidos à dieta rica em frutose ou sacarose apresentaram elevação nas concentrações de triacilglicerol plasmático, RI, hipertensão e ganho de peso (BASCIANO, et al. 2005; TAPPY; LÊ, 2010). Ratos *Wistar* submetidos a uma dieta com frutose a 10% na água de beber pelo período de 3 semanas apresentaram alterações metabólicas como o aumento nas concentrações de glicose sanguínea e de triacilglicerol plasmático (ALZAMENDI et al. 2009). Sumiyoshi et al. (2006) propôs um modelo experimental com camundongos, introduzindo dieta rica em gordura e sacarose por 55 semanas, a fim de avaliar fatores de risco e o desenvolvimento de obesidade, diabetes, aterosclerose e hipertensão. Os autores observaram que após este longo período de tratamento os camundongos desenvolveram aumento significativo do peso corpóreo, hiperglicemia, hiperlipidemia e intolerância à glicose. A tabela abaixo apresenta alguns estudos com modelos animais os quais foram tratados com frutose e demonstraram alterações metabólicas nocivas, reafirmando a validade deste modelo no estudo de desordens metabólicas.

Tabela 2- Principais estudos relacionando a ingestão de frutose e suas alterações metabólicas.

	Autor	Modelo	Resultados
Chronic Intake of High-Fat and High-Sucrose Diets Differentially Affects Glucose Intolerance in Mice	Sumiyoshi, et al. 2006	Camundongos C57BL machos, com 30 dias de vida, alimentados com sacarose por 55 dias	Ganho de peso, hiperlipidemia, hiperleptinemia, intolerância à glicose e RI
Fructose-rich diet-induced abdominal adipose tissue endocrine dysfunction in normal male rats.	Alzamendi, et al. 2009	Ratos machos com 180 - 200g de peso corpóreo receberam frutose 10% na água de beber por 3 semanas	Aumento significativo nos níveis de leptina, adiponectina e do PAI-1, RI.
Anti-inflammatory Effect of Atorvastatin on Vascular Reactivity and Insulin Resistance in Fructose Fed Rats	Mahmoud, et al. 2012	Ratos Wistar machos com 80-120g de peso corpóreo, alimentados com frutose 10% na água de beber por 8 semanas	Hiperinsulinemia sem alteração nos níveis de glicose basal, resistência à insulina, aumento nos níveis de TNF- α , hipercolesterolemia.
Effect of Pioglitazone on the Fructose-Induced Abdominal Adipose Tissue Dysfunction	Alzamendi, et al. 2012	Ratos machos de 120-200g de peso corpóreo receberam frutose 10% na água de beber por 3 semanas	Hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertriacilgliceridemia, hiperleptinemia.
Metabolic and behavioural effects of sucrose and fructose/glucose drinks in the rat	Sheludiakova; Bokes, 2012	Ratos Wistar machos com aprox. 125 dias de vida, receberam sacarose 10% por 56 dias	Não houve alteração de peso em relação ao grupo controle. Aumento de adiposidade visceral, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, hiperglicemia.

	Autor	Modelo	Resultados
High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats.	Panchal, et al. 2011	Ratos Wistar machos com 8 – 9 semanas de vida, receberam Frutose 25% na água de beber por 16 semanas	Aumento no peso corporal, aumento no consumo de energia, adiposidade visceral, intolerância à glicose, dislipidemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia.
The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats.	Mamikutty, et al. 2014	Ratos Wistar machos com 250 – 300 g de peso corpóreo, receberam Frutose com 20% e 25% na água de beber por 8 semanas	Os ratos alimentados com Frutose 20% desenvolveram parâmetros significativos maiores de obesidade em comparação com aqueles alimentados com Frutose 25%. Hipertrofia de adipócitos em 20% e 25% e hipertensão arterial sistólica, hipertrigliceridemia e hiperglicemia em ambos os grupos.
Ursodeoxycholic acid ameliorates fructose-induced metabolic syndrome in rats.	Mahmoud; Elshazly, 2014	Ratos Wistar machos, com 140 – 160 g de peso corpóreo, receberam Frutose com 10% na água de beber por 12 semanas	Aumento do peso corporal, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperuricemia hipertensão arterial e resistência à insulina.

Os estudos apresentados na Tabela 2 demonstram, em sua maioria, alterações que configuram uma síndrome metabólica recorrente do consumo de alto teor de açúcar, as mesmas considerações fazem despertar para a importância de pesquisas que busquem mecanismos pelos quais estas alterações possam ser atenuadas ou revertidas.

1.2 METABOLISMO DA FRUTOSE

A frutose obtida na forma livre ou após a digestão da sacarose é transportada pelo GLUT-5 presente na membrana luminal dos enterócitos e deixa a célula em direção a circulação sanguínea por meio do transportador de glicose GLUT-2, presente na membrana basolateral (TAPPY; LE, 2010). A maior parte do metabolismo da frutose ocorre no fígado (50-75%), sendo o restante metabolizado principalmente nos rins e adipócitos (VAN, 1986). No fígado, a frutose é rapidamente metabolizada em frutose-1-fosfato (P) pela enzima frutocinase (TAPPY; LE, 2010). A frutose-1-P pode ser convertida em várias trioses-P, sabidamente: gliceraldeído, dihidroxiacetona-P e gliceraldeído-3-P (Figura 1) (RUTLEDGE; ADELI, 2007). A maior parte das trioses produzidas pelo metabolismo da frutose é convertida em glicose e glicogênio através da gliconeogênese (KOO, et al. 2008). As trioses-P ainda podem ser convertidas em piruvato e oxidadas em CO₂ e H₂O (dióxido de carbono e água, respectivamente) no ciclo de Krebs (TAPPY; LE, 2010). No entanto, parte é convertida em lactato, o qual é liberado na corrente sanguínea (STANHOPE; RAVEL, 2008). Finalmente, parte dos átomos de carbono da frutose pode ser usado para a síntese de ácidos graxos e glicerol nos hepatócitos, através do processo de DNL (TRAN, et al. 2009).

Além disso, o metabolismo da frutose inibe a oxidação lipídica hepática, favorecendo assim a reesterificação dos ácidos graxos com o glicerol-3-P para a formação de triacilglicerol, e a síntese de VLDL ricas em triacilglicerol que são depois secretadas na corrente sanguínea (TOPPING; MAYES, 1972).

O metabolismo hepático da frutose difere consideravelmente do da glicose por várias razões. A entrada de glicose na via glicolítica é controlada pela glicocinase, enzima que possui um elevado K_m (afinidade do substrato pela enzima) para a glicose e, portanto, a taxa de fosforilação da glicose varia com as alterações da sua concentração portal (HANSMANNEL; MORDIER; IYNEDJIAN, 2006). A glicose-6-P é convertida em frutose-6-P e depois em frutose-1,6-bifosfato através de uma reação catabolizada pela fosfofrutocinase. A atividade desta enzima é inibida pelo ATP (trifosfato de adenosina) e citrato, o que permite a regulação da reação de acordo com o estado energético da célula (ANDRÉS, et al. 1988). A frutose-1-6-bifosfato é posteriormente convertida em piruvato antes de entrar no ciclo de Krebs (Figura 1).

A conversão de glicose em piruvato é inteiramente regulada pela insulina (estimula a expressão gênica da glicocinase e ativa as enzimas

glicolíticas) e pelo estado energético da célula (TAPPY; LE, 2010). A conversão de frutose em trioses-P ocorre de forma independente da insulina e é um processo extremamente agudo devido ao baixo K_m da frutocinase pela frutose e decorrente da ausência de *feedback* negativo pelo ATP ou citrato. Esta alta absorção e fosforilação de frutose pelo fígado podem levar à depleção de ATP, o qual é metabolizado em AMP (monofosfato de adenosina) e ácido úrico (Figura 1) (TAPPY; LE, 2010). Por outro lado, permitem um fluxo desregulado de carbonos para a DNL, aumentando assim a síntese de lipídeos (RUTLEDGE; ADELI, 2007). As características lipogênicas da frutose, em associação com a sua capacidade para provocar depleção de ATP e a produção de ácido úrico, são as principais causas responsáveis pela sua capacidade de induzir a SM.

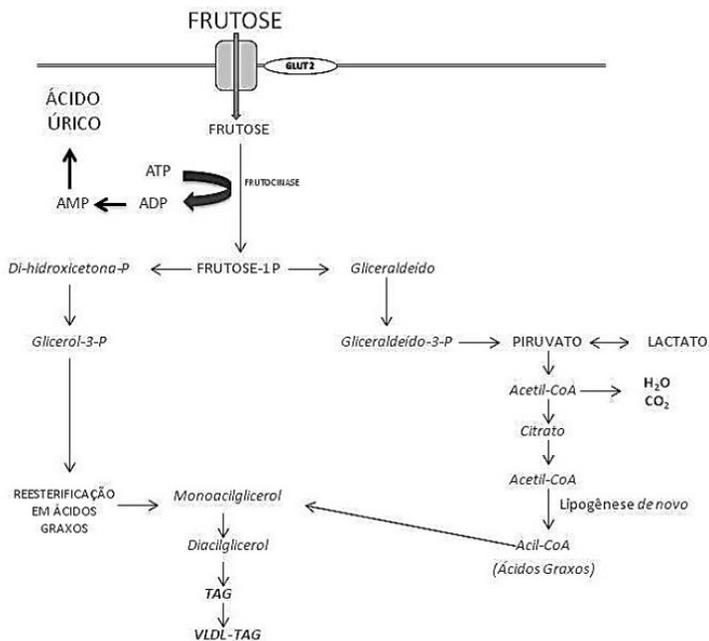


Figura 1- *Metabolismo hepático da frutose*. A Frutose absorvida pelo fígado pode ser oxidada em CO_2 e, em seguida, convertida em lactato. A absorção maciça e posterior fosforilação da frutose no fígado pode levar a uma grande degradação do ATP em AMP, e após em ácido úrico. TAG: triacilglicerol; VLDL: lipoproteínas de muito baixa intensidade; Adaptado de TAPPY; LÊ, 2010.

Em indivíduos com diabetes *mellitus* a ingestão de frutose pode reduzir as concentrações de glicose plasmática devido à estimulação da glicocinase e, conseqüentemente, aumentar a absorção de glicose hepática (NAKAGAWA, et al. 2006). Tal fato levou ao conceito de que pequenas ingestões de frutose poderiam ser benéficas nos diabéticos, notavelmente mediante uso deste açúcar como adoçante. No entanto, os outros efeitos da frutose, particularmente a indução de RI e aumento das concentrações de triacilglicerol, levaram algumas entidades como a ADA (*American Diabetes Association*) a não recomendar a sua suplementação nestes pacientes (BANTLE, 2009). Todavia, não existe um consenso em relação à utilização deste açúcar por pessoas portadoras do diabetes *mellitus*, porque embora a frutose ocasione alterações metabólicas nocivas decorrentes de um consumo excessivo, pacientes diabéticos são orientados a consumir uma quantidade restrita de frutas e legumes contendo a frutose (FRANZ, et al. 2002).

1.2.1 Consumo de frutose e sensibilidade à insulina

A redução da sensibilidade periférica à insulina é denominada de RI. A RI é caracterizada pela diminuição da ação da insulina em tecidos insulino-responsivos (ex., muscular esquelético, adiposo, hepático) podendo resultar em redução da captação celular de glicose para uma dada concentração de insulina (ex., tecidos muscular esquelético e adiposo) bem como redução da supressão da gliconeogênese hepática promovida pela insulina (SINAIKO, 2005). A RI é um distúrbio que está normalmente associado a defeitos pós-receptores da via de sinalização insulínica, interferindo nos processos intracelulares regulados por esta via como, por exemplo, na translocação e/ou competência dos transportadores de glicose (GLUT-4) muscular que têm importante função na captação da glicose (SERAPHIM, et al. 2001).

O depósito de lipídeos intramusculares (que pode ser visto em indivíduos obesos) também pode interferir na regulação do translocamento de GLUT-4 à membrana plasmática e contribuir para a RI periférica (MOREIRA, et al. 2008). Assim, estes estudos sugerem que uma alternativa de se identificar RI seria a partir de indicadores associados ao conteúdo de gordura corpórea (MOREIRA, et al. 2008).

Têm sido propostos vários mecanismos pelos quais a frutose pode induzir RI. No fígado, o diacilglicerol (DAG), um intermediário lipídico que acumula durante a DNL, tem a capacidade de ativar a proteína cinase C (PKC) hepática (MORINO; PETERSEN; SHULMAN, 2006). Adicionalmente, a frutose-1-P ativa a cinase 7 ativadora de proteínas da

família da MAPK (MKK7), que por sua vez estimula a cinase 8 de proteínas ativadas por agentes mitogênicos (MAPK8). Ambas, a PKC e a MAPK8 induzem a fosforilação em serina e subsequente inativação do substrato 1 do receptor da insulina (IRS-1), levando assim à alteração da sinalização da insulina e consequente RI hepática (WEI, et al. 2007). Em relação ao músculo, o excesso de lipídeos na circulação sanguínea derivado da elevada taxa de DNL pode levar à sua deposição intramiocelular (MONTELL, et al. 2001), causando RI pelo já referido mecanismo via DAG (MORINO; PETERSEN; SHULMAN, 2006).

Outro mecanismo proposto para a indução de RI pela ingestão excessiva de frutose é mediante inibição da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) pelo ácido úrico e consequente diminuição dos níveis plasmáticos de óxido nítrico (NO) (MILLER; ADELI, 2008). Normalmente, a insulina aumenta a biodisponibilidade endotelial de NO, dilatando os vasos sanguíneos e permitindo assim que a glicose chegue ao músculo com facilidade. Assim, quando há diminuição de NO, a captação de glicose diminui estimulando o aumento na produção e liberação de insulina em um mecanismo compensatório, ocorrendo assim a hiperinsulinemia e RI (NAKAGAWA, et al. 2005). O ácido úrico também é responsável por induzir RI pelos seus efeitos diretos no adipócito, notadamente, o aumento do estresse oxidativo, a ativação da resposta pró-inflamatória e a diminuição de secreção de adiponectina (SAUTIN; JOHNSON, 2008).

Vários estudos têm mostrado que o consumo excessivo de frutose induz características metabólicas nocivas, tais como a esteatose hepática, que pode levar à RI hepática, impedindo a transdução do sinal de insulina por meio de metabolitos lipídicos, como o DAG (VARMAN, 2010).

1.3 ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS N-3

1.3.1 Importância dos ácidos graxos polinsaturados n-3 (AGPIs n-3) como tratamento coadjuvante em contextos de alterações metabólicas

Atualmente o óleo de peixe composto por ácidos graxos polinsaturados ômega 3 como EPA (ácido eicosapentaenoico) e DHA (ácido docosahexaenoico), vem sendo recomendado como suplemento alimentar por apresentar uma variedade de benefícios à saúde, principalmente aos fatores de risco do sistema cardiovascular. A ingestão de ácidos graxos promove a incorporação de fosfolipídios na membrana plasmática, o que estimula a produção de eicosanoides. Além disso, o

EPA e DHA promovem a síntese de resolvinas as quais são responsáveis por propriedades anti-inflamatórias, e tem ações regulatórias na transcrição de genes inflamatórios (CALDER, 2009).

O EPA e DHA têm efeito anti-inflamatório relevante e, considerando que a inflamação subclínica está na base de muitas doenças crônicas, incluindo a obesidade e o DM2, a suplementação com óleo de peixe rico em ômega 3 pode representar uma alternativa suplementar a fim de amenizar o surgimento de distúrbios cardiometabólicos.

