Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Alini Schultz Moreira

Dietas ricas em gordura, frutose e sacarose: alterações no fígado

Rio de Janeiro
2014

Alini Schultz Moreira

Dietas ricas em gordura, frutose e sacarose: alterações no fígado

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

Rio de Janeiro

2014

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M838 Moreira, Alini Schultz.
Dietas ricas em gordura, frutose e sacarose: alterações no fígado / Alini Schultz Moreira. – 2014
76 f.

Orientador: Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda.
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Fígado Gorduroso - Aspectos nutricionais - Teses. 2. Dieta hiperlipídica - Efeitos adversos. 3. Frutose - Efeitos adversos. 4. Sacarose na dieta - Teses. 5. Resistência à insulina - Teses. 6. Gorduras na dieta - Teses. I. Lacerda, Carlos Alberto Mandarim de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. IV. Título.

CDU 616.36-003.826

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

_____ _____
Assinatura Data

Alini Schultz Moreira

Dietas ricas em gordura, frutose e sacarose: alterações no fígado

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 13 de agosto de 2014.

Banca Examinadora:

_____

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda (Orientador)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof. Dr. Carlos Eduardo Brandão

Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Prof. Dra. Silvia Maria Custódio das Dores

Universidade Federal Fluminense

_____

Prof. Dra. Thereza Christina Barja Fidalgo

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof. Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

A minha família.

Aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo conforto e incentivo nos momentos mais difíceis desta jornada,

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda que deu a oportunidade de concretizar mais esta etapa,

À Profª Drª Márcia Barbosa Águila pelo carinho e suporte nutricional a este projeto,

A minha ex-aluna de Medicina e aluna de iniciação científica, Débora Neil, por ser meu braço direito na realização deste projeto e minha fiel amiga nos momentos de angústia,

Aos amigos do laboratório LMMC que fizeram a diferença neste trabalho: Victor Faria Motta, Marcel Pimenta, Fernanda Ornellas, Thatiany Marinho, Francielle Graus e Sandra Barbosa, meu muito obrigada pela ajuda, pelo carinho e pela amizade! Com vocês do meu lado tudo se tornou mais fácil, leve e muito divertido,

A Aline Penna pelo suporte técnico ao final deste trabalho. Muito obrigada,

A querida amiga guria Roberta Hack, que sempre esteve disposta a esclarecer minhas dúvidas e sempre presente, mesmo online.

Aos amigos Hélder Gonçalves, Flávia Fernandes, Verônica Aiceles e Fernanda Cavalcante, pelo dia-dia, pela companhia, pelos cafés com leite e pelos sorrisos.

Ao Prof. Ms. Afonso Aragão por ser um pai acadêmico norteando meu caminhar desde a Faculdade de Educação Física - UERJ. Todo meu orgulho em ser sua aluna desde 2001 e toda a minha admiração pela pessoa e pelo profissional que você é. Fonte de exemplo.

Ao Prof. Dr. Luciano Favorito pelos momentos em que dividimos as turmas de Anatomia para Medicina da Uerj. Muito aprendizado.

A minha amiga Paula Abreu pelo incentivo e pela parceria desde a Faculdade de Educação Física.

Aos amigos que não estão mais presentes no LMMC, mas me ensinaram as rotinas do laboratório e fazem parte, não somente desta história, mas da minha vida: Leonardo Mendonça, Mariana Catta-Preta, Bianca Gregório, Fernanda Amorim, Thiago Torres e Caroline Fernandes. Se cheguei até aqui foi por subir em ombros de gigantes, vocês! Meu eterno carinho, admiração e amizade! Muito obrigada por tudo!

A minha nova casa, a Força Aérea Brasileira! A minha nova família, a Comissão de Desportos da Aeronáutica – CDA. Ao Vice-Presidente da CDA, Coronel Márcio Ronaldo Rocha. Aos meus chefes da Divisão de Educação Física Militar (DEFM): Major M. Augusto e Tenente Sá, por acreditar em mim, pela compreensão e ajuda nos momentos de pane. A minha amiga e parceira de seção, Viviane Tauil, pelo trabalho em conjunto e por todo suporte quando não pude estar presente. Aos demais companheiros de divisão pelos ensinamentos e cumplicidade: Tenente Kin, Valim, Garrot, Ébener e Sant'anna, Sargento Marcello, Suboficial Delanei e Joelson. As demais Águias que voam ao meu lado: Tenente Júlio, meu amigo-irmão de todas as dificuldades Niteroienses, Natália, Rosas, Gavinho, Janaína, Raquel, Shirleyde e Paulo Sérgio. Seguiremos marchando juntos por muitos anos! Muito obrigada pela amizade, pelo espírito de corpo, pela superação de cada dia e pela certeza de que a maior força está dentro de nós mesmos e que nada é impossível.

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas... Que já têm a forma do nosso corpo... E esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares ...É o tempo da travessia... E se não ousarmos fazê-la... Teremos ficado... para sempre...À margem de nós mesmos...

Fernando Pessoa

RESUMO

MOREIRA, Alini Schultz. *Dietas ricas em gordura, frutose e sacarose:* alterações no fígado*.* 2014. 76 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Hábitos inadequados no estilo de vida, pelo consumo exacerbado de dietas ricas em gorduras e açúcares (frutose e sacarose), correlacionam-se positivamente com o desenvolvimento da obesidade, da resistência à insulina (RI) e da esteatose hepática não alcoólica (NAFLD). O estudo teve como objetivo avaliar a magnitude dos efeitos da administração crônica de dietas ricas em gordura e/ou frutose, e ainda, comparar os efeitos dos açúcares isoladamente (frutose e sacarose) sob as alterações bioquímicas, o perfil inflamatório, as respostas morfofuncionais e as expressões proteicas e gênicas de fatores de transcrição envolvidos na lipogênese, na beta-oxidação, na gliconeogênese e no estresse oxidativo no fígado. Camundongos machos C57BL/6 foram divididos em dois experimentos: 1) Dieta controle/standard chow (SC), dieta high fat (HF – 42%), dieta high frutose (HFr – 34%) e dieta high fat + high frutose (HFHFr - 42% fat + 34% frutose) por 16 semanas; 2) Dieta controle/standard chow (SC), dieta high frutose (HFru – 50%) e dieta high sacarose (HSu – 50%) por 15 semanas. Ao final dos experimentos foram observados: 1) Não houve diferença na massa corporal entre os animais HFr e SC, só foi observado ganho de peso nos grupos HF e HFHFr. Houve ainda aumento do colesterol total, dos triglicerídeos plasmáticos e hepáticos e RI nos grupos HF, HFr e HFHFr. No fígado, foi observado NAFLD com aumento na expressão de SREBP-1c e PPAR-γ, e redução de PPAR-α. A gliconeogênese mediada pelo GLUT-2 e PEPCK também foi aumentada nos grupos HF, HFr e HFHFr em relação ao grupo SC. Áreas de necroinflamação também foram observadas nos animais HFr e HFHFr; 2) Não houve diferença na massa corporal entre os grupos SC, HFru e HSu. Porém, houve aumento do colesterol total, dos triglicerídeos plasmáticos e hepáticos, da RI, das adipocinas (IL-6, resistina, MCP-1 e leptina), e redução da adiponectina. No fígado, abundante NAFLD com predominância da expressão proteica e gênica de SREBP-1c, PPAR-γ e redução de PPAR-α; e desequilíbrio antioxidante com redução da SOD, da Catalase e da GRx nos grupos HFru e HSu quando comparados ao SC. Não houve diferença na GPx entre os três grupos. Ainda foi observado aumento na expressão proteica de G6Pase, PEPCK e GLUT-2, envolvidos na gliconeogênese hepática nos grupos HFru e HSu. Áreas de necroinflamação, característico da transição NAFLD-NASH, também foram observados. Os resultados permitem concluir que, independente do aumento da massa corporal, a administração crônica de dietas ricas em frutose e sacarose tem efeitos similares aos observados com o consumo de dieta hiperlipídica. Parece que a RI e a NAFLD sejam os precursores destas alterações

Palavras-chaves: Dieta hiperlipídica. Frutose. Sacarose. Resistência à insulina. Esteatose hepática não alcoólica.