Em uma série de experimentos introduzindo lipídeos (óleo de girassol (34% w/v), óleo de salmão (16% w/v), óleo de cártamo (16% w/v)) na dieta de ratos, foi observado que as alterações típicas de uma SM induzida pela ingestão de frutose (64%) foram atenuadas após a ingestão destes óleos, com efeito significativo sobre a sensibilidade periférica à insulina (MELLOUK, et al. 2011). Ainda, em pesquisas com ratos, Soria et al. (2002) demonstraram que a suplementação com 7% (w/v) de óleo de peixe por 120 dias promoveu uma redução da adiposidade e da hipertrofia celular dos adipócitos induzidas pela administração crônica de ração contendo 64% (w/v) de sacarose. Em estudos com primatas, Bremer et al. (2014) propuseram um modelo experimental aonde proveram macacos *rhesus* de uma dieta enriquecida com 75% de frutose em conjunto com a suplementação com o óleo de peixe (16% de EPA e 11% de DHA) por 6 meses. O estudo teve por objetivo verificar a ação do óleo de peixe no organismo, a fim de constatar uma possível atenuação ou prevenção dos efeitos negativos causados pela ingestão de frutose tais como RI, dislipidemia e disglícemia. Neste estudo, foi demonstrado que a suplementação diária com óleo de peixe impede a hipertriacilgliceridemia e a RI induzida por frutose nos macacos. Já em mulheres, Sarbolouki, et al. (2013) e Juaréz, et al. (2013) acompanharam pacientes com sobrepeso e DM2 suplementadas com 2 g de EPA/dia por 3 meses e crianças obesas com RI e suplementadas com 1,8 g de AGPIs/dia por 12 semanas, respectivamente, e demonstraram que a suplementação com EPA pode apresentar efeitos benéficos sobre o índice glicêmico, aumentando a sensibilidade à insulina.

1.3.2 Mecanismos de ação dos ácidos graxos polinsaturados n-3

Os ácidos graxos polinsaturados n-3, EPA e DHA vêm sendo bastante utilizados na clínica por sua ação no metabolismo lipídico reduzindo as concentrações de triacilglicerol plasmático, contribuindo assim para redução dos riscos cardiovasculares (BALK et al, 2006; HOOPER et al, 2008). Os efeitos de EPA e DHA sobre o metabolismo

lipídico incluem alterações no padrão de expressão dos genes responsivos aos receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs), os quais pertencem à superfamília de receptores de hormônios esteróides que atuam como fatores de transcrição ativados por ligantes. Estes receptores apresentam-se em três isoformas distintas (alfa, beta e gama), as quais se expressam em tecidos específicos modulando a transcrição de diferentes genes (SAMPATH; NTAMBI, 2004; SHOONJNANS; STAELS; AUWERX, 1996).

O fígado, principal órgão do metabolismo energético, é determinante na homeostase lipídica do organismo, pois modula os processos de lipogênese e oxidação de ácidos graxos (PYPER et al, 2010). Dentre os principais efeitos hipolipidêmicos de ácidos graxos poli-insaturados na ativação de PPAR alfa estão: a redução da síntese de VLDL, aumento de hidrólise de lipoproteínas ricas em triacilglicerol e o estímulo à β -oxidação (FERNANDEZ; WEST, 2005). Os genes alvo do PPAR alfa são regulados pelo aumento na produção das apolipoproteínas AI e AII (componentes da fração de HDL), aumento da atividade da lipase lipoprotéica (enzima responsável pela hidrólise de lipoproteínas ricas em triacilglicerol) e a redução da produção da apolipoproteína CIII (importante inibidor da lipase lipoprotéica) (PYPER et al, 2010).

Os PPAR gama expressos no tecido adiposo estão relacionados com a regulação de inúmeros processos fisiológicos, incluindo o metabolismo lipídico, a homeostase glicêmica, processos inflamatórios e a adipogênese (KOUTNIKOVA et al, 2003). Nos adipócitos o PPAR gama regula a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico, incluindo a P2, acil-CoA sintetase e lipase lipoprotéica. Também é responsável pelo controle da expressão da proteína transportadora de ácidos graxos 1 (FATP-1) e CD36, as quais estão envolvidas na captação de lipídeos pelos adipócitos (SFEIR, et al. 1997). Um estudo com ratos demonstrou que a suplementação com óleo de peixe (7% w/v) por 120 dias reverte parcialmente alterações metabólicas e morfológicas do tecido adiposo, reduzindo adiposidade visceral e hipertrofia de adipócitos, e estas alterações ocorreram via ativação do PPAR gama (SORIA et al, 2002). No mesmo sentido, um estudo realizado com ratos Wistar, os quais receberam dieta hiperlipídica (25% w/v) e posteriormente foram suplementados com óleo de peixe (10% w/v), demonstrou que o óleo de peixe apresenta efeito aditivo sobre a redução nos níveis de colesterol no plasma, bem como conduziu a uma diminuição no acúmulo de gordura hepática e diminui estresse oxidativo celular, estes por ativação do PPAR gama (VIGERUSTA, et al. 2012).

Portanto, os ácidos graxos livres atuam como moléculas sinalizadoras e ligantes para PPAR alfa e PPAR gama os receptores ativados por proliferadores peroxissomos, ou precursores para a biossíntese de mediadores lipídicos, os quais são responsáveis pela regulação de muitas respostas celulares (CALDER, 2012).

1.4 JUSTIFICATIVA

Os avanços tecnológicos ocorridos nos países ocidentais nos últimos anos resultaram em um estilo de vida sedentário associado ao aumento no consumo energético, e em decorrência destas mudanças vem havendo aumento significativo na incidência de SM na população (MISRA; KHURANA, 2008). Dentre estas mudanças nutricionais destaca-se o aumento substancial no consumo da ingestão de frutose (RUTLEDGE; ADELI, 2007). Considerando os riscos cardiometabólicos decorrentes do sobrepeso associado com ingestão de alimentos de alta densidade energética e altas concentrações de frutose à longo prazo, é importante que se avalie não apenas os mecanismos responsáveis por tais modificações metabólicas, mas também propor rotinas que possam atenuar ou minimizar os efeitos colaterais desta condição.

Perante estas afirmativas, o presente trabalho buscou ampliar as investigações acerca das alterações metabólicas causadas pela ingestão crônica de frutose (ex., sensibilidade periférica a insulina e tolerância à glicose, conteúdo de gordura hepática, etc), bem como demonstrar se esses efeitos nocivos podem ser atenuados ou revertidos com a suplementação com o óleo de peixe. A idade dos animais para início do tratamento foi determinada a partir do pressuposto de que atualmente, por influência da industrialização, os hábitos alimentares nocivos tem sido introduzidos na dieta precocemente. As doses de frutose utilizadas no projeto foram determinadas a partir de estudos que demonstraram alterações metabólicas relevantes com esse mesmo modelo animal. Primeiramente iniciamos com uma quantidade de 10% de frutose, sendo uma concentração bem descrita na literatura a qual, em sua maioria, apresentou alterações metabólicas significativas em diversos trabalhos. Posteriormente repetimos os experimentos com uma concentração de frutose a 30%, dose pouco descrita em outros estudos, e a partir dos resultados obtidos foram feitas comparações entre os grupos.

Este projeto buscou comparar as possíveis alterações metabólicas da ingestão de diferentes doses de água com frutose e como estas poderiam ser atenuadas à partir da suplementação com óleo de peixe. Também, nos propusemos avaliar o processo de reversibilidade do

modelo demonstrando que alterações promovidas por tratamentos hipercalóricos podem ser revertidas se houver interrupção do mesmo oferecendo dieta normocalórica, considerando que na literatura não encontramos estudos que evidenciam o fato da reversibilidade neste contexto. Portanto, não há uma quantidade significativa de trabalhos avaliando se ocorre reversão de desordens cardiometabólicas causadas pela introdução de dietas (*ex.*, dieta hiperlipídica, frutose, etc.). Diante disso, acompanhamos os animais pelo período de 60 dias após a interrupção da oferta de frutose com o intuito de se verificar a possível reversibilidade das disfunções metabólicas causadas por este paradigma. Assim, visando à conscientização da população já acometida pela cultura alimentar ocidental, indivíduos possam reconsiderar o fato de que, modificando seus hábitos alimentares podem diminuir os fatores de risco de desenvolver estas alterações cardiometabólicas

Alguns estudos corroboram a hipótese de que alterações metabólicas nocivas causadas pela alta ingestão de açúcares podem ser atenuadas através da suplementação com óleo de peixe. Portanto, a hipótese estabelecida para esta dissertação é baseada em estudos prévios, os quais demonstraram alterações cardiometabólicas em modelos animais e as mesmas foram revertidas através do tratamento com óleo de peixe. Além disso, nos propusemos a demonstrar que estas alterações cardiometabólicas podem ser revertidas a partir do momento em que o insulto for retirado.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar em ratos as repercussões da ingestão crônica de diferentes concentrações de frutose (10% e 30%) sobre parâmetros envolvidos na homeostase da glicose e do triacilglicerol bem como o impacto da suplementação com óleo de peixe sobre estes parâmetros. Ainda, avaliar a capacidade de manutenção ou recuperação das eventuais alterações metabólicas 60 dias após a interrupção do tratamento com a frutose.

2.2 ESPECÍFICOS

Avaliação de parâmetros metabólicos:

- a) acompanhamento do ganho de peso e do perfil de ingestão hídrica ao longo dos tratamentos
- b) quantificação de ingestão calórica ao longo do tratamento
- c) mensuração dos valores de glicemia, triacilgliceridemia, insulinemia e ácido úrico basal de jejum
- d) avaliação da tolerância à glicose e à insulina
- e) determinação da responsividade lipolítica do tecido adiposo ao estímulo beta-adrenérgico
- f) avaliação da adiposidade ao final do período experimental.

Parâmetros morfométricos/estruturais

- g) determinação da massa absoluta e relativa dos órgãos metabólicos (gordura retroperitoneal, epididimária e omental, fígado e pâncreas).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 100 ratos machos da linhagem Wistar com 21 dias de idade, divididos em dois lotes contendo 50 animais cada, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas contendo 5 animais, em ambiente com temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo de iluminação claro-escuro de 12 horas (luz acessa das 06:00 as 18:00), alimentados com ração comercial padrão (Nuvilab[®], Nuvital). As metodologias empregadas *in vivo* neste projeto foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC com protocolo de nº PP00782.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Sete dias após o desmame, no trigésimo dia de vida, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

1) Grupo controle (C) – os animais seguiram recebendo água potável (filtrada) *ad libitum* por 63-70 dias consecutivos. Os animais receberam óleo mineral (1 g/kg, peso corpóreo) entre o 60º e 100º dia de vida, o qual não causou alterações no padrão de defecação dos animais (BARBOSA, et al. 2016).

2) Grupo frutose (F) – os animais receberam água potável (filtrada) contendo 10% de frutose no 1º lote e 30% de frutose no 2º lote (w/v) (Synth, Diadema, SP, Brasil; 0,4Kcal/mL) *ad libitum*, por 60 dias consecutivos (a partir do 30º dia de vida). A escolha da concentração de 10% de frutose foi baseada na densidade calórica dos refrigerantes populares (~ 0,4 Kcal/mL) e descrito previamente (ALZAMENDI, et al. 2009; SHELUDIAKOVA; BOAKES, 2012), logo a concentração de 30% apresenta, aproximadamente, 1,2 Kcal/mL. Na sequência, optamos por utilizar a concentração de 30% de frutose já descrita na literatura (MAREK, et al. 2015), a julgar pelo elevado metabolismo energético entre os ratos em relação aos humanos (FAGUNDES; TAHA, 2004). A introdução da frutose foi realizada de forma escalonada para minimizar a sobrecarga hepática aguda (ALZAMENDI, et al. 2009). Iniciou com 2% (1º e 2º dias) e seguiram com 4% (3º e 4º dias), 6% (5º, 6º e 7º dias), 8% (8º, 9º e 10º dias) e a partir daí seguiram com 10% de solução de frutose (1º lote). O escalonamento no lote tratado com 30% de frutose, deu-se da

seguinte forma: 5% (1º, 2º e 3º dias) e seguiram com 10% (4º, 5º e 6º dias), 20% (6º, 7º e 8º dias) e a partir daí seguiram com 30% de solução de frutose. O período total de ingestão com 10% ou 30% (a partir do início do escalonamento) foi de 63-70 dias (do 30º ao 93º-100º dia de vida). Trinta dias após o início do escalonamento do tratamento com frutose os animais passaram a receber óleo mineral via gavagem intragástrica (1 g/kg, peso corpóreo) até o dia que precedeu a eutanásia.

3) Grupo frutose + óleo de peixe (FO) – os animais receberam o mesmo tratamento com frutose como descrito no grupo F. A suplementação com o óleo de peixe (1 g/kg, peso corpóreo) (YAMAZAKI, et al. 2011) foi introduzida por via intragástrica (gavagem), a partir do 60º dia de vida e se seguiu até o último dia anterior a eutanásia. A suplementação ocorreu uma vez ao dia, entre 08:00 e 09:00, ao longo dos 6 dias da semana (segunda a sábado), com interrupção da suplementação aos domingos para minimização do estresse de contenção e da realização da gavagem.

4) Grupo óleo de peixe (OP) – os animais receberam água potável normalmente como no grupo C ao longo de todo período experimental. Foram suplementados com o óleo de peixe nos mesmos moldes do grupo FO.

5) Grupo frutose + reversibilidade (FR) – após os 67-70 dias de tratamento com solução de frutose (10% e 30%), um grupo de animais FR foi mantido com água potável (sem frutose) e ração padrão por outros 60 dias consecutivos, para avaliar se houve recuperação de eventuais parâmetros alterados em decorrência da ingestão de frutose.

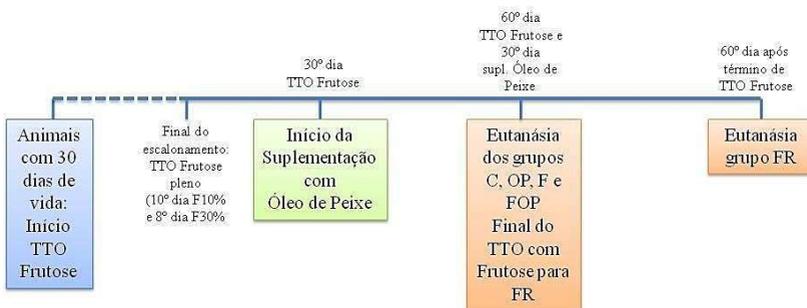


Figura 2 - Período correspondente ao tratamento

Para avaliar a composição de ácidos graxos encontrados no óleo de peixe Phytomare (utilizado na pesquisa), foi realizada a técnica de análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Na tabela

abaixo estão representados os valores de principais ácidos graxos encontrados.

Tabela 3 - Percentual dos principais ácidos graxos presentes no óleo de peixe utilizado.

Ácidos graxos	%
EPA	25,06
DHA	14,58
Alfa-linolênico	0,16
Mirístico	9,71
Palmitico	18,95
Estearico	5,76
Araquidônico	0,12
Linoleico	2,99
Palmitoleato	12,94
Oleico	9,73

3.3 PARÂMETROS METABÓLICOS

3.3.1 Peso corpóreo

Foi realizada a determinação do peso corpóreo semanalmente a partir do 30º dia de vida até o momento da eutanásia em balança eletrônica digital (TECNAL, Campinas, SP, Brasil).

3.3.2 Ingestão hídrica e alimentar

A ingestão alimentar foi verificada uma vez por semana, a partir do 30º dia, até o momento da eutanásia. Foi realizada pela pesagem da ração remanescente (não ingerida) descontada do total daquela depositada no dia anterior. A diferença representa a quantidade ingerida por gaiola diariamente. A quantidade média de ração ingerida por animal foi obtida através da divisão da massa total de ração ingerida por gaiola pelo número de animais por caixa (5 ratos por caixa). Os resultados foram expressos em gramas de ração ingeridos por quilo de peso corpóreo para a normalização deste parâmetro.

3.3.3 Ingestão calórica

A ingestão calórica foi determinada a partir da quantidade de ração ingerida somada à quantidade de frutose ingerida na água de beber (para

os grupos que receberam frutose à partir do 30º dia de vida) e a quantidade de Kcal atribuída ao óleo de peixe (para os grupos que receberam óleo de peixe à partir do 60º dia de vida). O cálculo da quantidade de Kcal foi obtido por somatório por grama de ração, frutose e óleo de peixe ingerida.

3.3.4 Glicose sanguínea, triacilglicerol plasmático, insulinemia e ácido úrico

A glicemia e a triacilgliceridemia foram quantificadas a cada dez dias, com em animais em jejum de 12 h aproximadamente, e imediatamente antes da eutanásia, e insulinemia e ácido úrico foram quantificados somente no dia da eutanásia (em jejum de 12 h. A glicemia foi determinada através do sistema de fitas (monitor digital) “Accu-Check Performa” (ROCHE, Brasil) enquanto as concentrações plasmáticas de triacilglicerol e ácido úrico foram determinadas por meio do uso de kits comerciais (Biotécnica, Varginha, Brasil). Para a obtenção de sangue, a cauda dos animais foi aquecida em água morna (por aproximadamente 10-15 segundos) para vasodilatação e em seguida foram secadas com papel. Na sequência a ponta da cauda (1-2 mm) foi seccionada com tesoura cirúrgica e duas gotas de sangue obtidas (a primeira gota foi descartada enquanto que a segunda utilizada para a determinação da glicose sanguínea). Outros 80 µl de sangue foram coletados em tubo de 0,5 mL e imediatamente centrifugados (600 × g por 10 min) para obtenção do plasma e posterior quantificação da concentração de triacilglicerol e ácido úrico. Nos animais do grupo FR, a glicemia e triacilgliceridemia foram verificadas a cada quinze dias após o 60º dia de tratamento (após interrupção da oferta de frutose).

3.3.5 Teste de tolerância à glicose oral (oGTT)

Foi realizado no 76º dia de vida (2 semanas precedentes a eutanásia), com início às 8:00 horas, em animais jejuados (14 h) e acordados. Os animais tiveram a extremidade da cauda seccionada como descrito anteriormente para a coleta de 2 gotas de sangue. A primeira gota foi descartada e a segunda utilizada para determinação da glicemia no tempo 0. Imediatamente, foi administrada solução de glicose 50% (2 g/kg de peso corpóreo, *o.g.*) e coletadas amostras de sangue da cauda dos ratos aos 30, 60 e 120 min para determinação das concentrações de glicose sanguínea como descrito anteriormente (RAFACHO, et al. 2007; 2009).

3.3.6 Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT)

Foi realizado no 83º dia de vida (uma semana precedente a eutanásia), aproximadamente às 8:00 horas, em animais alimentados. A determinação da glicemia no tempo 0 foi realizada como descrito anteriormente (oGTT). Em seguida, os animais receberam injeção intraperitoneal de insulina humana recombinante (Biohulin®) equivalente a 2 unidades/kg de peso corpóreo. Amostras de sangue foram coletadas para dosagem dos níveis de glicose sanguínea nos tempos 10, 20 e 40 min. A constante de decaimento de glicose (K) foi calculada entre os minutos 0 a 20, a partir do seguinte cálculo: glicemia no minuto 20 dividido por glicemia no minuto 0 menos 1 multiplicado por -100 dividido pelo intervalo de minutos (20). Temos como resultado a Unidade parcial de unidade por minuto.

3.3.7 Lipólise do tecido adiposo

No dia da eutanásia, realizada por exposição ao CO₂ seguida de decaptação em guilhotina, fragmentos da gordura epididimária de cada grupo experimental foram coletados para determinação da lipólise estimulada por isoproterenol (Sigma). Para tal, fragmentos do tecido adiposo (100 mg) foram incubados em solução de Krebs (pH 7.4) contendo 5% CO₂, 95% O₂ e 1% de albumina sérica bovina pelo período de 60 min a 37°C na presença ou ausência de 20 µmol/l isoproterenol sob agitação constante. Ao final da incubação, amostras do meio foram coletadas e mantidas em gelo. A determinação do glicerol foi realizada pelo ensaio colorimétrico enzimático como para o triacilglicerol plasmático.

3.3.8 Gordura Hepática

Para a quantificação da gordura hepática, aproximadamente 100 mg de fígado foi coletado no dia da eutanásia e homogeneizado (UltraTurrax, IKA®), posteriormente adicionado solução metanol/clorofórmio (2:1, v/v), e centrifugado. Após formou-se três fases, sendo a fase inferior (metanólica) retirada e submetida a secagem em banho Maria. Logo o *pellet* foi resuspenso em Triton X 100/Metanol (2:1) e agitado, para posterior determinação do conteúdo de triacilglicerol hepático por método enzimático colorimétrico (TRINH, et al. 1998).

3.4 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS/ESTRUTURAIS

3.4.1 Massa absoluta e relativa de órgãos metabólicos

Os órgãos de interesse (gordura epididimária, gordura retroperitoneal, gordura omental, fígado e pâncreas) foram cuidadosamente removidos e pesados em balança eletrônica analítica digital no dia da eutanásia.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

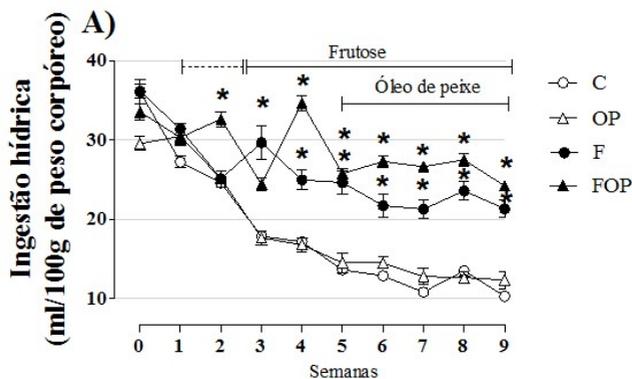
Os dados foram organizados e registrados em banco de dados no programa Microsoft Office Excel 2007[®]. A análise estatística dos dados foi realizada no programa estatístico Graphpadprism v.5.01 (Graphpad Inc.; La Jolla, USA). As variáveis dependentes descritivas foram apresentadas como média e erro padrão da média (E.P.M). O teste “*t*” de Student ou ANOVA de uma via (one-way ANOVA) e ANOVA para medidas repetidas, seguido de post test Tukey, foram aplicados para dados não emparelhados quando os valores passaram pelo teste de normalidade e de homocedasticidade. Em casos de heterocedasticidade, teste “*t*” de Student não emparelhado com correção de Welch ou Mann-Whitney, ou Kruskal-Wallis seguido de post test Dunn foi aplicado para avaliação de dados não paramétricos e nesses casos foram apresentados como mediana e intervalo interquartil. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

4.1.1 Ingestão hídrica nos grupos que receberam água contendo frutose

Os animais tratados com 10% de frutose na água de beber apresentaram aumento na ingestão hídrica em relação aos seus controles a partir da primeira semana de tratamento com frutose (Fig. 3A). No entanto, os animais tratados com frutose 30% mantiveram o padrão de ingestão hídrica igual ao de seus respectivos controles (Fig. 3B). Já ao final do tratamento, observou-se uma ingestão hídrica maior nos grupos que receberam frutose em relação aos seus respectivos grupos controle (Fig. 3 A, B). A suplementação com óleo de peixe não promoveu alterações nesta variável.



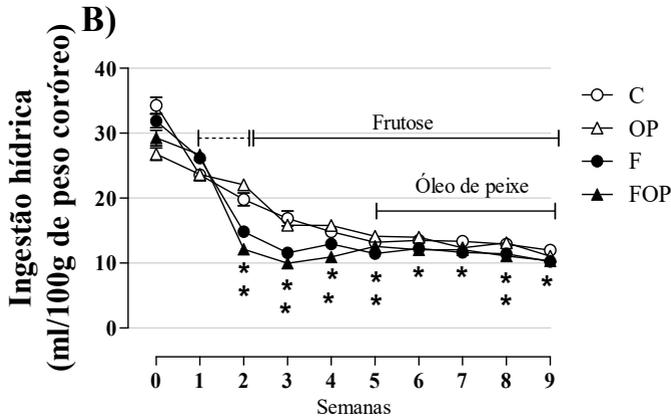
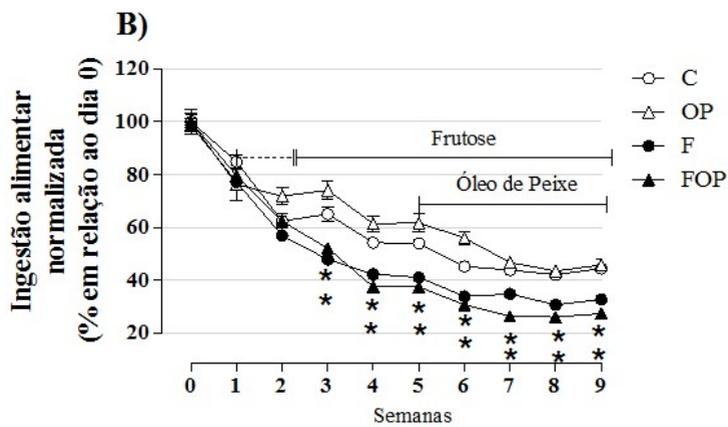
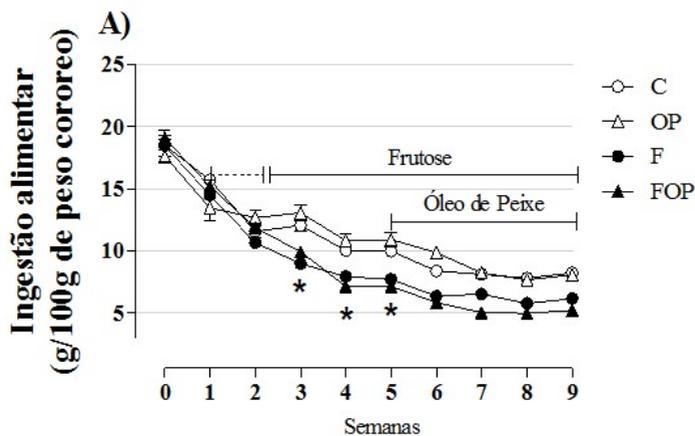


Figura 3 - Ingestão hídrica nos grupos que receberam água frutada.

(A) Os animais que receberam frutose 10%, após escalonamento de concentração à 10% no 10º dia de tratamento, ingeriram maior volume de água frutada em comparação aos controles. (B) Os animais que receberam frutose 30% após escalonamento, atingindo a concentração total no 8º dia de tratamento, ingeriram menor volume de água frutada em comparação aos controles. Dados são média \pm EPM. (*) indica diferença significativa da F em relação ao C e FOP em relação ao OP, por efeito da frutose. Teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey, $p < 0,05$, $n = 10$.

4.1.2 O consumo de ração é reduzido em animais tratados com frutose

A ingestão alimentar dos grupos tratados com frutose foi menor ao longo do tratamento em relação aos seus respectivos grupos controle. No início do tratamento com frutose 10% o consumo de ração não foi diferente entre os grupos (Fig. 4A, B). Ao final do tratamento a ingestão alimentar dos grupos tratados com frutose a 10% foi maior, e os grupos que receberam óleo de peixe não demonstraram modificações sobre este parâmetro. Os animais que receberam água com frutose na concentração de 30% não apresentaram diferenças entre os grupos em relação ao consumo alimentar, também sem efeito do óleo de peixe (Fig. 4C).



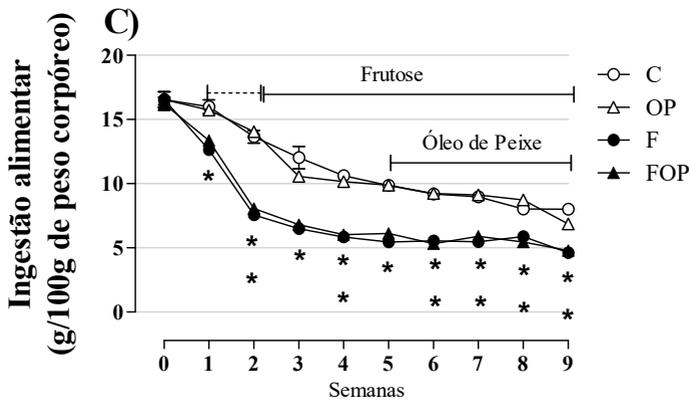


Figura 4 - *Administração crônica de frutose diminui a ingestão alimentar.* (A,B) Administração crônica de frutose 10% (após escalonamento de concentração à 10% no 10º dia de tratamento) e (C) 30% (após escalonamento de concentração à 30% no 8º dia de tratamento) diminui ingestão alimentar. Os animais que receberam frutose ingeriram menor quantidade de ração em comparação aos controles. Dados são apresentados como média \pm EPM. (*) indica diferença significativa da F em relação ao C e FOP em relação ao OP por efeito da frutose. Teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey, $p < 0,05$, $n=10$.

4.1.3 O peso corpóreo não altera após consumo de frutose enquanto há discreto aumento no consumo calórico, e suplementação com óleo de peixe não apresenta efeitos sobre estas variáveis

O peso inicial dos animais tratados com frutose não foi similar entre os grupos. Ao longo do tratamento não se observou nenhuma diferença significativa do peso corpóreo nos animais tratados com frutose 10% ou 30% em relação aos seus respectivos grupos controles (Fig. 5A, B).