ABSTRACT

MOREIRA, Alini Schultz. *Diets high in fat, fructose and sucrose:* changes in liver. 2014. 76 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Habits unsuitable lifestyle, exacerbated by consumption of diets rich in fat and sugars (sucrose and fructose) are positively correlated with the development of obesity, insulin resistance (IR) and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). The study aimed to evaluate the magnitude of the effects of chronic administration of diets rich in fat and/or fructose, and also compare the effects of sugars alone (fructose and sucrose) in the biochemical changes, the inflammatory profile, and the morphological and functional responses the protein and gene expression of transcription factors involved in lipogenesis, beta-oxidation, gluconeogenesis and oxidative stress in the liver. Male C57BL / 6 mice were divided into two experiments: 1) Diet control/standard chow (SC), high fat diet (HF - 42%), high-fructose diet (HFr - 34%) and high fat + high fructose diet (HFHFr - 42% fat + 34% fructose) for 16 weeks; 2) Diet control/standard chow (SC), high-fructose diet (HFru - 50%) and high sucrose diet (HSu - 50%) for 15 weeks. At the end of the experiments were observed: 1) There was no difference in body mass between HFr and SC groups, only weight gain was observed in the HF group and HFHFr. There was also an increase in total cholesterol, plasma and hepatic triglycerides and IR in HF, HFr, HFHFr groups. In the liver, NAFLD was observed with increased expression of SREBP-1c, PPAR-γ and PPAR-α reduction. The gluconeogenesis mediated by GLUT-2 and PEPCK was also increased in HF, HFr and HFHFr groups compared to SC. Areas of necroinflammation were also observed in HFr and HFHFr; 2) There was no difference in body mass between the SC, HFru and HSu groups. However, there was an increase in total cholesterol, plasma and hepatic triglycerides, IR, adipokines (IL-6, resistin, leptin and MCP-1), and decreased of adiponectin. In the liver, abundant NAFLD with prevalence of protein and gene expression of SREBP-1c, PPAR-γ and PPAR-α reduction; and antioxidant imbalance with reduction of SOD, catalase and GRx in HFru and HSu groups when compared to SC. There was no difference in GPx between the three groups. Further increase in protein expression of G6Pase, PEPCK and GLUT-2, involved in hepatic gluconeogenesis in HFru and HSu groups was noted. Inflammatory infiltrate characteristic of transition NAFLD-NASH were also observed. The results indicate that, regardless of the increase in body mass, chronic administration of diets rich in fructose and sucrose have similar effects to those observed with the consumption of high-fat diet. It seems that IR and NAFLD are the forerunners of these changes

Keywords: High fat diet. Fructose. Sucrose. Insulin Resistance. Nonalcoholic fatty liver disease

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A influência da gordura/tecido adiposo e da secreção das citocinas inflamatórias no desenvolvimento da NAFLD, da RI, da dislipidemia aterogênica, da hipertensão e da disfunção vascular.... 22

Figura 2 – Efeitos da frutose em órgãos-alvo e o desenvolvimento da síndrome metabólica..... 25

Figura 3 – Classificação dos carboidratos e seus principais efeitos pós-prandiais..... 26

Figura 4 – Metabolismo da frutose e da glicose no fígado..... 28

Figura 5 – Metabolismo da frutose no fígado e suas vias de atuação..... 31

Figura 6 – Mecanismos de transição da NAFLD para NASH..... 33

Figura 7 – Reação de Fenton e Haber-Weiss..... 36

Figura 8 – Ação das enzimas antioxidantes..... 37

Figura 9 – Gráfico de evolução da massa corporal (experimento 1)..... 51

Figura 10 – Densidade de volume de esteatose hepática e frequência de binucleação..... 54

Figura 11 – Expressão proteica dos fatores de transcrição lipogênicos, oxidativos e glicolíticos..... 55

Figura 12 – Razão lipogênese e beta-oxidação..... 56

Figura 13 – Gráfico de evolução da massa corporal (experimento 2)..... 57

Figura 14 – Imagens do fígado *in situ*..... 60

Figura 15 – Densidade de volume de esteatose hepática..... 61

Figura 16 – Expressão proteica de fatores de transcrição lipogênicos, oxidativos e glicolíticos..... 62

Figura 17 – Expressão proteica das enzimas antioxidantes..... 63

Figura 18 – Expressão gênica dos fatores de transcrição envolvidos na lipogênese, na beta-oxidação e na defesa antioxidante..... 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição nutricional das dietas (experimento 1)..... 40
Tabela 2 – Composição nutricional das dietas (experimento 2)..... 45
Tabela 3 – RT-qPCR primers e respectivas sequências (experimento 2)..... 48
Tabela 4 – Ingestão alimentar e respostas bioquímicas (experimento 1)..... 53
Tabela 5 – Ingestão alimentar e energética (experimento 2)..... 58
Tabela 6 – Respostas bioquímicas (experimento 2)..... 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	*acetyl-CoA carboxylase*
ACC1	*acetyl-CoA carboxylase-1*
ACC2	*acetyl-CoA carboxylase-2*
ACL	*ATP-citrate lyase*
AHA	*American Heart Association*
ALT	alanina aminotransferase
apoB	apolipoprotína B
AST	aspartato aminotransferase
ChREBP	*carbohydrate responsive element-binding protein*
CPT1	carnitine palmitoyl transferase 1
DM2	diabetes mellitus tipo 2
DNL	*de novo lipogenesis*
ERN	espécies reativas de nitrogênio
EROS	espécies reativas de oxigênio
E-selectin	selectina tipo E (células endoteliais)
FAS	*fatty acid synthase*
FFA	*free fatty acid*
GLUT-2	transportador de glicose tipo 2
GLUT-4	transportador de glicose tipo 4
GLUT-5	transportador de glicose/frutose tipo 5
GPx	glutationa Peroxidase
GRx	glutationa Redutase
GSH	glutationa reduzida
GSTs	glutationa S-transferase
G6Pase	glicose 6-fosfatase
HFCS	*high fructose corn syrup*
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IL-6	interleucina 6
IRS-1	substrato do receptor de insulina 1
IRS-2	substrato do receptor de insulina 2
LDL	lipoproteína de baixa densidade

L-PK piruvato quinase

MAPK via da proteína quinase ativada por mitógenos

MCP-1 proteína quimiotática de monócitos 1

MDA malondialdeído

MKK7 proteína quinase ativada por mitógenos 7

MAPK8 proteína quinase ativada por mitógenos 8

NAFLD esteatose hepática não alcoólica – *Nonalcoholic fatty liver disease*

NASH esteatohepatite não alcoólica – *Nonalcoholic steatohepatitis*

ON óxido Nítrico

PEPCK fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PPAR-α receptor ativador de proliferação peroxissomal alfa

PPAR-γ receptor ativador de proliferação peroxissomal gama

P-selectin selectina tipo P (plaquetas)

RI resistência à insulina

SOD superóxido dismutase

SREBP-1c *steroyl regulatory element binding proteins*

TNF-α fator de necrose tumoral alfa

VLDL lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	16
1	**REVISÃO DA LITERATURA**.....	18
1.1	**Epidemiologia**.....	18
1.2	**Consumo crônico de dietas e seus efeitos**.....	20
1.2.1	Dietas ricas em gordura.....	20
1.2.2	Dietas ricas em frutose.....	23
1.2.3	Dietas ricas em sacarose.....	26
1.3	**Esteatose hepática não alcoólica (NAFLD) e Esteatohepatite não alcoólica (NASH)**.....	28
1.4	**Estresse oxidativo**.....	35
2	**OBJETIVOS**.....	38
2.1	**Gerais**.....	38
2.2	**Específicos**.....	38
3	**MATERIAL E MÉTODOS**.....	39
3.1	**Experimento 1**.....	39
3.1.1	Animais e dietas.....	39
3.1.2	Massa corporal e ingestão alimentar.....	40
3.1.3	Teste oral de tolerância à glicose e Teste intraperitoneal de tolerância à insulina.....	41
3.1.4	Eutanásia.....	41
3.1.5	Análises plasmáticas.....	41
3.1.6	Fígado.....	42
3.1.7	Western blotting.....	42
3.1.8	Análise estatística.....	43
3.2	**Experimento 2**.....	44
3.2.1	Animais e dietas.....	44
3.2.2	Massa corporal e ingestão alimentar.....	45
3.2.3	Eutanásia.....	45
3.2.4	Análises plasmáticas.....	46
3.2.5	Fígado.....	46
3.2.6	Western blotting.....	46

3.2.7 RT-PCR quantitativo..... 47
3.2.8 Análise estatística..... 49
4 **RESULTADOS**..... 50
4.1 **Experimento 1**..... 50
4.1.1 Massa corporal e ingestão alimentar..... 50
4.1.2 TOTG, TITI e insulina..... 51
4.1.3 Colesterol, triglicerídeo e glicose..... 52
4.1.4 Fígado..... 52
4.2 **Experimento 2**..... 57
4.2.1 Massa corporal e ingestão alimentar..... 57
4.2.2 Respostas bioquímicas..... 58
4.2.3 Fígado..... 60
4.2.4 Expressão proteica e gênica no fígado..... 61
5 **DISCUSSÃO**..... 65
CONCLUSÃO..... 70
REFERÊNCIAS..... 71

INTRODUÇÃO

O alto consumo de dietas ricas em gordura e açucares simples são precursores de uma série de condições clínicas de causas múltiplas e associativas como a obesidade, o diabetes mellitus tipo II (DM2), a resistência à insulina (RI), a hipertensão arterial e a esteatose hepática não alcoólica (NAFLD – *nonalcoholic fatty liver disease* (Fried e Rao, 2003; Fraulob *et al.*, 2010; Basaranoglu *et al.*, 2013).