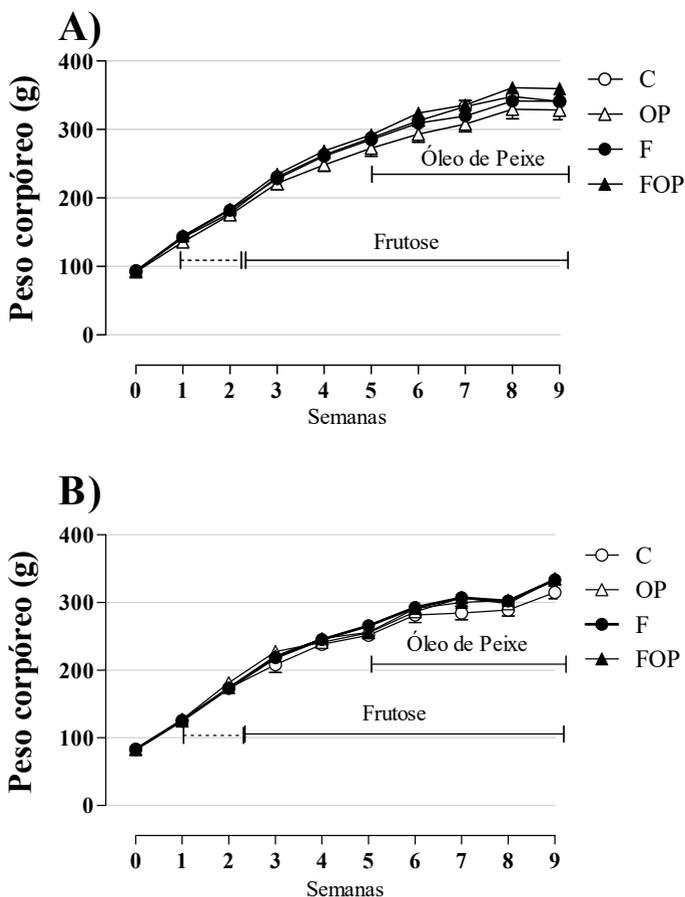


Figura 5- *Tratamento com frutose não altera o peso corpóreo.*

(A) Administração crônica de frutose 10% (após escalonamento de concentração à 10% no 10º dia de tratamento) e (B) 30% (após escalonamento de concentração à 30% no 8º dia de tratamento) não altera o peso corpóreo. Teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey, $p < 0,05$, $n = 10$.

O consumo calórico dos animais que receberam frutose 10% ou 30% não foi diferente quando comparados com seus respectivos grupos controles. No entanto, ao final do tratamento apenas os animais que receberam frutose 30% tiveram aumento da ingestão calórica quando comparados com seus respectivos controles (Fig. 6A,B)

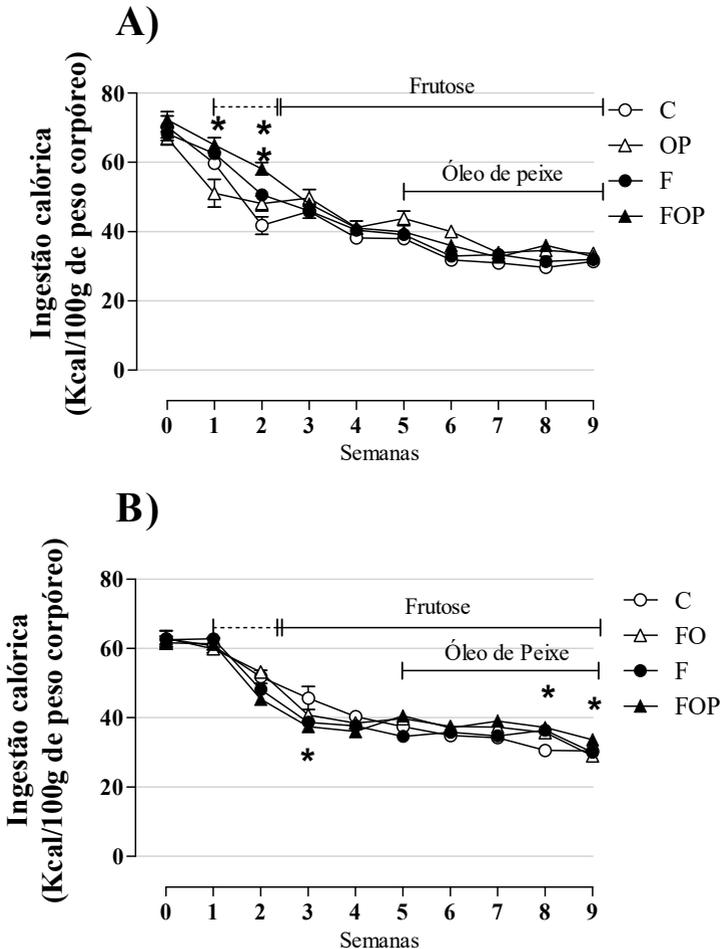


Figura 6- *Tratamento com frutose altera ingestão calórica.*

O consumo calórico dos animais que receberam frutose 10% apresentou diferenças no início do tratamento (representadas no gráfico A como 1 e 2, respectivamente), e ratos que receberam a concentração de frutose 30% demonstraram diferenças significativas no início e ao final do tratamento (representadas no gráfico B como 3, 8 e 9, respectivamente). 10% (após escalonamento de concentração à 10% no 10º dia de tratamento) e 30% (após escalonamento de concentração à 30% no 8º dia de tratamento) (*) indica diferença significativa da F em relação ao C e FOP em relação ao OP por efeito da frutose. Teste one-way ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey, $p < 0,05$, $n = 10$.

4.1.4 A triacilgliceridemia aumenta durante o tratamento com frutose, mas não a glicemia, sem efeito do óleo de peixe

Durante o tratamento com frutose 10% ou 30%, as concentrações de glicose sanguínea de jejum foram similares quando comparado com os seus respectivos grupos controles (Fig. 7A, B).

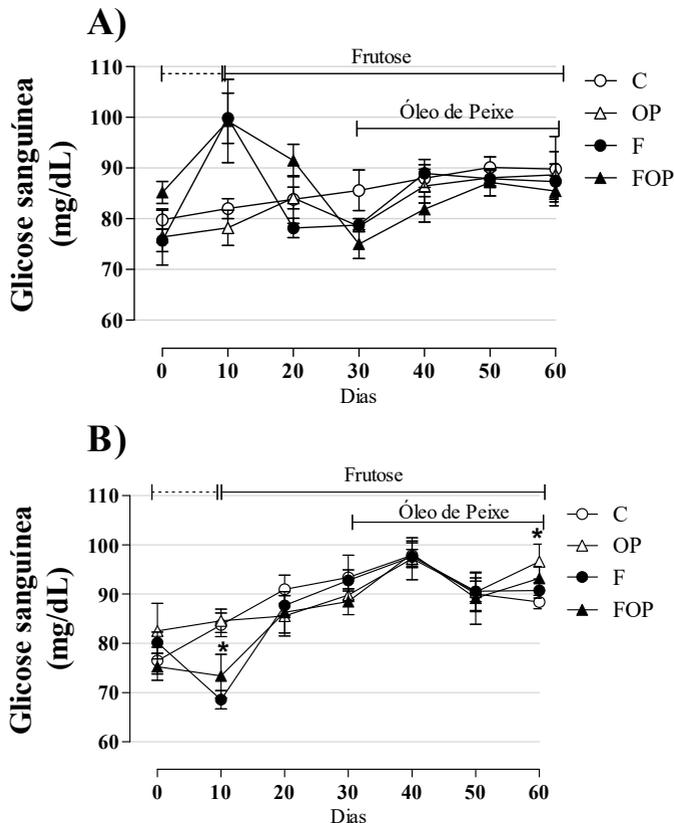


Figura 7- Tratamento com frutose não altera glicose sanguínea.

(A) Os ratos F e FOP não apresentaram alterações na glicemia ao longo do tratamento (grupo frutose 10%). (B) grupo frutose 30%). 10% (após escalonamento de concentração à 10% no 10º dia de tratamento) e 30% (após escalonamento de concentração à 30% no 8º dia de tratamento). (*) indica diferença significativa da F em relação ao C e FOP em relação ao OP por efeito da frutose. Teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey, $p < 0,05$, $n = 10$.

Ao longo do tratamento observou-se um aumento significativo nas concentrações de triacilglicerol no 30º, 40º e 50º dias (Fig. 8A, $p < 0,05$, $n=10$) nos grupos que receberam frutose 10%. Quando observado a área abaixo da curva para triacilgliceridemia ao longo do tratamento os animais tratados com frutose apresentaram aumento significativo em relação aos seus controles, e a suplementação com óleo de peixe não foi eficaz em normalizar estes parâmetros (Fig. 8B, $p < 0,05$, $n=10$).

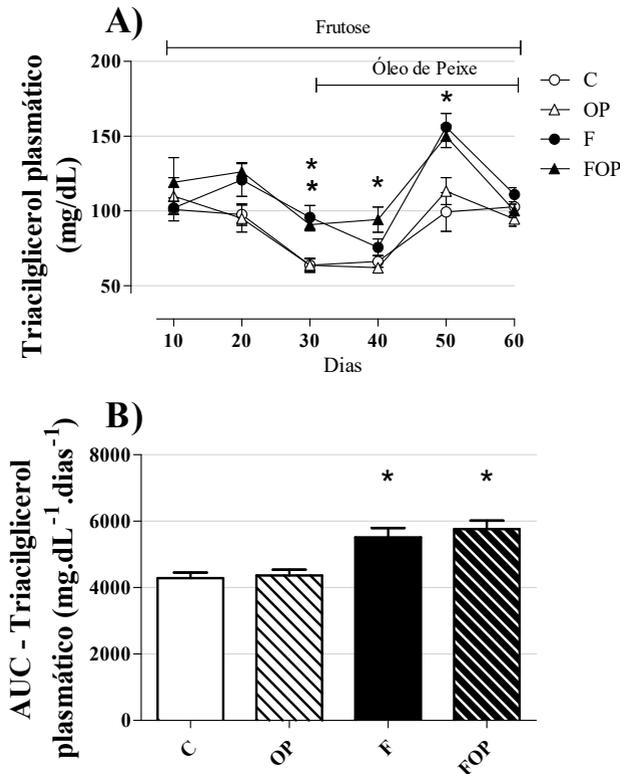


Figura 8 - Administração crônica de frutose 10% induziu triacilgliceridemia transitória.

(A) Observe diferença significativa para os grupos F e FOP com seus respectivos controles nos dias 30, 40 e 50 de tratamento, normalizando ao final. (B) Na área abaixo da curva houve diferença entre os grupos que receberam frutose em relação aos seus controles. 10% (após escalonamento de concentração à 10% no 10º dia de tratamento). (*) indica diferença significativa da F e FOP em relação ao C e OP por efeito da frutose. Teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey, $p < 0,05$, $n=10$.

Ao longo do tratamento com frutose 30% os animais apresentaram aumento significativo nas concentrações plasmáticas de TG o qual podemos visualizar na Figura 9A e Tabela 4. Outro resultado que sustenta esta afirmativa é ao cálculo da área abaixo da curva para triacilgliceridemia (Fig. 9B), que resultou em diferenças significativas entre os grupos que receberam água com frutose, comparados aos seus controles. Como se nota, o óleo de peixe não teve nenhum efeito atenuador marcante sobre este parâmetro.

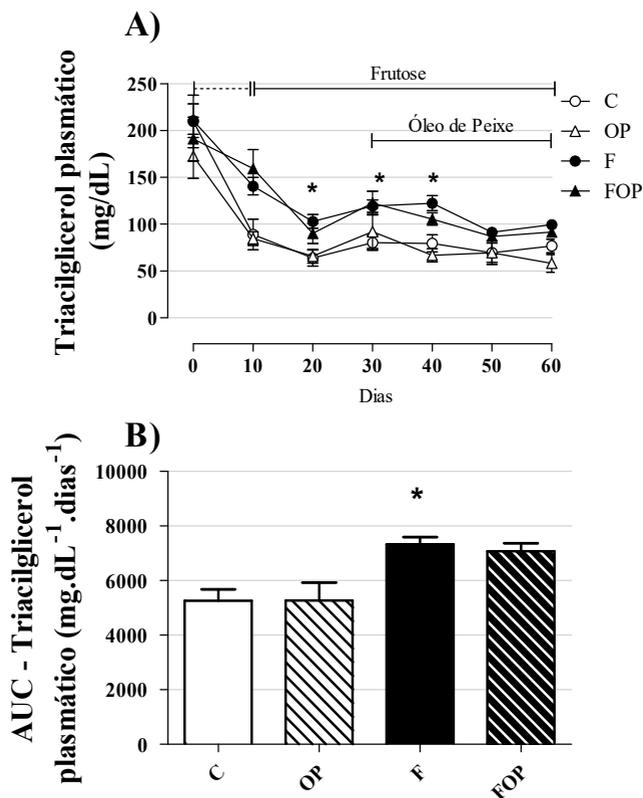


Figura 9- Administração crônica de frutose 30% induziu ao aumento transitório de triacilgliceridemia.

(A,B) Note a diferença significativa do grupo F com seu respectivo controle no decorrer do tratamento com frutose. 30% (após escalonamento de concentração à 30% no 8º dia de tratamento) (*) indica diferença significativa da F em relação ao C e FOP e OP por efeito da frutose. Teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey, $p < 0,05$, $n = 10$.

Tabela 4- Concentrações plasmáticas de triacilglicerol (mg/dL) de ratos tratados com Frutose 30% com ou sem suplementação com óleo de peixe.

	C	OP	F	FOP
TG dia '0'	209,8 ± 27,9	172,5 ± 23,4	210,6 ± 18,0	173,4 ± 16,9
TG dia '10'	89,0 ± 16,4	84,6 ± 7,1	140,7 ± 9,3	159,5 ± 20,1
TG dia '20'	63,6 ± 8,5	65,8 ± 7,2	103,0 ± 7,2*	90,1 ± 10,7
TG dia '30'	80,1 ± 8,0	92,0 ± 18,1	119,3 ± 6,7*	122,6 ± 12,7
TG dia '40'	79,5 ± 9,3	66,7 ± 6,8	122,4 ± 8,0*	105,5 ± 6,5
TG dia '50'	69,5 ± 10,1	69,6 ± 12,6	91,2 ± 4,6	86,8 ± 5,3
TG dia '60'	76,6 ± 7,2	58,1 ± 9,5	99,4 ± 5,1	91,6 ± 4,4

Valores apresentados em média ± EPM. (*) indica diferença significativa da F em relação ao C e FOP e OP por efeito da frutose. Teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey, $p < 0,05$, $n = 10$. TG: triacilglicerol.

4.1.5 O tratamento com frutose não promove hiperuricemia nem alteração do conteúdo de gordura hepática

É sabido que o consumo crônico de frutose pode induzir a produção e ácido úrico, provocando a hiperuricemia. No entanto, na Tabela 5 a seguir, podemos observar que o tratamento com frutose não promoveu alterações nas concentrações de ácido úrico entre os grupos. Também, na quantificação do conteúdo de gordura (triacilglicerol e colesterol) hepático, os grupos que receberam frutose não apresentaram diferenças significativas em comparação aos seus respectivos controles, tampouco em relação aos grupos que receberam suplementação com óleo de peixe.

Tabela 5- Concentrações plasmáticas de ácido úrico e conteúdo de gordura hepática em ratos tratados com Frutose 10% ou 30% e suplementados com óleo de peixe.

		C	OP	F	FOP
Ácido Úrico (mg/dL)	Frutose 10%	2,0 ± 0,2	1,9 ± 0,2	2,3 ± 0,4	2,3 ± 0,4
	Frutose 30%	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,4	1,3 ± 0,2	2,5 ± 0,5
Triacilglicerol Hepático (mg/100 mg)	Frutose 10%	2,3 ± 0,7	3,0 ± 0,4	2,5 ± 0,2	3,1 ± 0,3
	Frutose 30%	4,2 ± 0,3	3,4 ± 0,5	3,7 ± 0,2	3,1 ± 0,3
Colesterol Hepático (mg/100 mg)	Frutose 10%	3,5 ± 0,1	4,0 ± 0,2	3,3 ± 0,1	3,8 ± 0,2
	Frutose 30%	1,5 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,4 ± 0,1

Valores apresentados em média ± EPM. Teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey, $p < 0,05$, $n = 10$. TG: triacilglicerol, COL: colesterol total.

4.1.6 Tolerância à glicose e sensibilidade periférica à insulina

Com a finalidade de identificar se a frutose altera a tolerância à glicose e sensibilidade periférica à insulina, foram realizados testes de tolerância à glicose e à insulina. Como podemos observar na Figura 10, ao final do tratamento com frutose 10% ou 30% o teste de tolerância à glicose não revelou alterações significativas após a sobrecarga de glicose nos grupos F e FOP em relação aos grupos C e OP ($n = 10$). Os valores da área sob a curva (ASC) da glicose foram similares entre os grupos (Figura 10 C e D, $n = 10$). Os resultados não apresentaram alterações nos grupos suplementados com óleo de peixe.

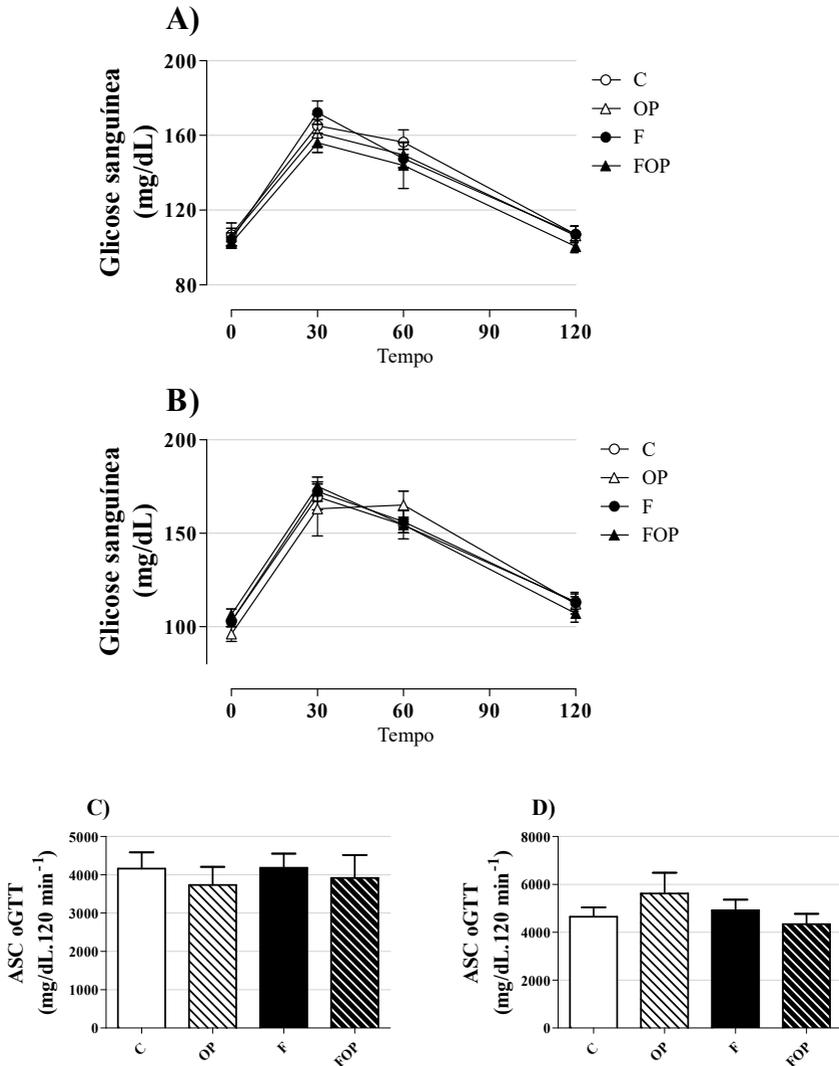
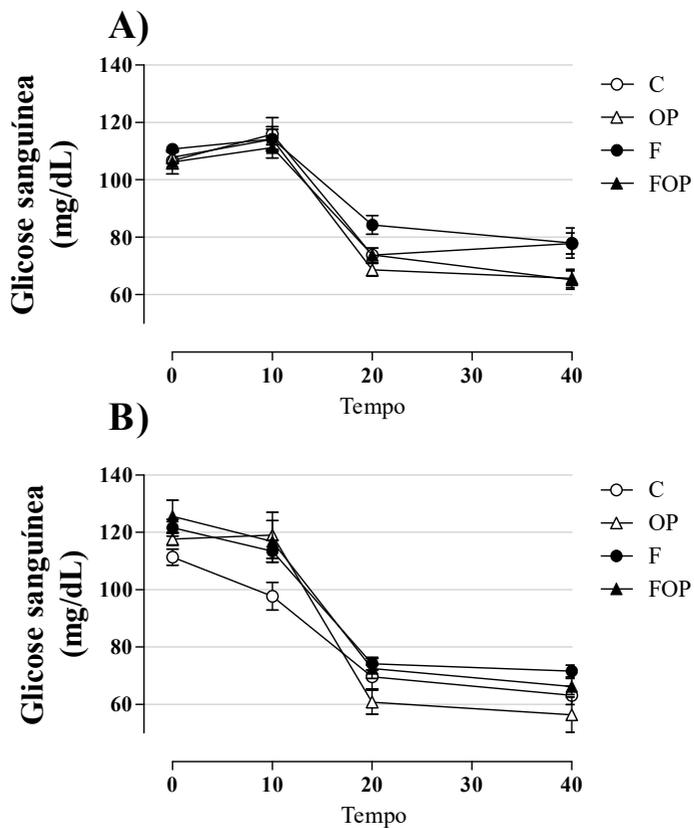


Figura 10 - Tratamento com frutose 10% e 30% não induz alterações na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina em ratos.

Os valores obtidos confirmam que não houve diferenças significantes de intolerância à glicose em 10% (A, C) e 30% (B, D). Teste ANOVA uma via seguido de post test de Tukey, $p < 0,05$, $n = 10$.

O teste de tolerância à insulina (Figura 11 A,B) não revelou alterações na sensibilidade à insulina a julgar pelo decaimento da glicose

(entre os minutos 0 e 20 expressos nas Fig. 11 C,D), bem como não houve efeito da suplementação com óleo de peixe sobre estes parâmetros. Os valores de K_{ITT} no grupo tratado com frutose 10% estão representados na Figura 11 C (n=10) e para o tratamento com frutose 30% na Figura 11 D (n=10).



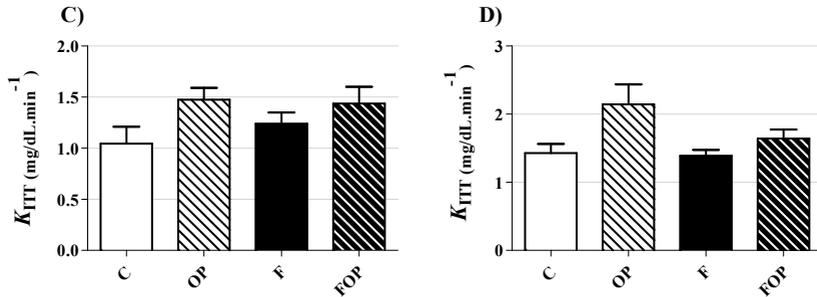


Figura 11 - *Tratamento com frutose 10% (A) e 30% (B) não induz alterações na sensibilidade à insulina em ratos.*

Os valores obtidos em frutose 10% (C) e 30% (D) confirmam ausência de alterações significantes na constante de decaimento glicose sanguínea durante ITT, nos grupos F e FOP comparados aos grupos C e OP. Teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey, $p < 0,05$, $n = 10$.

4.1.9 Insulinemia

Os valores de insulinemia, obtidos no dia da eutanásia, foram maiores em ambos os grupos tratados com frutose (10% e 30%) (Fig. 12A, B). A suplementação com óleo de peixe não promoveu nenhuma atenuação sobre tal parâmetro.

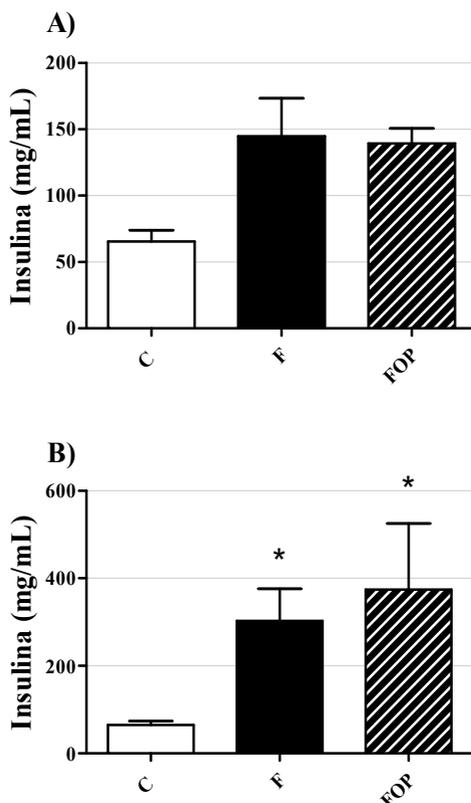


Figura 12 - *Insulinemia após tratamento com frutose.*

(A) Tratamento com frutose 10% não induziu hiperinsulinemia. (B) Concentração de frutose de 30% causou aumento da insulinemia nos grupos F e FOP. Asterisco (*) indica diferença significativa em F e FOP em relação ao C por efeito da frutose. Teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey, $p < 0,05$, $n = 10$.

4.1.7 O consumo de frutose não altera a atividade lipolítica de tecido adiposo e a suplementação com óleo de peixe também não exerce nenhum efeito

É sabido que a RI pode resultar em aumento da lipólise no tecido adiposo, favorecendo o aumento do triacilglicerol na circulação. Com a finalidade de avaliar se o TAB (tecido adiposo branco) promove mais lipólise realizamos ensaios *ex vivo* incubando fragmentos de TAB na

presença de agonista β -adrenérgico (isoproterenol). Como podemos observar na Fig. 13A, após o tratamento com frutose 10%, a liberação de glicerol na ausência de isoproterenol foi similar entre os grupos ou mesmo na presença de estímulo. Ambos os grupos tiveram aumento significativo na liberação de glicerol quando estimulados com isoproterenol em relação ao seu estado basal ($p < 0,05$, $n = 10$), porém, não houve diferença entre os grupos após estímulo com isoproterenol. Os valores obtidos a partir da razão entre as condições estimulado e não estimulado também foram similares entre os grupos (Fig. 13B).

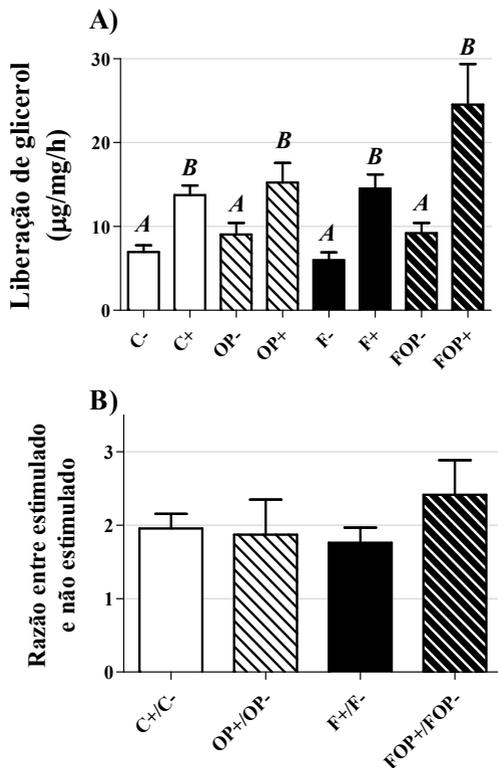


Figura 13 - Tratamento com frutose 10% não altera a atividade lipolítica do TAB.

Não foram observadas diferenças na liberação de glicerol (A) e entre as razões (B) entre os grupos. (A) indica não-estimulado. (B) indica estimulado. Valores apresentados em mediana e intervalo interquartil. Teste Kruskal-Wallis de uma via seguido de *post test* de Dunn, $p < 0,05$, $n = 10$.

Como podemos observar na Figura 14A, a liberação de glicerol pelo TAB após o tratamento com frutose 30% não alterou entre os grupos (n=10 fragmentos). Ambos os grupos apresentaram aumento significativo na liberação de glicerol quando estimulados com isoproterenol em relação ao seu estado basal ($p < 0,05$), porém, não houve diferença entre os grupos após estímulo com isoproterenol. Os valores obtidos a partir da razão entre as condições estimulado e não estimulado também não apresentaram diferenças significativas (Fig. 14B). Estes parâmetros não apresentaram efeito da suplementação com óleo de peixe.

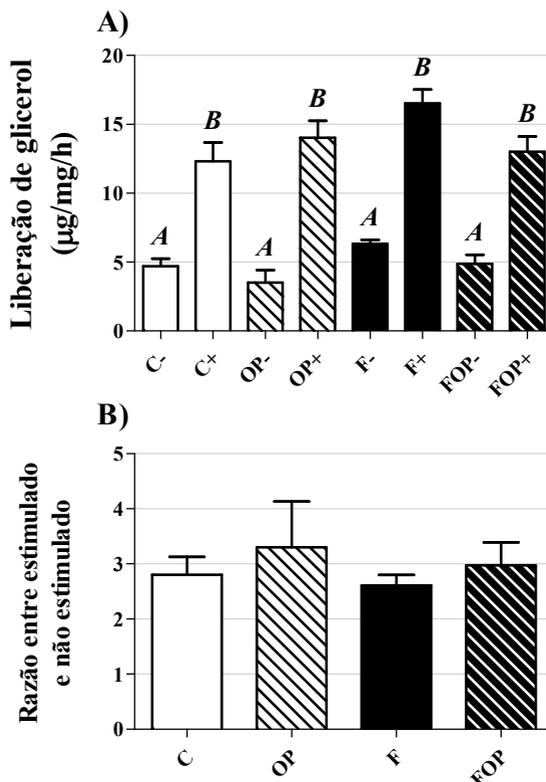


Figura 14- Tratamento com frutose 30% não altera a atividade lipolítica do TAB.

Não foram observadas diferenças na liberação de glicerol (A) e razão (B) entre os grupos. (A) indica não-estimulado. (B) indica estimulado. Valores apresentados em mediana e intervalo interquartil. Teste Kruskal-Wallis de uma via seguido de *post test* de Dunn, $p < 0,05$, $n = 10$.

4.1.8 Consumo de frutose (30%) resulta em aumento da adiposidade visceral e o óleo de peixe não previne esta alteração

Após constatar que frutose não causou alterações em parâmetros relacionados a homeostase glicêmica, foram avaliadas as variáveis de massa relativa de órgãos. As massas relativas do pâncreas, fígado e tecido adiposo omental, epididimário e retroperitoneal não diferiram entre os grupos, como podemos observar na Tabela 6. A somatória da massa dos tecidos adiposos foi similar entre os grupos que recebem frutose e os seus respectivos grupos controle. No entanto, a somatória da massa dos tecidos adiposos viscerais no grupo tratado com 30% de frutose foi maior quando comparado ao grupo controle. Os demais tecidos e órgãos metabólicos não apresentaram diferenças significativas de massa em relação aos respectivos controles. A suplementação com o óleo de peixe não exerceu efeito sobre esses parâmetros (Tabela 6).

Tabela 6 - Massa de tecidos e órgãos de ratos tratados com frutose 10% ou 30% e suplementados com óleo de peixe.