Dados epidemiológicos mostram o aumento da ingestão de açucares em 400-500Kcal/dia/pessoa em quase todo mundo (Lustig *et al.*, 2012). O consumo de dieta hiperlipídica não é muito diferente. No ano de 2008, o número de adultos com o índice de massa corporal (IMC) maior que 30kg/m^2 é de 507 milhões em todo mundo (Scully, 2014). A falta de tempo do mundo moderno e o sedentarismo fecham o ciclo vicioso que culmina com o aumento dos fatores de risco cardiovascular.

Muito já foi descrito sobre os efeitos do consumo crônico de uma dieta rica em gordura sobre o metabolismo e as estratégias terapêuticas para minimizar o dano (Souza-Mello *et al.*, 2010; Bringhenti *et al.*, 2011; Fraulob *et al.*, 2012). O foco no controle da gordura alimentar, principalmente a gordura saturada, está diretamente associada ao aumento dos triglicerídeos e LDL e o risco coronariano acentuado. No entanto, os estudos investigando os açucares simples, frutose e sacarose, emergem como o “doce vilão” (Lustig *et al.*, 2012; Rippe e Angelopoulos, 2013).

Frutose é um monossacarídeo encontrado de forma abundante em frutas, utilizado de forma industrial como açúcar de adição em bebidas adocicadas, sucos e refrigerantes e, ainda, sob a forma de xarope de milho rico em frutose. Seu alto poder de adocicar e o baixo custo comercial tornam-se atrativos para a utilização em larga escala (Rumessen, 1992; Hanover e White, 1993). Pesquisas mostram que, aparentemente, a frutose é mais agressiva por desenvolver, seja a curto ou a longo prazo, inflamação sistêmica, dislipidemia, RI, NAFLD, disfunção endotelial e hipertensão arterial (Wiernsperger et al., 2010).

A sacarose, também conhecida como açúcar de mesa, é um dissacarídeo formado pela combinação de um monômero de glicose a um monômero de frutose. Alguns estudos sugerem que dietas ricas em açúcares simples apresentam uma alta carga glicêmica sendo uma das principais causas de obesidade e distúrbios metabólicos em humanos (Brand-Miller et al., 2002; Schulze e Hu, 2004).

Em função destes achados, estudos recentes têm se preocupado com o consumo de frutose. Indiretamente, estes estudos podem ter implicações para a sacarose, visto que é um dos possíveis veículos do consumo de frutose em todo o mundo. As conclusões destes estudos têm sido controversas. A ingestão elevada de frutose tem sido considerada no aumento da adiposidade visceral, desregulação do metabolismo de lipídios e RI (Stanhope e Havel, 2010), efeitos semelhantes aos observados com o consumo de sacarose (Stanhope et al., 2009). De forma isolada, a frutose, aparentemente, não leva a efeitos adversos (Livesey, 2009), mas, quando consumida em excesso, se tornando hipercalórica, estes podem ocorrer (Tappy et al., 2010). A dose-resposta, o percentual de frutose e/ou sacarose, e o tempo de administração da dieta parecem ser os pontos divergentes neste contexto (Livesey, 2009). Entretanto, se dietas isoenergéticas, ricas em frutose e sacarose provocam consequências para a saúde ainda é incerto.

Assim sendo, o presente estudo tem por objetivo investigar a magnitude dos efeitos do consumo de uma dieta rica em gordura e/ou frutose e ainda, avaliar a toxicidade da frutose e da sacarose, de forma isoenergética, sobre as alterações metabólicas e hepáticas.

1 **REVISAO DA LITERATURA**

1.1 **Epidemiologia**

A obesidade, epidemia do século XXI, representa um grave problema de saúde pública. Dados epidemiológicos mostram que quase meio bilhão da população mundial apresenta sobrepeso e esse indicador aumenta entre crianças e adolescentes (Rossner, 2002). O consumo aumentado de alimentos ricos em gorduras reflete uma das possíveis causas da obesidade em todo mundo. Projeções para 2030 apontam que serão 2,16 bilhões de indivíduos com sobrepeso (38%) e 1,12 bilhões de obesos (20%) da população adulta mundial (Kelly et al., 2008).

Nos últimos anos, o consumo de frutose da população mundial aumentou em cerca de 250% principalmente em países desenvolvidos (Basciano et al., 2005). Embora praticamente ausente na nossa dieta algumas centenas de anos atrás, atualmente representa um importante componente da dieta moderna encontrada, principalmente, em produtos industrializados como refrigerantes e xarope de milho rico em frutose (HFCS – high fructose corn syrup), este último presente em sucos prontos, cereais matinais e até leite destinado às crianças (Bray et al., 2004).

Dados do American Heart Association (AHA) mostram que os americanos estão consumindo cerca de 22 colheres de chá de açúcar por dia. Jovens adolescentes entre 14 e 18 anos de idade consomem, surpreendentemente, 34 colheres de chá por dia de açúcar. A maior parte do açúcar ingerido está sob a forma de frutose, proveniente de refrigerantes e doces, o que representa um acréscimo de 355 calorias diárias (Johnson et al., 2009b). Aliada ao sedentarismo, o excesso de calorias ingeridas constitui um importante pilar no desenvolvimento da obesidade e da síndrome metabólica. Estima-se que 24% dos adultos dos Estados Unidos preenchem os critérios para diagnóstico da síndrome metabólica (Ford et al., 2002). Ou seja, possuem 3 ou mais dos fatores de risco apresentados abaixo, de acordo com o AHA (Grundy et al., 2004):

- Obesidade central - circunferência da cintura ≥ a 88 cm na mulher e ≥ 102 cm no homem;
- Hipertensão Arterial - pressão arterial sistólica ≥ 130 e/ou pressão arterial diastólica ≥ 85 mmHg;

- Glicemia alterada (glicemia ≥110 mg/dl) ou diagnóstico de Diabetes (em laboratórios de análises plasmáticas já considera-se 99mg/dl como valor de corte);
- Triglicerídeos ≥150 mg/dl;
- HDL colesterol ≤ 40 mg/dl em homens e ≤50 mg/dl em mulheres.

Em 2013 o México entrou numa campanha contra obesidade e aponta a Coca-Cola como a principal vilã. O anúncio: “Você comeria 12 colheres de açúcar? Por que você bebe refrigerante? se espalhou pela Cidade do México afim de combater o consumo excessivo de refrigerantes, principalmente a Coca-Cola. Segundo relatório das Organizações das Nações Unidas (ONU), divulgadas no Jornal Daily Mail, o México é o país com mais obesos no mundo, com 32,8%, ultrapassando os Estados Unidos, que aparecem logo atrás. Ainda segundo o relatório, 70% dos mexicanos encontram-se com sobrepeso e 1/3 já é obeso, o que se tornou um grave problema de saúde pública.

Ainda em matéria divulgada no Daily Mail, em 2011, intitulada: “*The rotten truth: Why 'fruit sugar' is one of the most damaging ingredients in our food*” (a verdade podre: por que o açúcar da fruta é um dos ingredientes mais prejudiciais na nossa alimentação) diz que apenas 2 refrigerantes por dia são suficientes para danificar os rins. Segundo a fonte, mais de 8000 indivíduos da Universidade de Osaka participaram da pesquisa. Um grupo não ingeriu a bebida, um segundo grupo tomou 1x/dia e o terceiro grupo tomou 2x/dia refrigerantes. No intervalo de 3 dias, 10,7% do terceiro grupo desenvolveram proteinúria e 8,9% do segundo grupo apresentaram efeitos similares. Proteinúria é um dos indicadores de alterações na função renal e é marcada pelo aumento da excreção de proteína na urina. Pesquisadores da Case Western Reserve University, em Cleveland, perceberam que a frutose aumenta a sensibilidade dos rins à angiotensina, proteína que regula o equilíbrio do sal. Isso significa que o sal é reabsorvido nos rins, o que pode conduzir doenças como diabetes, obesidade, insuficiência renal e hipertensão.

Esses achados mostram a relevância acerca do assunto proposto e a importância em compreender os efeitos da ingestão crônica das dietas ricas em gordura, frutose e sacarose.

1.2 **Consumo crônico de dietas e seus efeitos**

1.2.1 Dietas ricas em gordura

Não há dúvidas que a obesidade é uma epidemia mundial e vem se tornando a força motriz responsável pelo aumento da prevalência da doença cardiovascular associadas à hipertensão arterial, dislipidemia, DM2 e até mesmo câncer (Poirier et al., 2006). A interação de fatores genéticos e ambientais, sobretudo em relação aos hábitos nutricionais, aliados ao estilo de vida sedentário, tem impacto positivo no desenvolvimento da obesidade.

O Estudos mostram que um longo período de administração de dietas contendo cerca de 40% a 60% de lipídios promove alterações metabólicas, aumenta a produção de citocinas inflamatórias, induz a RI, hipertensão e obesidade, em modelos animais e em humanos obesos (Walker *et al.*, 2007; Flanagan *et al.*, 2008), além de hipertrofia de adipócitos (Barbosa-da-Silva *et al.*, 2012), diabetes mellitus, hipertrigliceridemia (Fernandes-Santos *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 2010), e ainda, esteatose hepática e pancreática em animais (Fraulob *et al.*, 2010; Barbosa-da-Silva *et al.*, 2013).

Os lipídios representam a maior fonte energética, sendo 9 kcal por grama de gordura contra 4 kcal por grama de carboidrato ou proteína. A maior parte da gordura ingerida através da dieta está sob a forma de triglicerídeos e colesterol. Estes desempenham funções importantes no metabolismo como: constituintes de membrana, isolante térmico e fornecimento de energia potencial para o trabalho biológico (M.M, 2002). Os triglicerídeos serão estocados, principalmente, no tecido adiposo bem como em outros órgão-alvo como o fígado, o tecido muscular e o pâncreas (Schultz *et al.*, 2012).O tecido adiposo não é apenas um reservatório de gordura utilizado como substrato energético, mas um órgão extremamente ativo do ponto de vista metabólico e secretório, liberando para a circulação sistêmica grande número de peptídeos ativos e citocinas (Despres e Lemieux, 2006).

A leptina (do grego *leptos*-magro) é uma proteína codificada pelo gene ob, descoberta no ano de 1994 em camundongos obesos (ob/ob) por Zhang e colaboradores (Zhang *et al.*, 1994). A leptina produzida pelo tecido adiposo, em proporção a quantidade de gordura estocada, contribui para a regulação da massa corporal em longo prazo por reduzir a ingestão alimentar e aumentar o gasto energético(Ahima e Flier, 2000). Porém, sabe-se que indivíduos obesos apresentam

resistência à leptina, ou seja, resistência a ação esperada pela leptina(Meier e Gressner, 2004).

A adiponectina foi descoberta em meados dos anos 1990 demonstrando importante efeitos sobre o metabolismo (Scherer *et al.*, 1995). Diferente das demais adipocinas secretadas pelo tecido adiposo, a concentração ou a expressão de adiponectina reduz conforme aumento da adiposidade e a presença da RI. A ela ainda é atribuído efeitos anti-aterogênicos, de inibir a adesão de monócitos ao endotélio vascular, a transformação de macrófagos em *foam cells* e a expressão de moléculas de adesão, suprimindo, inclusive, a expressão de TNF-α (fator ne necrose tumoral alfa) induzida por essas moléculas de adesão(Spranger *et al.*, 2003; Goldstein e Scalia, 2004).Os efeitos benéficos da adiponectina sob a sensibilidade à insulina está relacionada a ativação da enzima adenina monofosfato quinase que, por sua vez, aumenta a oxidação das gorduras no músculo esquelético. No fígado, a adiponectina também ativa esta enzima, resultando na redução da produção de glicose hepática (Yamauchi *et al.*, 2002).

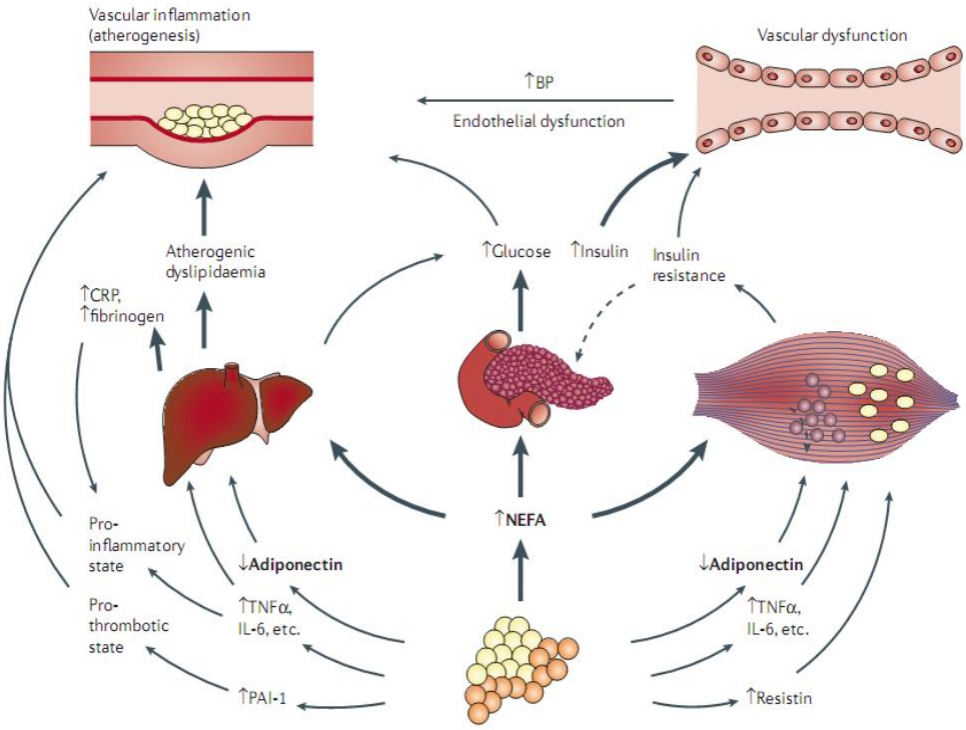
A MCP-1, proteína quimiotática de monócitos, induz a ativação e a infiltração de macrófagos no tecido adiposo. Sua superexpressão correlaciona-se com RI induzida por dieta e NAFLD (Kamei *et al.*, 2006; Kanda *et al.*, 2006).

Os macrófagos são fonte de produção de citocinas inflamatórias, tais como: TNF-α e IL-6 (interleucina-6). Estas citocinas, TNF-α, IL-6, MCP-1, mediadores do processo de coagulação, como inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1), exercem papel importante na interface entre sistema imune e metabólico (Tilg e Moschen, 2006).

A dislipidemia associada à obesidade e ao consumo de dieta hiperlipídica possui causas múltiplas e frequentemente relacionado com a doença cardiovascular, aterosclerose e diagnóstico da SM. As principais características incluem triglicerídeos elevados, diminuição de HDL-C e aumento de LDL-C, sob influência da redução da sensibilidade à insulina e da alteração no metabolismo dos ácidos graxos (Bays *et al.*, 2005).

O consumo de alimentos ricos em gordura continuadamente leva à dislipidemia, ao acúmulo de tecido adiposo visceral e aos estoques de gordura em tecidos-alvo, principalmente o fígado. A adiposidade e a produção das adipocinas pro-inflamatórias parecem ser o link entre a obesidade e a RI (Figura 1).

Figura 1- A influência do tecido adiposo e da secreção das citocinas inflamatórias no desenvolvimento da NAFLD, da RI, da dislipidemia aterogênica, da hipertensão e da disfunção vascular



Fonte: Grundy, 2006.

1.2.2 Dietas ricas em frutose

A frutose é um monossacarídeo também denominado de levulose, ou açúcar da fruta, é constituinte da sacarose (β-D-Frutofuranosil α-D-glicopiranosida) e de outros polímeros, como a inulina (Rumessen, 1992). A frutose ainda pode ser obtida a partir do sorbitol, essa reação é mediada pela enzima sorbitol-desidrogenase, presente em várias plantas, em particular das rosáceas (maças, peras, cerejas, ameixas e abricós); outras fontes são: balas, gomas de mascar e sucos dietéticos (Rumessen, 1992). Sob o ponto de vista comercial e industrial, apresenta algumas vantagens: tem o maior poder edulcorante de todos os açucares (ou seja, maior capacidade de adoçar), poder umectante (para manter a umidade em produtos industrializados), contribui no desenvolvimento da cor, aroma, na depressão do ponto de congelamento e estabilidade osmótica (Hanover e White, 1993). Este monossacarídeo pode ser encontrado, predominantemente, em frutas (maças, laranjas e melões) e sob a forma de xarope de milho rico em frutose (high fructose corn syrup – HFCS); também têm sido incorporados no preparo de frutas enlatadas, geleias, doces, pó para bebidas e refrigerantes, uma vez que é 1,5 - 1,7 vezes mais doce que a sacarose e seu custo reduzido devido à evolução no processo de obtenção (Hallfrisch, 1990; Hanover e White, 1993; Tappy e Le, 2010).