		C	OP	F	FOP
Gordura Epididimária (g/100g)	Frutose 10%	4,3 ± 0,3	3,7 ± 0,3	4,9 ± 0,4	5,0 ± 0,5
	Frutose 30%	3,2 ± 0,3	4,1 ± 0,9	4,6 ± 0,4	4,4 ± 0,3
Gordura Retroperitoneal (g/100g)	Frutose 10%	5,5 ± 0,4	5,8 ± 0,6	7,4 ± 0,8	8,4 ± 0,8
	Frutose 30%	5,8 ± 0,4	6,9 ± 0,8	7,4 ± 0,5	8,1 ± 0,7
Gordura Omental (mg/100g)	Frutose 10%	378,6 ± 14,7	332,7 ± 40,2	415,2 ± 58,8	548,7 ± 54,9
	Frutose 30%	493,6 ± 39,7	510,6 ± 64,0	637,9 ± 38,6	617,0 ± 34,9
Gordura Total (g/100g)	Frutose 10%	10,2 ± 0,8	9,9 ± 1,0	11,7 ± 1,6	14,1 ± 1,3
	Frutose 30%	7,8 ± 0,9	11,5 ± 1,6	12,8 ± 0,9*	13,2 ± 0,9
Fígado (g/100g)	Frutose 10%	12,2 ± 0,6	11,0 ± 0,6	11,7 ± 0,7	12,2 ± 0,4
	Frutose 30%	9,8 ± 0,4	10,5 ± 0,2	10,2 ± 0,3	9,9 ± 0,4
Pâncreas (g/100g)	Frutose 10%	1,3 ± 0,07	1,2 ± 0,04	1,2 ± 0,02	1,2 ± 0,06
	Frutose 30%	1,0 ± 0,05	1,0 ± 0,02	1,0 ± 0,06	1,0 ± 0,05

Valores apresentados em média ± EPM. Asterisco (*) indica diferença significativa da F em relação ao C e FOP e OP por efeito da frutose. Teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey, $p < 0,05$, $n = 10$.

4.2 GRUPO FRUTOSE – REVERSIBILIDADE

4.2.1 A interrupção de água contendo frutose resulta em normalização dos valores de ingestão hídrica

Após a interrupção do tratamento com frutose os animais dos grupos FR10 (Fig. 15A) e FR30 (Fig. 15B) $p < 0,05$, $n = 10$, apresentaram diminuição na ingestão hídrica.

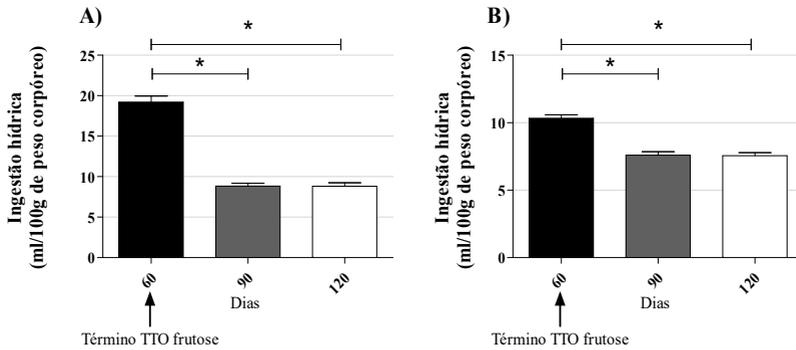


Figura 15 - *Os ratos diminuem a ingestão hídrica 30 e 60 dias após a interrupção da ingestão de frutose.*

Os valores obtidos confirmam que houve diferença significativa na redução da ingestão de água à medida que a frutose foi suspensa. Em (A) Frutose 10%, em (B) Frutose 30%. (*) indica diferença significativa entre os grupos. Teste ANOVA para medidas repetidas seguido de *post test* de Bonferoni, $p < 0,05$, $n = 10$.

4.2.2 A ingestão alimentar é normalizada após interrupção da oferta de água frutada

O consumo alimentar aumentou após a interrupção do tratamento com frutose (Fig. 16A) FR10, (Fig. 16B) para FR30 ($p < 0,05$, $n = 10$).

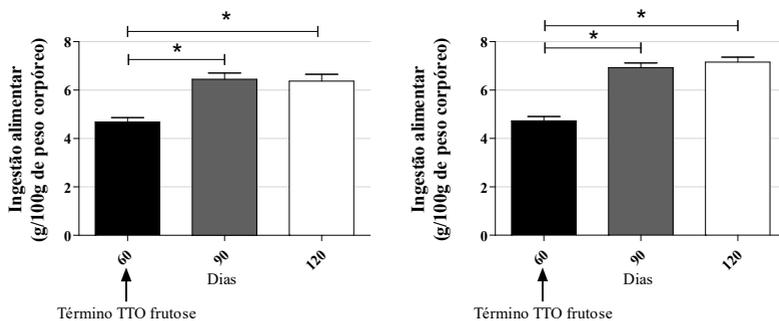
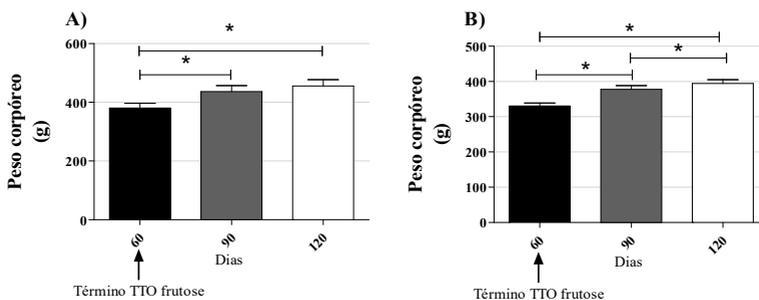


Figura 16 - Os ratos aumentam a ingestão alimentar 30 e 60 dias após a interrupção da ingestão de frutose.

Os valores apresentaram diferenças significantes de aumento de ingestão alimentar após interrupção da frutose. Em (A) Frutose 10%, em (B) Frutose 30%. (*) indica diferença significativa entre os grupos. Teste ANOVA para medidas repetidas seguido de *post test* de Bonferroni, $p < 0,05$, $n = 10$.

4.2.3 Peso corpóreo e ingestão calórica

Os grupos FR10% e FR30% apresentaram aumento significativo de peso corpóreo após a interrupção da água com frutose, e este parâmetro está de acordo com o crescimento natural da espécie, não sendo associado exclusivamente ao término do tratamento. No lote de Frutose 10% não houve modificações em valores de ingestão calórica (Fig. 17A, C), apenas o grupo FR30 que, dos dias 60 para 90 e dias 60 para 120 apresentou diminuição significativa de ingestão calórica (Fig. 17B, C).



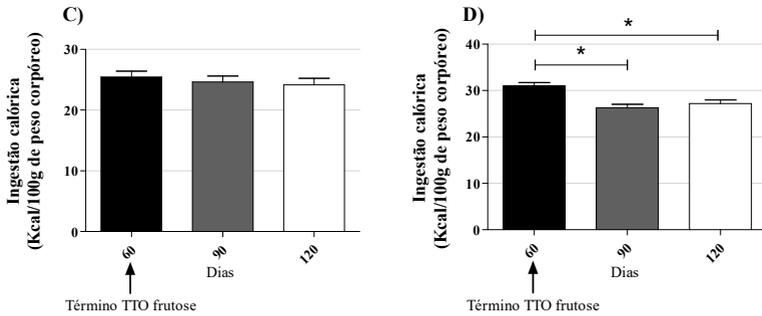
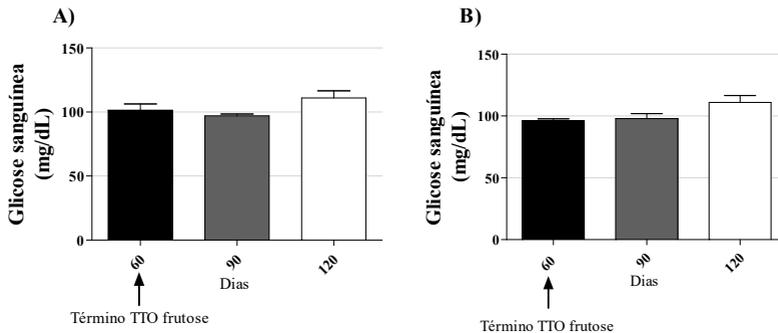


Figura 17 - Os ratos diminuem a ingestão calórica e alteram peso corpóreo 60 dias após o término da ingestão de frutose.

Em A e C Frutose 10%, em B e D Frutose 30%. (*) indica diferença significativa entre os dias 60 e 90, 60 para 120 e 90 para 120. Teste ANOVA para medidas repetidas, seguido de *post test* de Bonferoni, $p < 0,05$, $n = 10$.

4.2.4 Glicemia e Triacilgliceridemia

Os valores glicêmicos no lote de Frutose 10% e 30% não alteraram (Fig. 18A, B). Apenas para os valores de triacilglicerol plasmático, que em FR10 houve diferenças entre os dias 90 e 120 (Fig. 18 C), e FR30 que demonstrou diferenças entre os dias 60 para 90 dias (Fig. 18 D).



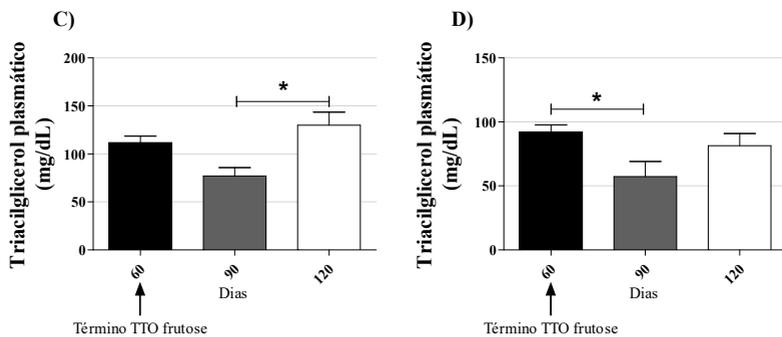


Figura 18 - Triacilgliceridemia após interrupção no tratamento com frutose.

Observe aumento nos valores de triacilglicerol plasmático entre os dias 90 e 120 (C), e diminuição significativa nos valores de triacilglicerol entre os dias 60 e 90. Em A e C Frutose 10%, em B e D Frutose 30%. (*) indica diferença significativa entre os dias 60 e 90, 60 para 120 e 90 para 120. Teste ANOVA para medidas repetidas, seguido de *post test* de Bonferoni, $p < 0,05$, $n = 10$.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, demonstramos que a ingestão crônica de frutose ao longo de 67-70 dias promoveu aumento na ingestão hídrica (apenas no grupo F10%), diminuição na ingestão alimentar sem alterações no peso corpóreo e discreto aumento de ingestão calórica (apenas grupo F30%). Os resultados de ingestão hídrica, ingestão alimentar e peso corpóreo corroboram os de outros grupos de pesquisa que estudaram os efeitos da ingestão de frutose a 10% e 15% na água de beber, por aproximadamente 8 semanas (CASTRO, et al. 2015; SHELUDIAKOVA, et al. 2012).

Os ratos machos que receberam água com frutose demonstraram resultados contrários de alguns estudos no que se refere à homeostase glicêmica, mantendo níveis glicêmicos basais dentro dos valores normais, não apresentando intolerância à glicose e resistência periférica à insulina. Sobre este contexto, não podemos mensurar alterações metabólicas decorrentes deste modelo em fêmeas, visto que ratas sofrem variações hormonais decorrentes do ciclo estral. No entanto, estudos demonstram que ratos machos desenvolvem maiores alterações metabólicas comparadas às fêmeas (ZAMBRANO, et al. 2016). Também demonstramos uma hiperinsulinemia (F30%) e um aumento de adiposidade visceral (apenas grupo F30%), associados à hipertriacilgliceridemia transitória em ambos os grupos (F10% e F30%). Em contrapartida, neste estudo não houve alterações metabólicas tais como hiperuricemia, aumento na liberação de glicerol pelo TAB e aumento de conteúdo de gordura hepática, variáveis estas descritas em outras pesquisas utilizando a frutose como intervenção (SUMIYOSHI, et al. 2006; ELLIOT, et al. 2002; MILLER; ADELI, et al. 2008; CANCELAS, et al. 2008, JOHNSON, et al. 2013).

Ainda, observamos a capacidade de reversão de um quadro metabólico alterado em decorrência da ingestão de água frutada a partir da suspensão do insulto. Em todas as variáveis analisadas no estudo, a suplementação com óleo de peixe não repercutiu efeitos significativos.

Os grupos que receberam água com frutose à 10% apresentaram maior ingestão de água comparados aos grupos que receberam água potável, isto porque a frutose apresenta alto grau de palatabilidade como já descrito na literatura (TEFF et al. 2004). No entanto, na concentração de frutose 30%, os ratos que receberam água frutada mantiveram o mesmo padrão de ingestão hídrica relacionados aos seus controles, porém mantendo uma diminuição no padrão alimentar. Portanto, os grupos que

receberam frutose em ambas as concentrações apresentaram uma compensação do balanço energético, ou seja, em uma concentração de frutose menor os animais ingeriram mais água com frutose e menos ração, e em uma concentração maior de frutose na água os animais ingeriram a mesma quantidade de água que os demais grupos e também diminuíram seu padrão alimentar, e ao final todos mantiveram os mesmos valores de consumo calórico e mantiveram o mesmo padrão de peso corpóreo (aproximadamente 150 g). Para Damiani e Damiani (2011), isso ocorre em decorrência ao “cérebro metabólico”, o qual responde a partir de sinais providos da ingestão de nutrientes promovendo representações corticais e límbicas as quais influenciam na quantidade de alimento que deverá a partir de então ser ingerido. Logo, quanto maior for a quantidade de frutose na água, maior será o valor energético ingerido, e assim o rato através de mecanismos cerebrais consegue manter o equilíbrio energético.

As diferenças nas ingestões hídricas de água com frutose e diminuição de padrão alimentar corroboram uma compensação calórica, ou seja, a ingestão de água frutada compensa a necessidade de menos ingesta de ração mantendo o equilíbrio no consumo calórico (MADERO 2011). Estes resultados podem ser atribuídos pela capacidade da frutose em apresentar uma rápida metabolização hepática, proporcionando assim a sensação de saciedade, pois após ser ingerida é rapidamente metabolizada no hepatócito, podendo seguir três caminhos: participar da via glicolítica, ser reduzida em glicerol ou formar glicose (TAPPY; LÊ. 2012).

O rato jovem é capaz de ajustar sua ingestão alimentar tão precisamente que mantém as suas reservas energéticas e de tecido adiposo constantes (KENNEDY, 1953). Variações na ingestão alimentar podem ser atribuídas em resposta à alterações hipotalâmicas que indicam saciedade, e as mesmas ocorrem sem alterar peso corpóreo e balanço energético (HERMSDORFF, et al. 2006). O hipotálamo é responsável por intervir nos efeitos da leptina circulante sobre o peso e a ingestão alimentar. Mais especificamente, as regiões ventro-basais do hipotálamo (núcleos arqueado, ventro-medial e dorso-medial) contêm as maiores concentrações do receptor de leptina (Ob-Rb) em todo o cérebro (NEGRÃO; LICINIO, 2000). A leptina, por sua vez, é responsável pelo controle da ingestão alimentar, regulando a função neuroendócrina e o metabolismo de gorduras (MANTZOROS; MOSCHOS, 1998). Wölnerhanssen et al. (2015), em seu estudo, demonstra alterações hormonais relacionadas à saciedade após a ingestão de frutose, as quais já haviam sido relatadas em estudos anteriores (STEINERT et al. 2011; TEFF et al. 2004), as mesmas caracterizadas pela não-liberação de

insulina e leptina, hormônios estes responsáveis pela manutenção do balanço energético, mantendo efeito de supressão imediato do apetite (KULLMANN et al. 2013).