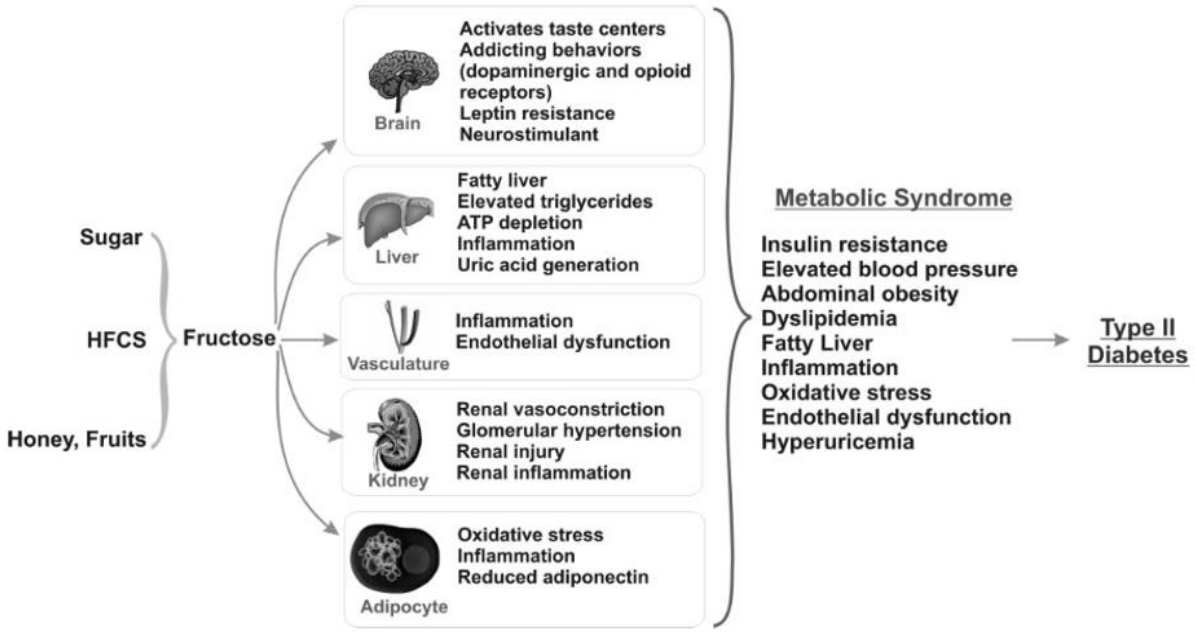
O HFCS é um adoçante produzido a partir da isomerização de parte da glicose existente no xarope de milho em frutose. Dessa forma é possível obter xaropes de milho com diferentes teores de frutose em sua composição: HFCS-90 (90% de frutose e 9% de glicose), HFCS-55 (55% de frutose e 42% de glicose), HFCS-42 (42% de frutose e 53% de glicose). O HFCS-90 é o principal produto destas reações químicas e é diluído em xarope de glicose para formar o HFCS-42 e o HFCS-55, o mais utilizado em produtos processados e bebidas como: refrigerantes, frutas para iogurtes e pães(Parker, 2010). A facilidade de manuseamento deste adoçante líquido e o seu baixo preço fizeram com que o seu uso aumentasse em comparação com o da sacarose (Hanover e White, 1993; Moeller *et al.*, 2009).

Assim sendo, a incorporação da frutose e/ou do HFCS nos produtos industrializados em larga escala, principalmente nos refrigerantes, trouxeram uma série de repercussões para a saúde, com efeitos em órgãos-alvo, e fez com que a comunidade científica voltasse sua atenção para estas consequências (Figura 2).

Após ajuste demográfico, de comorbidades associadas, níveis de atividade física, total de calorias ingeridas e contagem dos carboidratos, sal, álcool e vitamina C da dieta, foi verificado que indivíduos que consomem 74g/dia de frutose, o equivalente a 2,5 latas de refrigerante/dia, apresentam aumento da pressão arterial. Dados coletados no *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) entre 2003 e 2006 envolvendo 4528 adultos dos EUA sem histórico de hipertensão, observou-se que a ingestão de frutose é independente e significativamente associada com o aumento da pressão arterial em, respectivamente: 26%, 30% e 60% para níveis ≥135/85; ≥140/90; ≥160/100 mm/Hg (Jalal *et al.*, 2010).

O ácido úrico emerge como a ponte entre as alterações cardiovasculares e metabólicas, seja como causa ou consequência destas. A epidemia da SM correlaciona-se com a elevação dos níveis de ácido úrico a partir da ingestão de frutose. O ácido úrico inibe a biodisponibilidade de óxido nítrico e a insulina precisa de óxido nítrico para a captação de glicose. Assim sendo, a hiperuricemia está associada com a disfunção endotelial, com a RI, obesidade e SM (Nakagawa *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2013). Muitos autores não consideram o ácido úrico como fator de risco por estar atribuído em mais de 50% a função antioxidante no sangue, via xantina oxidase. Porém, seu aumento é um fator determinante para a formação de cálculos renais e de gota. E ainda, a síntese de ácidos graxos livres (ou triglicerídeos) na lipogênese hepática, aumenta a síntese de purina e acelera a produção de ácido úrico (de Oliveira e Burini, 2012). Ainda não há um consenso se o ácido úrico é um agente protetor ou fator de risco. Parece que a elevação aguda é um fator de proteção, ao passo que o aumento crônico está diretamente proporcional ao aumento do fator de risco cardiovascular.

Figura 2 - Efeitos da frutose em órgãos-alvo e o desenvolvimento da síndrome metabólica

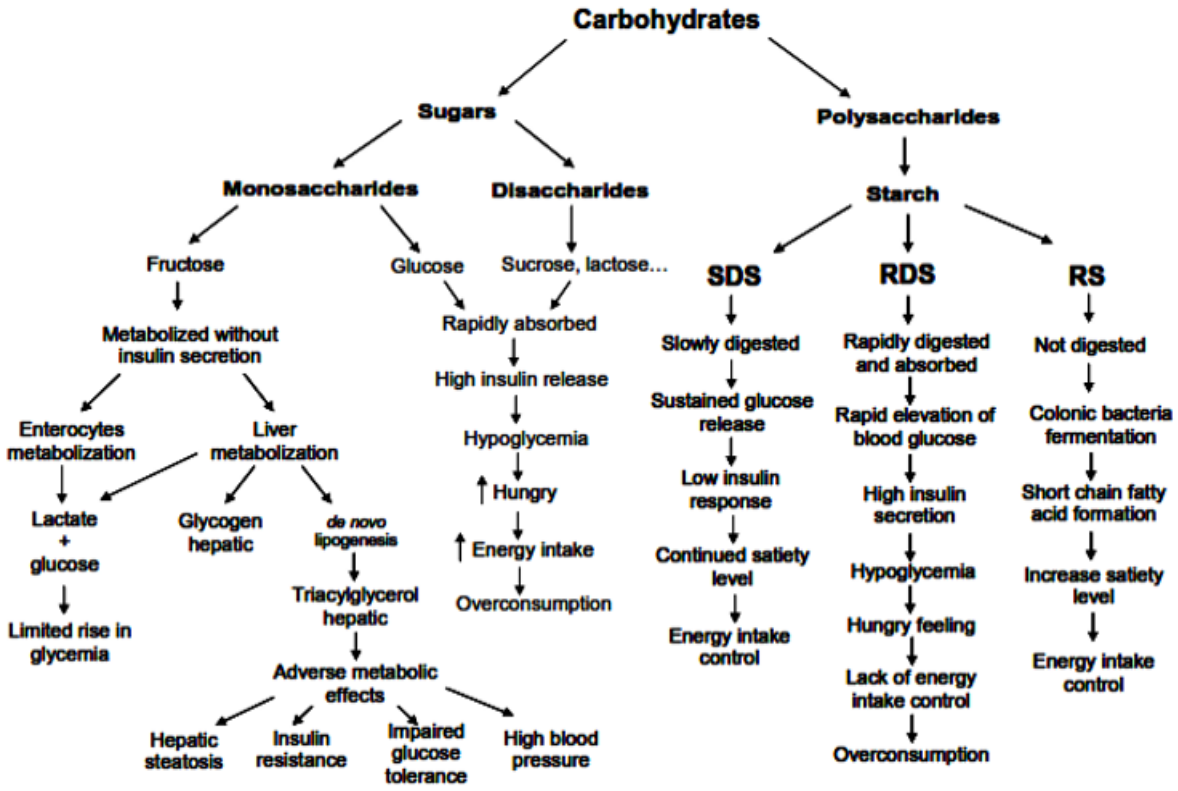


Fonte: Johnson *et al.*, 2009.

1.2.3 Dietas ricas em sacarose

Cerca de 55% a 75% do valor energético total da dieta humana é composta pela ingestão de carboidratos, ou hidratos de carbono, sendo assim a principal fonte de energia diária. Os carboidratos podem ser divididos em: monossacarídeos (como a frutose, a glicose e a galactose), dissacarídeos (como a sacarose, a lactose e a maltose) e polissacarídeos (como a celulose, o amido e o glicogênio) (Mahan LK, 2008) (Figura 3).

Figura 3- Classificação dos carboidratos e seus principais efeitos pós-pradiais



Legenda: *slowly digestible starch* (SDS); rapid digestible starch (RDS); resistant starch(RS)
Fonte: Aller et al., 2011.

A sacarose é um dissacarídeo formado por uma unidade de glicose adicionada a uma unidade de frutose e é conhecido como açúcar de mesa comum (Mahan LK, 2008). Açúcar de adição é definido como qualquer adoçante contendo a molécula de

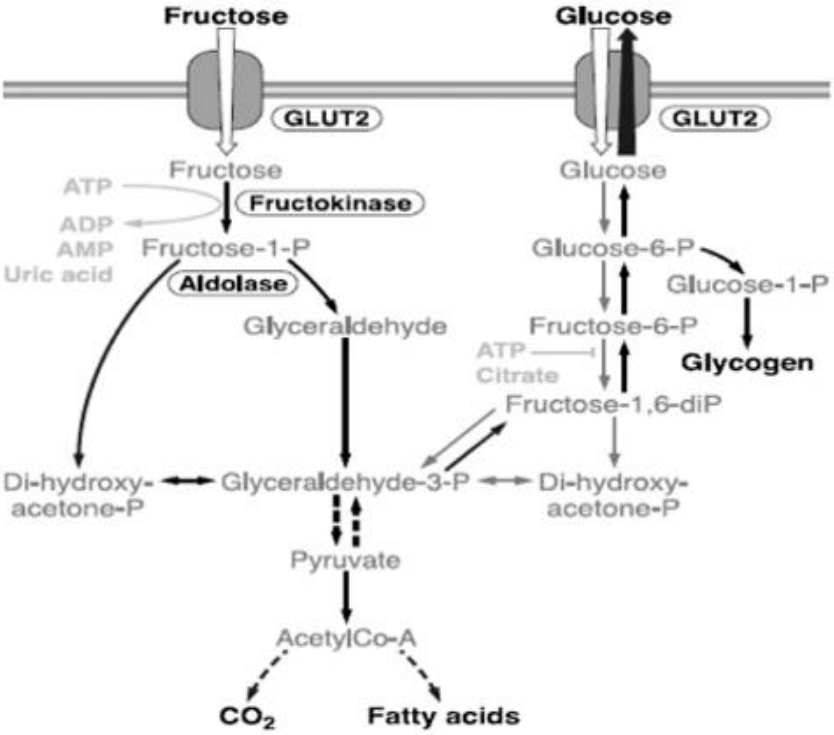
frutose, que é adicionado aos alimentos durante o processamento (Lustig et al., 2012).

A ingestão de sacarose tem crescido, principalmente pelo aumento no consumo de refrigerantes, cereais matinais, condimentos e sobremesas adoçadas com sacarose e xarope de milho (Elliott *et al.*, 2002). Dietas contendo alimentos ricos em carboidratos, que promovem elevada resposta glicêmica, alteram o apetite e a utilização da energia promovendo o ganho de peso. Elevada ingestão de carboidratos está geralmente associada com aumento no efeito glicêmico da dieta. Tanto a quantidade como a qualidade dos carboidratos influenciam a glicemia pós-prandial e a interação entre os dois pode ser sinergistas. Continuadamente, indivíduos que consomem alimentos com alto índice glicêmico podem apresentar hiperglicemia, hiperinsulinemia e até mesmo exaustão das células β-pancreáticas (produtoras de insulina) levando ao DM2 (Brand-Miller *et al.*, 2002). Quanto maior o índice ou a carga glicêmica, maior será a o pico glicêmico e o pico de insulina.

Tem sido demonstrado que dietas ricas em sacarose aumentam o apetite, causam hiperfagia e estabelecem uma relação de dependência com o açúcar. O mecanismo pelo qual isso acontece está relacionado a supressão do hormônio grelina, que sinaliza a sensação de fome para o cérebro e interfere na sinalização da leptina, que traduz a saciedade (Benton, 2010; Garber e Lustig, 2011).Comer chocolate, por exemplo, proporciona a sensação de bem estar por promover aumento da glicose no sangue que, por sua vez, aumenta os níveis de serotonina, porém pode haver uma queda rebote desta estimulando a vontade de ingerir açúcar novamente, estimulando.

Além de substrato energético como fonte de ATP, a glicose e a frutose podem ser convertidas a glicogênio ou gerar ácidos graxos livres (Rippe e Angelopoulos, 2013) (Figura 4). A hiperglicemia e a hiperinsulinemia como consequência do consumo de sacarose, regulam fatores de transcrição lipogênicos no fígado aumentando ainda mais a síntese de ácidos graxos livres (Oliveira *et al.*, 2014).

Figura 4- Metabolismo da frutose e da glicose no fígado



Nota: A produção de glicogênio e de ácidos graxos livres
Fonte: Rippe e Angelopoulos, 2013.

Diante do exposto, é possível considerar que a sacarose induz as complicações da SM com: RI, obesidade, hipertensão (pelo aumento do ácido úrico) e efeitos tóxicos sobre o fígado (NAFLD e NASH) semelhantes aos efeitos do álcool, tendo em vista que o álcool é derivado da fermentação do açúcar (Lustig et al., 2012).

1.3 **Esteatose hepática não alcoólica (NAFLD) e Esteatohepatite não alcoólica (NASH)**

Inicialmente a frutose é captada pelo enterócito via seu receptor GLUT5 e esse processo independe da ação da insulina e da hidrólise de ATP. Dentro do enterócito, parte da frutose é convertida em lactato e em seguida, é difundida nos vasos sanguíneos via GLUT2 pelo polo/membrana basolateral do enterócito e atinge o fígado através da veia porta hepática(Mayes, 1993). A entrada de frutose no hepatócito também é mediada pelo GLUT2 e rapidamente fosforilada a frutose-1P, a partir da frutoquinase. A frutose-1P é convertida em dihidroxiacetona-P e gliceraldeído-3P. Estas últimas terão diferentes destinos: 1) Podem participar da via

glicolítica fornecendo piruvato e liberando energia no ciclo de Krebs; 2) Uma parte das trioses-P produzidas podem ser convertidas à lactato (25%) e serem lançadas na corrente sanguínea; 3) Podem ser reduzidas até glicerol, necessárias para formação de lipídios, triacilgliceróis e fosfolipídios. Ou seja, uma parte dos átomos de carbono da frutose pode ser convertida a ácidos graxos livres no interior dos hepatócitos pelo processo da DNL (*de novo lipogenesis*); 4) Podem formar frutose 1,6-difosfato e, a partir daí, formar glicose (50%) e glicogênio (>15%) através da gliconeogênese, sendo esta a maior porção(Tappy e Le, 2010). A frutose-1P ainda ativa proteínas quinase (7-8) que, por sua vez, ativam proteínas da família MAPK (MKK7 e MAPK8) induzindo a fosforilação em serina do receptor de insulina (IRS-1) levando a resistência à insulina hepática (Figura 5)(Lim *et al.*, 2010).