Em contraste, o consumo de frutose não afeta a liberação dos hormônios acima mencionados, e em vez de suprimir a ingestão de alimento adicional, a frutose acrescenta calorias sobre a ingestão calórica total (ROLLS et al. 1990), o que vai ao contrário dos achados deste estudo. A suplementação com óleo de peixe não demonstrou alterações para estes parâmetros entre os grupos.

Portanto, nossos resultados não nos permitem esclarecer o mecanismo pelo qual os animais conseguem manter o equilíbrio energético entre os grupos e, mantendo assim, o mesmo padrão de peso corpóreo, pois existem divergências entre os estudos já realizados com a frutose.

Neste modelo, o consumo de frutose não afetou o peso corporal e aumento de tecido adiposo epididimário quando utilizada a concentração de 10%, como já descrito em outras pesquisas (MASSON, et al. 2008; LIU, et al. 2013). WANG, et al. (2012) realizou um estudo comparando a associação de Frutose (340 g/kg), Glicose (340 g/kg) e Sacarose (430 g/kg) com óleo de peixe, no qual camundongos receberam dietas ricas destes açúcares associadas a concentração de 27 ± 3 e 18 ± 3 g/kg de EPA e DHA, respectivamente, por um período de 8 semanas. Os resultados demonstraram que a sacarose e a glicose são os responsáveis por promover a obesidade, pois apresentaram maior quantidade de adiposidade visceral, peso corpóreo e ingestão calórica quando comparadas aos animais do grupo que recebeu frutose, e a associação com o ômega 3, neste estudo, não foi eficaz em atenuar estes efeitos nocivos. Similar aos nossos achados, a frutose não promoveu alterações no peso corpóreo. No entanto, os dados deste estudo são contrários à outras pesquisas, os quais apresentaram aumento de peso em decorrência da ingestão de frutose (BASCIANO, et al. 2005; SUMIYOSHI, et al. 2006; TAPPY; LÊ, 2010). Entretanto, na concentração F30%, o grupo que recebeu frutose apresentou diferença significativa no aumento de peso de tecido adiposo total (tecido adiposo epididimário, retroperitoneal e omental), bem como maior ingestão calórica nas últimas semanas de tratamento, o que vai de encontro aos resultados de outros grupos de pesquisa (SHELUDIAKOVA, BOAKES. 2012; ALZAMENDI, et al. 2009; PANCHAL, et al. 2011).

A ingestão crônica de frutose não apresentou alterações nos valores de glicemia basal nas dosagens de frutose ofertadas, reproduzindo dados semelhantes a estudos de outros grupos de pesquisa. Em pesquisas

realizadas com macacos, a administração crônica de frutose associada ao óleo de peixe não apresentou alterações glicemia basal e em concentrações de insulina plasmáticas (BREMER et al. 2014). WANG et al (2012) em testes para avaliar as concentrações plasmáticas de glicose e insulina em camundongos, demonstrou normoglicemia entre os animais que recebem dieta rica em frutose. Masson et al. (2008) também demonstrou em seu estudo com ratos que uma dieta contendo 66% de frutose associada a suplementação com 16% de óleo de peixe por 8 semanas, não apresenta qualquer efeito significativo sobre a glicemia basal.

Tappy e Lê (2012) reforça que, mesmo em doses elevadas, a frutose pode produzir apenas modestas alterações na homeostase glicêmica, e altera a produção de glicose hepática mas com pouco impacto sobre as concentrações plasmáticas de glicose sanguínea e na sensibilidade periférica à insulina.

Uma pesquisa com humanos concluiu que uma alimentação com alto teor de frutose, a curto prazo, parece não causar nenhuma alteração na sensibilidade à insulina hepática (TAPPY; LÊ, 2012). Contrariamente aos nossos resultados, Barros et al. (2007) administrou frutose nas doses de 10% e 20% na água de beber para hamster durante 60 dias, e obteve cerca de 40% de aumento nas concentrações plasmáticas de glicose em ambas as dosagens.

Estudos comparativos entre frutose e glicose, os quais avaliam os efeitos destes respectivos açúcares sobre a homeostase glicêmica e lipídica, apontaram valores maiores nas concentrações plasmáticas de glicose durante o teste de oGTT e o cálculo da área abaixo da curva de camundongos alimentados com dieta rica em glicose (WANG et al. 2012). Logo, semelhante aos nossos achados, ambas concentrações de frutose não apresentaram intolerância à glicose entre os grupos no oGTT. O cálculo da área abaixo da curva também não apresentou diferenças entre os grupos experimentais neste estudo, tão pouco efeitos relacionados à suplementação com o óleo de peixe.

Um estudo demonstrou que em indivíduos com excesso de peso alimentados com uma dieta de alto teor de frutose por 10 semanas conduziu a um ganho de peso corporal correspondente a 1 à 3 kg, bem como aumentou significativamente as concentrações de glicose e de insulina no sangue, caracterizando uma leve intolerância à glicose (TAPPY; LÊ, 2012). Nossa pesquisa foi realizada com animais de peso ideal, e esta pode ser uma justificativa para que em nenhuma das doses de frutose administradas, os animais desenvolverem intolerância à glicose e/ resistência à insulina.

Com base na falta de resistência à insulina diretamente documentada e as pequenas alterações na glicemia e insulinemia observadas mesmo após ingestão de alto teor de frutose ao longo de várias semanas, é pouco provável que a frutose, por si só, seja responsável por alterações importantes da homeostase da glicose. Não se pode, no entanto, eliminar a hipótese de que uma exposição mais longa ao alto consumo de frutose possa estar associada com a resistência à insulina (TAPPY; LÊ, 2012).

Ao contrário dos resultados obtidos neste estudo, os achados de uma pesquisa com ratos demonstrou que uma dieta com alto teor de frutose acarreta em resistência à insulina, esta identificada no ITT, mas que pode ser totalmente revertida se houver suplementação com o óleo de peixe (MASSON et al. 2008). Diversos estudos experimentais têm demonstrado a eficácia de óleo de peixe na prevenção da resistência à insulina (LUO et al. 1996; PEYRON et al. 2002), e investigações clínicas sugerem que os AGPIs reduzem o risco de intolerância à glicose (NETTLETON; KATZ. 2005).

Nossos dados referentes à insulinemia demonstraram aumento significativo na concentração de F30%, e neste parâmetro o óleo de peixe foi eficaz em atenuar a hiperinsulinemia causada pela ingestão de frutose. Estes achados são semelhantes à pesquisas realizadas com frutose que demonstram distúrbios na secreção de insulina (ALZAMENDI, et al. 2012; SHELUDIAKOVA, et al. 2012).

Estudos trazem como ponto crucial para o desenvolvimento de eventos metabólicos nocivos causados pela ingestão de frutose as alterações no metabolismo lipídico (MAMIKUTTY, et al. 2014; PANCHAL, et al. 2011 SHELUDIAKOVA, et al. 2012). Um estudo comparativo realizado em ratos, o qual animais de um grupo foram mantidos em jejum durante 48 horas e realimentados por 24 ou 48 horas com dieta contendo 63% de frutose, e o outro grupo de ratos foi alimentado com 63% de frutose durante 90 dias, demonstrou que não houve alterações nas concentrações de gordura hepática, apenas um aumento no acúmulo de gordura nos hepatócitos, e em uma oferta aguda de frutose, a mesma é capaz de ocasionar a esteatose hepática (CASTRO, 2011). Corroborando com este estudo, nossos resultados referentes à gordura hepática demonstraram que a frutose, neste contexto de tratamento crônico, não apresentou alterações relacionadas ao grupo controle.

Contrariamente aos nossos achados, pesquisas em roedores demonstram que o consumo de frutose implica no aumento nas concentrações plasmáticas de ácido úrico (NAKAGAWA, et al. 2005;

LIN, et al. 2016). Estudos relacionando o consumo de frutose com o aumento das concentrações plasmáticas de ácido úrico demonstraram que este pode ser um ativador potente da lipogênese hepática por meio da geração de estresse oxidativo mitocondrial (LANASPA, et al. 2012). Assim, esteatose hepática também pode estar associada à frutose por uma via mais complexa que o metabolismo hepático direto entre frutose e triglicerídeos (DOUARD; FERRARIS, 2013). Em nossos resultados as concentrações plasmáticas de ácido úrico não apresentaram diferenças entre os grupos, portanto podemos justificar que este pode ser um dos fatores que contribuíram para a ausência no aumento da gordura hepática nos ratos tratados com diferentes concentrações de frutose.

Em relação à hipertriacilgliceridemia, a pesquisa apontou aumento significativo e transitório de TG, o que reforça a hipótese de que a frutose, em qualquer dosagem, pode causar alterações no metabolismo lipídico, e contraditoriamente a alguns grupos de pesquisa, o óleo de peixe não atenuou este efeito nocivo.

Ao se observar a primeira coleta realizada 7 dias após o desmame dos ratos, comparando com a segunda coleta a qual caracteriza os primeiros dias de tratamento com frutose, percebe-se um declínio nos níveis de triacilglicerol em todos os grupos experimentais. Segundo Leite et al (2012), a gordura presente no leite materno representa a maior fonte de energia para o lactente, contribuindo com 40 a 55% do total de energia ingerida, pois além de fornecer energia metabólica, são requeridos para a manutenção da estrutura e função da membrana celular. Portanto, atribui-se o fato deste decréscimo de valores de triacilglicerol ao término da lactação.

Huang et al (1997), em seu estudo, sugere uma dieta rica em frutose induz hipertrigliceridemia e resistência periférica à insulina com a função de ilhotas pancreáticas preservada, e que estes efeitos nocivos podem ser prevenidos com a suplementação com ômega 3. Nos animais do grupo F10%, as alterações nos valores de TG começaram a partir do 30º dia de tratamento, e curiosamente os animais que foram suplementados com óleo de peixe apresentaram os valores mais altos.

Em um estudo realizado para comparar diferentes doses de óleo de peixe sobre os efeitos nocivos causados pela ingestão de frutose (66%), os grupos que receberam suplementação com 2% de óleo de peixe demonstraram hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia nos mesmos valores que o grupo que recebeu somente frutose, indicando que essa dose não atenuou as alterações metabólicas nocivas (CASTRO et al. 2015), o que vai de encontro aos nossos achados.

Karsenty et al. (2013) também demonstrou em seu estudo que a frutose em altas doses induziu a diminuição na expressão dos genes PPARs nos hepatócitos, e as mesmas não foram corrigidas com a suplementação do óleo de peixe. Em contrapartida, pesquisas recentes apontaram que a ativação de PPAR alfa induzida por óleo de peixe aumentou a oxidação de ácidos graxos hepáticos, promovendo a diminuição nos valores de TG (CASTRO et al. 2015), assim, não descartamos a hipótese de que no grupo FOP30%, os animais foram beneficiados com a suplementação do óleo de peixe, pois o grupo frutose que não recebeu a suplementação com o óleo de peixe apresentou maiores valores de TG, normalizando após 60 dias de tratamento.

Uma forma que poderia explicar o aumento transitório de TG seria via hepatócito, já que, neste estudo, não houve alterações significativas relacionadas à lipólise periférica. Karsenty et al. (2013) descreve que um aumento da produção hepática de VLDL induz adiposidade visceral que, posteriormente promove a resistência à insulina no fígado e tecido adiposo. No entanto, outros dados sugerem que o consumo de frutose promove um acúmulo intracelular de lípidos nos hepatócitos, o que promove uma resistência à insulina independentemente da adiposidade visceral (MORINO, PETERSEN, SHULMAN. 2006; STANHOPE, HAVEL. 2008). Logo, a questão de qual órgão sensível à insulina (fígado ou tecido adiposo) está primeiramente envolvido na sequência de eventos pelos quais o consumo de frutose contribui para o desenvolvimento de resistência à insulina solicita uma investigação mais aprofundada (STANHOPE, HAVEL. 2008).

Um ponto interessante do nosso trabalho foi demonstrar alterações de reversão após interrupção do tratamento com frutose, dados estes que até então não foram mencionados na literatura. Após o tratamento com frutose por 60 dias os animais permaneceram por um período de 60 dias recebendo água potável e ração *ad libitum*.

Observamos a significativa diminuição no consumo de água frutada no grupo F10% e F30% imediatamente após a interrupção do tratamento, seguido de um aumento no consumo de ração. Os animais de ambos os grupos mantiveram ganho de peso corporal proporcional à sua idade e mantendo os mesmos padrões, porém, no grupo F30%, os animais apresentaram uma diminuição significativa no consumo calórico aos 90 e 120 dias após o final do tratamento. Em relação aos valores glicêmicos, os grupos não apresentaram alterações, corroborando os dados do modelo. No entanto, nos valores de TG, os animais apresentaram redução após a interrupção do tratamento.

Embora tenhamos resultados que corroboram uma possível melhora nos parâmetros cardiometabólicos por efeito de reversão, os mesmos não podem ser afirmados, à medida que o grupo reversibilidade não possuiu um grupo controle com fins comparativos.

Levando em consideração estes achados, necessita-se da realização de outros estudos para a consolidação desta “hipótese” de que a interrupção do tratamento reverte as alterações acarretadas pelo consumo crônico de frutose podendo promover uma melhora em um quadro clínico metabólico alterado.

6 CONCLUSÃO

Nossos dados permitem concluir que em ambas as concentrações promoveram incremento transitório das concentrações de triacilglicerol plasmático. Sendo que a ingestão de Frutose 30% promoveu ainda aumento da adiposidade visceral alertando para o consumo da frutose em excesso. Neste projeto a suplementação com óleo de peixe demonstrou ineficiência em normalizar as variáveis alteradas. As avaliações após interrupção da oferta de frutose demonstram flexibilidade dos sistemas metabólicos ao reverter os mecanismos responsáveis por estas alterações nocivas decorrentes do consumo crônico de frutose.

7 PERSPECTIVAS

Mecanismos metabólicos sobre o efeito do consumo de frutose associado à suplementação com o óleo de peixe precisam ser explorados. Estudos que explorem mecanismos de saciedade induzidos por hormônios como a leptina e adiponectina, bem como uma melhor compreensão dos fatores genéticos e ambientais. Também estudos comparativos dos efeitos da frutose em populações com maior risco de desenvolver doenças metabólicas, como descendentes de indivíduos com diabetes tipo 2 e indivíduos com sobrepeso, são possibilidades que contribuiriam para tal elucidação.