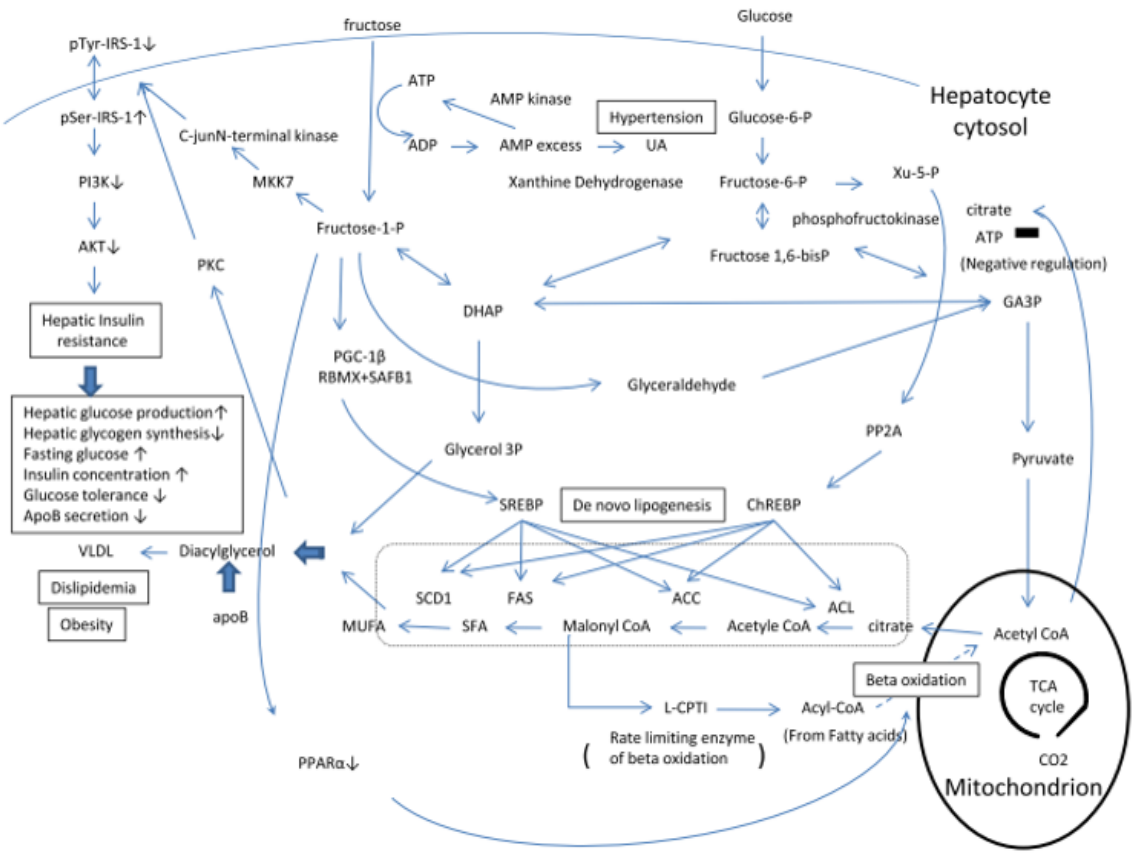
Um outro derivado fosforilado da frutose também é responsável pelo seu metabolismo, trata-se da frutose-2,6-difosfato. Esta última está presente em todos os tecidos dos mamíferos, exceto nos eritrócitos maduros, sendo o mais potente efetor da fosfofrutoquinase. A frutose-2,6 difosfato desempenha importante papel na regulação da glicólise e no controle da gliconeogênese nas células que possuem essa habilidade(Hallfrisch, 1990).

Sob o ponto de vista da síntese de gordura no fígado, a frutose inibe a oxidação de lipídios, favorecendo assim a re-esterificação dos ácidos graxos com o glicerol para formar triglicerídeos e VLDL. Apesar de ser quantitativamente menor a porção de frutose convertida a ácidos graxos, a ingestão de forma excessiva e/ou crônica contribui para o desenvolvimento da esteatose hepática não alcoólica (NAFLD). O mecanismo pelo qual a frutose está associada com a dislipidemia e a NAFLD é através do aumento da DNL(Lim *et al.*, 2010). A contínua produção de acetil co-A do metabolismo da frutose excede a capacidade de resposta mitocondrial (ciclo de Krebs) e é convertida a citrato, que sai do citosol e é substrato para DNL. A acetil Co-A ainda forma malonil-CoA (reação mediada pela ACC1 – acetil-CoA carboxilase) que, por sua vez, inibe a ação da carnitina palmitol transferase (CPT-1) diminuindo a entrada de ácidos graxos na mitocôndria para oxidação(McGarry, 1995). Por outro lado, a frutose de forma direta ou indireta, ativa os fatores de transcrição (SREBP-1c e ChREBP) responsáveis pela ativação de genes que codificam enzimas da DNL (ACL, ACC e FAS) levando a produção de VLDL e triglicerídeos. Todos esses fatores combinados culminam com o estoque de gordura, sob a forma de macro e

microvesículas nos hepatócitos, característicos da NAFLD (Figura 5)(Lim *et al.*, 2010).

Figura 5: Metabolismo da frutose no fígado e suas vias de atuação. A frutose é convertida em frutose-1 fosfato pela frutoquinase e posteriormente em fosfatase de trioses para entrar na via glicolítica, que serve como uma fonte reguladora de glicerol-3 fosfato e acetil-CoA, levando a de novo lipogenesis (DNL). A DNL é ativada pela expressão proteica e gênica de SREBP-1c e ChREBP, que, por sua vez, aumentam a expressão de ACC, FAS e SCD-1. Finalmente, os ácidos graxos livres são convertidos a triglicerídeos por esterificação e partículas de VLDL são formadas pela incorporação dos triglicerídeos em apoB. A frutose induz a RI. A frutose-1 fosfato induz a fosforilação do IRS-1 em serina e reduz a fosforilação do mesmo em tirosina, comprometendo a via de sinalização da insulina PI3K/AKT. A RI conduz ao aumento da produção hepática de glicose, aumento das concentrações de insulina, aumento da intolerância à glicose e aumento da secreção de apoB. A frutose ainda induz a hiperuricemia e causa hipertensão através da inibição de ON endotelial. Abreviatura: ATP, adenosina-5'-trifosfato; ADP, adenosina 5 '-difosfato; frutose-1-p, a frutose-1-fosfato; DHAP, fosfato de dihidroxiacetona; GA3p, gliceraldeído-3-fosfato; Xu-5-P, xilulose 5-P; PP2A, proteína fosfatase 2A; TCA, ácido tricarboxílico; ChREBP, proteína ligadora dos elemento regulados porcarboidratos; SREBP-1c, proteína ligadora dos elemento regulados poresteróis 1c; PCG-1β, receptor ativado por proliferadores de peroxissoma coativator 1β; SAFB1, scaffold attachment factorB1; RBMX, an X-chromosome-linked RNA binding motif protein; ACL, ATP citrato liase; ACC, acetil-CoA carboxilase; FAS, síntese de ácido graxo; SCD-1, estearol coenzima-A dessaturase-1; SFA, ácidos graxos saturados; MUFA, ácidos graxos monoinsaturados; L-CPT1, fígado carnitina palmitoltransferase I; apo B, a apolipoproteína B-100; PKC, nova proteína-quinase C; PPAR α, receptor ativado por proliferadores de peroxissoma; MKK7, proteína quinase quinase ativada por mitógeno 7; Pser-IRS-1,fosforilação em serina do IRS-1; pThy-IRS-1, fosforilação em tirosina do IRS-1; IRS-1, substrato-1 do receptor da insulina; PI3K, fosfatidilinositol-3-quinase. *ApoB é uma apolipoproteína primária da lipoproteína de baixa densidade (LDL).

Figura 5 - Metabolismo da frutose no fígado e suas vias de atuação



Fonte: Nomura e Yamanouchi, 2012.

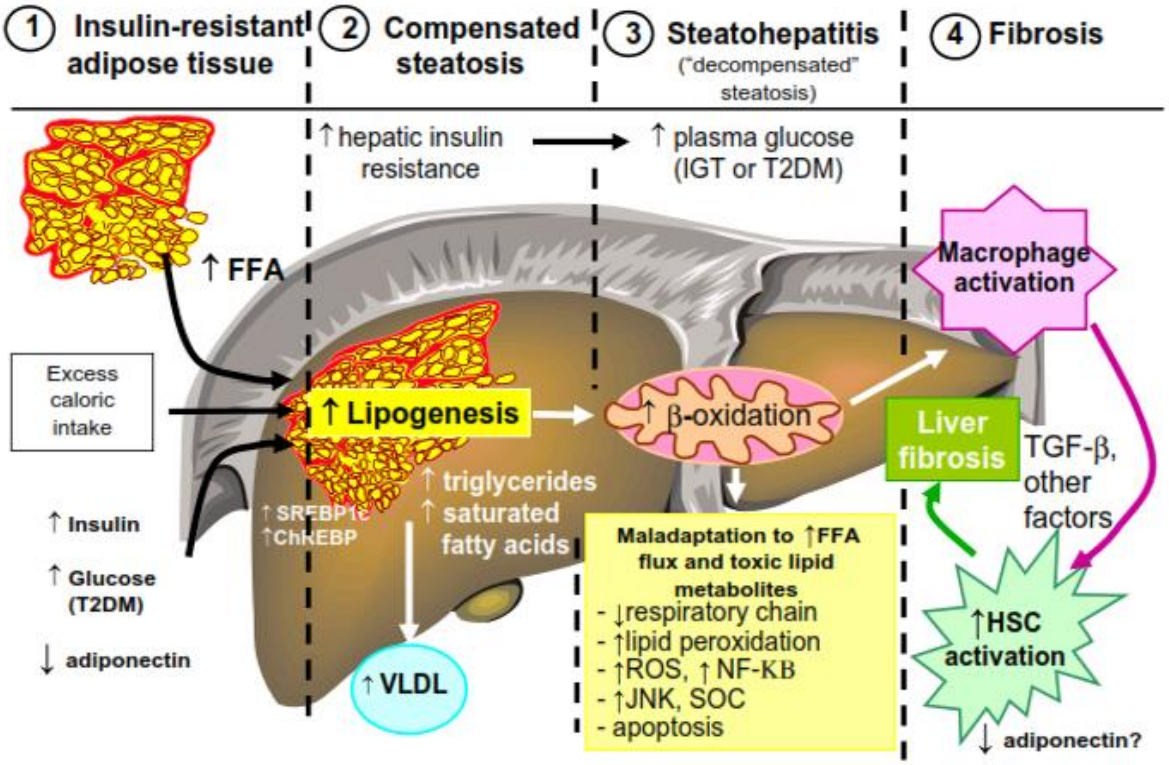
Atualmente, a NAFLD é considerada a manifestação hepática da SM e pode progredir para NASH (esteatohepatite não alcoólica), cirrose e um hepatocarcinoma (Kim e Younossi, 2008). Embora NAFLD e NASH estejam associadas, a patogênese da NASH ainda não está completamente elucidada. Mudanças no estilo de vida, sejam intervenções dietéticas e/ou prescrições de exercício físico, bem como os tratamentos, ainda não foram completamente estabelecidas. Via de regra, a progressão NAFLD-NASH está relacionada com a continuidade do estímulo que gera a lesão, isto é, são necessárias intervenções dietéticas crônicas. Uma vez o fígado sensibilizado pela NAFLD, é suscetível a uma resposta inflamatória por estímulos como: dano oxidativo, citocinas pró-inflamatórias (TNF-α), hepatotoxicidade mediada por ácidos graxos livres, aumento de colesterol intra-hepático, hiperleptinemia, hiperinsulinemia, hipoadiponectinemia e apoptose; são sugeridos como passos importantes no desenvolvimento da NASH(Day e Saksena, 2002; Marra *et al.*, 2008).