REFERÊNCIAS

- ALZAMENDI, A. et al. Fructose-rich diet-induced abdominal adipose tissue endocrine dysfunction in normal male rats. **Endocrine**, v. 35, n. 2, 2009.
- ALZAMENDI, A. et al. Effect of pioglitazone on the fructose-induced abdominal adipose tissue dysfunction. **PPAR Res**, 2012.
- ANDRÉS, JC.; CUSSÓ, R. Activation of muscle phosphofructokinase by α -glucose 1,6-bisphosphate and fructose 2,6-bisphosphate is differently affected by other allosteric effectors and by pH. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 157, n. 2, 1988.
- BANTLE, JP. Dietary Fructose and Metabolic Syndrome and Diabetes. **J Nutr**, v. 139, n. 6, 2009.
- BARBOSA, AM. et al. Fish oil supplementation attenuates changes in plasma lipids caused by dexamethasone treatment in rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 41, n. 4, 2016.
- BARROS, CM. et al. Substitution of drinking water by fructose solution induces hyperinsulinemia and hyperglycemia in hamsters. **Clinics**, v. 62, 2007.
- BASCIANO, H. et al. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia **Nutrition & Metabolism**, v. 10, 2005.
- BOTOLIN, D. et al. Docosahexanoic acid (22:6, n3) regulates rat hepatocyte SREBP-1 nuclear abundance by Erk- and 26S proteasome-dependent pathways. **J Lipid Res**, v. 47, n. 1, 2006.
- BRAY, GA. Energy and Fructose From Beverages Sweetened With Sugar or High-Fructose Corn Syrup Pose a Health Risk for Some People. **American Society for Nutrition Adv Nutr**, v.4, 2013.
- BREMER, AA. et al. Fish Oil Supplementation Ameliorates Fructose-Induced Hypertriglyceridemia and Insulin Resistance in Adult Male Rhesus Macaques. **The Journal of Nutrition**, v. 10, n. 3945, 2014.

CALDER, PC. Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acid. **J. Nutr**, v.142, n. 3, 2012.

CALDER, PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. Lipids for the future from agro resources to human health. **Biochimie**, v. 91, n. 6, 2009.

CANCELAS, J. et al. Induction and reversibility of insulin resistance in rats exposed to exogenous D-fructose. **Horm Metab Res**, v. 40, n. 7, 2008.

CASTRO, GS. et al. Dietary docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid influence liver triacylglycerol and insulin resistance in rats fed a high-fructose diet. **Mar Drugs**, v. 13, n. 4, 2015.

CASTRO, GS. et al. Fructose and NAFLD: metabolic implications and models of induction in rats. **Acta Cir. Bras.**, v. 26, n. 2, 2011.

CHARREZ, B.; QUIO, L.; HEBBARD, L. The role of fructose in metabolism and cancer. **Horm Mol Biol Clin Investig**, v. 22, n. 2, 2015.

DAMIANI, D.; DAMIANI, D. Sinalização cerebral do apetite. **Rev Bras Clin Med**, v. 9(2):138-45, 2011

DOUARD, V.; FERRARIS, RP. The role of fructose transporters in diseases linked to excessive fructose intake. **J Physiol**, v. 591, n. 2, 2013.

DULLOO, AG.; MONTANI, JP. Sugary drinks in the pathogenesis of obesity and cardiovascular diseases. **International Journal of Obesity**, v. 32, 2008.

EBERLE, D. et al. SREBF-1 gene polymorphisms are associated with obesity and type 2 diabetes in French obese and diabetic cohorts. **Diabetes**, v. 53, 2004.

ELLIOT, KL. et al. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 6, 2004.

ELLIOTT, SS. et al. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. **Am J Clin Nutr**, v. 76, 2002.

FAGUNDES, DJ.; TAHA, MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cir Bras**, v. 19, n. 1, 2004.

FERNANDEZ, ML.; WEST, KLJ. Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. **Nutr**, v.135, n. 9, 2005.

FRANZ, MJ. et al. Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications. **Diabetes Care**, 25 (1): 148 – 98. 2002.

GAINO, NM.; SILVA, MV. Consumo de frutose e impacto na saúde humana. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, 2011.

HANSMANNEL, F.; MORDIER, S.; IYNEDJIAN, PB. Insulin induction of glucokinase and fatty acid synthase in hepatocytes: analysis of the roles of sterol-regulatory-element-binding protein-1c and liver X receptor. **Biochem J**, v.15, n. 399, 2006.

HERMSDORFF, HHM. et al. Leptina e sua influência na patofisiologia de distúrbios alimentares. **Rev. Nutr.** 2006. vol.19 no.3

HOOPER, L. et al. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Am J Clin Nutr**, v. 88, 2008.

HU, FB.; MALIK, VS. Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: Epidemiologic evidence in Obesity. **Physiol Behav**, v.100, n. 1, 2010.

HUANG, YJ. et al. Amelioration of insulin resistance and hypertension in a fructose-fed rat model with fish oil supplementation. **Metabolism**, v. 46, n. 11, 1997

JOHNSON, RJ. et al. Sugar, uric Acid, and the etiology of diabetes and obesity. **Diabetes**, v. 62, n. 10, 2013.

JUAREZ-LÓPEZ, C. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids reduce insulin resistance and triglycerides in obese children and adolescents. **Pediatr Diabetes**, v. 14, n. 5, 2013.

KARSENTY, J. et al. Beneficial effects of omega-3 fatty acids on the consequences of a fructose diet are not mediated by PPAR delta or PGC1 alpha. **Eur J Nutr**, v. 52, n. 8, 2013.

KERSTEN, S. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. **J Clin Invest**, v. 103, n. 11, 1999.

KENNEDY GC. The role of fat depot in the hypothalamic control of food intake in the rat. **Proc Roy Soc London Biol Sci**.1953; 140(901): 578-96.

KOO, HY. et al. Dietary fructose induces a wide range of genes with distinct shift in carbohydrate and lipid metabolism in fed and fasted rat liver. **Biochim Biophys Acta**, v. 1782, 2008.

KOTA, BP.; HUANG, TH.; ROUFOGALIS, BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. **Pharmacol Res**, v. 51, n. 2, 2005.

KOUTNIKOVA, H. et al. Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR gamma hypomorphic mice. **Proc Natl Acad Sci**, v. 100, n. 24, 2003.

KULMANN, S. et al. Intranasal insulin modulates intrinsic reward and prefrontal circuitry of the human brain in lean women. **Neuroendocrinology**, v. 97, 2013.

LANASPA, MA. et al. Uric Acid Induces Hepatic Steatosis by Generation of Mitochondrial Oxidative Stress. Potential role in fructose dependent and independent fatty liver. **J Biol Chem**, v. 287, n. 48, 2012.

LEITE, CDFC. et al. Efeito da semente de linhaça no crematócrito do leite de ratas e sua contribuição no crescimento corporal dos filhotes. **J. Pediatr**. 2012 vol.88 no.1LIN, WT. et al. Fructose-Rich Beverage Intake and Central Adiposity, Uric Acid, and Pediatric Insulin Resistance. **J Pediatr**, v. 171, 2016.

LICHTENSTEIN, AH. et al. Dietary fat consumption and health. **Nutr Rev**, v. 56, n. 5, 1998.

LIU, X. et al. Eicosapentaenoic acid-enriched phospholipid ameliorates insulin resistance and lipid metabolism in diet-induced-obese mice. **Lipids Health Dis**, v. 12, n. 109, 2013.

LUO, J. et al. Chronic consumption of short-chain fructooligosaccharides by healthy subjects decreased basal hepatic glucose production but had no effect on insulin-stimulated glucose metabolism. **Am J Clin Nutr**, v. 63, n. 6, 1996.

MADERO, M. et al. Dietary Fructose and Hypertension. **Curr Hypertens Rep**, v. 13, n. 29, 2011.

MAHMOUND, AA.; ELSHAZLY, SM. Ursodeoxycholic Acid Ameliorates Fructose-Induced Metabolic Syndrome in Rats. **PLoS ONE**, v.9, n.9, 2014.

MAHMOUND, MF. et al. Anti-inflammatory effect of atorvastatin on vascular reactivity and insulin resistance in fructose fed rats. **Arch Pharm Res**, v. 35, 2012.

MAMIKUTTY, N. et al. The Establishment of Metabolic Syndrome Model by Induction of Fructose Drinking Water in Male Wistar Rats. **Biomed Res Int**, 2014. MANTZOROS, CS. MOSCHOS, SJ. Leptin: in search of role(s) in human physiology and pathophysiology. **Clin Endocrinol (Oxf)** 1998; 49: 551-67.

MAREK, G. et al. Adiponectin resistance and proinflammatory changes in the visceral adipose tissue induced by fructose consumption via ketohexokinase-dependent pathway. **Diabetes**, v. 64, n. 2, 2015.

MASSON, VR. et al. Long-Chain (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids Prevent Metabolic and Vascular Disorders in Fructose-Fed Rats. **J Nutr**, v. 138, n. 10, 2008.

MELANSON, KJ. et al. Effects of high-fructose corn syrup and sucrose consumption on circulating glucose, insulin, leptin, and ghrelin and on appetite in normal-weight women. **Nutrition**, v. 23, n. 103, 2007.

MELLOUK, Z. et al. The metabolic syndrome of fructose-fed rats: effects of long-chain polyunsaturated ω 3 and ω 6 fatty acids. **Int J Mol Med**, v. 28, n. 6, 2011.

MILLER, A.; ADELI, K. Dietary fructose and the metabolic syndrome. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 24, n. 2, 2008.

MISRA, A.; KHURANA, L. Obesity and the Metabolic Syndrome in Developing Countries. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, n. 11, 2008.

MONTELL, E. et al. DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 280, n. 2, 2001.

MOREIRA, SR. et al. Predição da resistência à insulina em crianças: indicadores antropométricos e metabólicos. **J. Pediatr**, v.84, n. 1, 2008.

MORINO, K.; PETERSEN, KF.; SHULMAN, GI. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. **Diabetes**, v. 55, n. 2, 2006.

NAKAGAWA, T. et al. Hypothesis: fructose-induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. **Nat Clin Pract Nephrol**, v. 1, n. 2, 2005.

NAKAGAWA, T. et al. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. **Am J Physiol**, v. 290, 2006.

NCEP. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). **JAMA**, v. 285, 2001.

NEGRÃO, AB. LICINIO, J. Leptina: o Diálogo entre Adipócitos e Neurônios. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2000; v. 44 n.3

NETTLETON, DS.; KATZ, R. n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: A review. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 105, n. 3, 2005.

PANCHAL, K. et al. High-carbohydrate, High-fat Diet-induced Metabolic Syndrome and Cardiovascular Remodeling in Rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 57, n. 5, 2011.

PEYRON, E. et al. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids up-regulate plasma leptin in insulin-resistant rats. **J Nutr**, v. 132, 2002.

PYPER, SR. et al. PPAR alpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. **Nucl Recept Signal**, v. 16, n. 8, 2010.

RAFACHO, A. et al. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 85, 2007.

RAFACHO, A. et al. High doses of dexamethasone induce increased beta-cell proliferation in pancreatic rat islets. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, 2009.

ROLLS, BJ.; KIM, S.; FEDOROFF, IC. Effects of drinks sweetened with sucrose or aspartame on hunger, thirst and food intake in men. **Physiol Behav**, v. 48, 1990.

RUTLEDGE, AC.; ADELI, K. Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms. **Nutr Rev**, v. 65, 2007.

SAMPATH, H.; NTAMBI, JM. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. **Nutr Rev**, v. 62, n. 9, 2004.

SARBOLOUKI, S. et al. Eicosapentaenoic acid improves insulin sensitivity and blood sugar in overweight type 2 diabetes mellitus patients: a double-blind randomised clinical trial. **Singapore Med J**, v. 54, n. 7, 2013.

SAUTIN, YY.; JOHNSON, RJ. Uric acid: the oxidantantioxidant paradox. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, v. 27, n. 6-7, 2008.

SERAPHIM, PM. et al. GLUT4 protein expression in obese and lean 12-month-old rats: insights from different types of data analysis. **J. Med. Biol. Res**, v. 34, n. 10, 2001.

SFEIR, A. et al. Regulation of FAT/CD36 gene expression: Further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport Prostaglandins Leukot. **Essent. Fatty Acids**, v. 57, 1997.

SHELUDIAKOVA, K.; BOAKES, RRA. Metabolic and behavioural effects of sucrose and fructose/glucose drinks in the rat. **Eur. J. Nutr**, v. 51, 2012.

SHOONJNANS, K.; STAELS, B.; AUWERX, J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1302, n. 2, 1996.

SINAIKO, AR. et al. Relation of body mass index and insulin resistance to cardiovascular risk factors, inflammatory factors, and oxidative stress during adolescence. **Circulation**, v. 19, n. 111, 2005.

SINGLETON, CB.; WALKER, BD.; CAMPBELL, TJ. n-3 polyunsaturated fatty acids and cardiac mortality. **Aust N Z J Med**, v. 30, n. 2, 2000.

SORIA, A. et al. Dietary fish oil reverse epididymal tissue adiposity, cell hypertrophy and insulin resistance in dyslipemic sucrose fed rat model small star, filled. **J Nutr Biochem**, v. 13, n. 4, 2002.

STANHOPE, KL.; HAVEL, PJ. Endocrine and metabolic effects of consuming beverages sweetened with fructose, glucose, sucrose, or high-fructose corn syrup. **Am J Clin Nutr**, v. 88, 2008.

STANHOPE, KL.; HAVEL, PJ. Twenty-four-hour endocrine and metabolic profiles following consumption of high-fructose corn syrup, sucrose, fructose, and glucose sweetened beverages with meals. **Am J Clin Nutr**, v. 87, n. 5, 2008.

STEINERT, RE. et al. Effects of carbohydrate sugars and artificial sweeteners on appetite and the secretion of gastrointestinal satiety peptides. **Br J Nutr**, v. 105, 2011

SUMIYOSHI, M. et al. Chronic Intake of High-Fat and High-Sucrose Diets Differentially Affects Glucose Intolerance in Mice. **J. Nutr**, v. 136, 2006.

TAPPY, L.; LÊ, AK. Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase. **Physiol Rev**, v. 90, 2010.

TAPPY, L.; LÊ, KA. Does fructose consumption contribute to non-alcoholic fatty liver disease? **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 36, n. 6, 2012.

TEFF, KL. et al. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, 2004.

TOPPING, DL.; MAYES, PA. The Immediate Effects of Insulin and Fructose on the Metabolism of the Perfused Liver. Changes in lipoprotein secretion, fatty acid oxidation and esterification, lipogenesis, and carbohydrate metabolism. **Biochem J**, v. 126, n. 295, 1972.

TRAN, LT. et al. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. **Mol. Cell. Biochem**, v. 332, 2009.

TRINH, KY. et al. Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats. **J Biol Chem**, v. 273, n. 47, 1998.

VAN DEN BERGHE, G. Fructose: metabolism and short-term effects on carbohydrate and purine metabolic pathways. **Prog Biochem Pharmacol**, v. 21, 1986.

VARMAN, VT. Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance. **Trends Endocrinol Metab**, v. 22, n. 2, 2010.

VIGERUSTA, NF. et al. Fish oil and 3-thia fatty acid have additive effects on lipid metabolism but antagonistic effects on oxidative damage when fed to rats for 50 weeks. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 11, 2012.

WANG, BP. et al. Stat3-mediated activation of microRNA-23a suppresses gluconeogenesis in hepatocellular carcinoma by down-regulating Glucose-6-phosphatase and peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha. **Hepatology**, v. 56, n. 1, 2012.

YAMAZAKI, RK. et al. Low fish oil intake improves insulin sensitivity, lipid profile and muscle metabolism on insulin resistant MSG-obese rats. **Lipids Health Dis**, v. 28, 2011.

WOLSERNHANSEN, BK. et al. Dissociable Behavioral, Physiological and Neural Effects of Acute Glucose and Fructose Ingestion: A Pilot Study. **Plos One**, 2015.

ZAMBRANO, E. et al. Decreased basal insulin secretion from pancreatic islets of pups in a rat model of maternal obesity. **Journal of Endocrinology**, 2016. 231(1):49-57.