A patogênese da NASH foi primeiramente proposta por Day e James (1998)(Day e James, 1998) que considera como o “primeiro hit” o acúmulo de lipídios intra-

hepático por perturbar vias metabólicas e aumentar a vulnerabilidade à lesão celular. Já o “segundo hit” resulta do aumento do estresse oxidativo que ativa a secreção de TNF-α, de IL-6, quimiocinas, proliferação de células estreladas e a expressão de moléculas de adesão celular (ICAM-1, E-selectin ou P-selectin)(Lee *et al.*, 1995; Berson *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 2001; Jaeschke, 2011).

Figura 6: Mecanismos de transição da NAFLD para NASH. (1) Os aumentos dos ácidos graxos livres combinado com a hiperinsulinemia e a redução da adiponectina formam o tripé para a síntese de triglicerídeos hepáticos. (2) A NAFLD pode exacerbar a RI hepática, aumentar a expressão dos fatores de transcrição lipogênicos (SREBP-1C e ChREBP) e estimular a secreção de VLDL. Inicialmente, a beta-oxidação é aumentada na tentativa de “ejetar” o excesso de gordura no interior no órgão. Se um “steady-state” é alcançado, apenas a NAFLD benigna ocorre. (3) Porém, quando suplanta a capacidade de resposta mitocondrial, ou seja, se a mitocôndria não consegue se adaptar ao fluxo aumentado de ácidos graxos livres, falhas na oxidação respiratória vão gerar metabólitos tóxicos derivados dos lipídios. Estes por sua vez, ativam vias inflamatórias e causam lipotoxicidade dos hepatócitos, levando à necroinflamação. (4) A ativação de macrófagos e de células estreladas (HSC) determina o grau de resposta à fibrose e a potencial progressão para cirrose

Figura 6 - Mecanismos de transição da NAFLD para NASH



Fonte: Cusi, 2009b, a.

A disfunção mitocondrial também é descrita como potente indicador de avanço de NAFLD para NASH. Isto porque a continua produção de espécies reativas de oxigênio(EROS) pode interferir na cadeia respiratória mitocondrial e na integridade do DNA mitocondrial, levando a disfunção da organela, prejudicando assim a oxidação dos ácidos graxos(Garcia-Ruiz e Fernandez-Checa, 2006).

Os efeitos da lipotoxicidade também são referidos como ponto chave para a progressão de NAFLD para NASH. A produção de EROS é um importante fator na lipotoxicidade em virtude de contribuir para sinalização de estresse celular e interferências nas funções mitocondriais(Srivastava e Chan, 2007). Além de aumentar os níveis intracelulares de EROS, os ácidos graxos saturados podem afetar negativamente o estado redox limitando a defesa oxidativa mediada por GSH (glutationa reduzida) (2007, 2008). Os ácidos graxos ainda podem induzir apoptose. A continuidade da lipotoxicidade então pode ser denominada como lipoapoptosis. A morte celular apoptótica fornece uma explicação para taxas elevadas de apoptose em fígados com NASH e o link entre o acúmulo de lipídios hepáticos à inflamação(Unger, 2002).

Ainda existe uma correlação positiva entre a atividade das células de Kupffer e NASH, bem como ativação de células estreladas, níveis elevados de TNF-α e

peroxidação lipídica (Pessayre *et al.*, 2004; Malaguarnera *et al.*, 2006; Morris *et al.*, 2011). O TNF-α é um fator comum com a NAFLD e fornece uma correlação positiva com o dano hepático e a inflamação. Níveis elevados de TNF-α estão relacionados com o aumento na produção de macrófagos em adipócitos e células de Kupffer (Tomita *et al.*, 2006). Evidências apontam que a troca e a sinalização de moléculas pró inflamatórias entre diferentes tipos celulares do fígado tais como: hepatócitos, células endoteliais, fibroblastos, células estreladas, células de Kupffer e leucócitos parece ser essencial na progressão da NAFLD e nas alterações na histoarquitetura hepática (isto é, fibrose devido à produção de matrix extracelular da transformação de células estreladas para [mio]fibroblastos) (Diehl, 2002; Bilzer *et al.*, 2006). A fibrogênese parece estar bem clara no desenvolvimento da NASH por ativação das células estreladas mediada por citocinas e pelo estresse oxidativo (Pessayre *et al.*, 2001).

A patogênese da NASH é um espectro de causas múltiplas e complexas. De forma resumida está envolvida com a expressão aumentada de TNF-α, com a RI e lipólise, que resulta no influxo aumentado de ácidos graxos livres para o fígado e culmina com a NAFLD. A lipotoxicidade, a disfunção mitocondrial e a magnitude do estresse oxidativo resultam em peroxidação lipídica, que leva à morte dos hepatócitos, inflamação e, finalmente, a fibrose(Day, 2002).

Os efeitos da administração crônica de frutose como modelo de NAFLD e NASH não são conclusivos. Os binômios dose-resposta, tempo de administração e tipo/veículo de frutose ofertada diverge entre os estudos experimentais(Wiernsperger *et al.*, 2010).

Muito embora a obesidade seja um ponto fundamental para o quadro de NAFLD e progressão para NASH, os efeitos lipogênicos da frutose não dependem do aumento da massa corporal (Janevski *et al.*, 2012). Ratas Sprague Dawley submetidas à uma dieta com 60% de frutose por 28 dias apresentaram aumento nos níveis de mRNA de fatores de transição da lipogênese hepática (ACC, FAS, ChREBP e SREBP-1c) sem modificação na massa corporal. Já ratos Wistar alimentados com 70% de frutose por 5 semanas apresentaram grande quantidade de macro e micro vesículas de gordura intra-hepática e inflamação intralobular (Kawasaki *et al.*, 2009). Camundongos C57BL/6 que consumiram dieta rica em gordura e carboidrato associados ao consumo de 55% de frutose na água por 16 semanas desenvolveram NASH com fibrose significativa e obesidade (Kohli *et al.*, 2010). Mostrando que ratos alimentados

com dieta rica em frutose são bons modelos para o desenvolvimento de NASH (Nanji, 2004; Takahashi *et al.*, 2012).

1.4 **Estresse oxidativo**

A associação entre o estresse oxidativo e a NAFLD sugere estudos a esse respeito e, para tal, faz-se necessário a compreensão dos danos oxidativos induzidos pelos radicais livres e dos mecanismos de defesas antioxidantes.

O termo radical livre refere-se ao átomo ou molécula, altamente reativa, que contém número ímpar de elétrons na sua última camada. Ou seja, são espécies que apresentam elétrons desemparelhados e instabilidade estrutural. No nosso organismo, os radicais livres são produzidos pelas células durante a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, o metabolismo de ácidos graxos no peroxissoma, via metabólica catalisada pelas enzimas citocromo P450 nos microssomas, via da NADPH oxidase nas células fagocíticas e via de síntese das prostaglandinas. Outros sistemas enzimáticos produzem espécies reativas de nitrogênio (ERN) tais como ciclooxigenase, lipoxigenase, xantina oxidase, mieloperoxidase e o óxido nítrico sintase (Valko et al., 2007). Assim sendo, os radicais livres são derivados de oxigênio e de nitrogênio, formando espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) na forma de radical livre ou não-radical. Assim, as ERO abrangem os radicais de oxigênio como radical hidroxil (OH) e radical superóxido (O2-); e os não-radicais, como peróxido de hidrogênio (H2O2), ácido hipocloroso (HOCl), ozônio (O3) e oxigênio singlete (1O2)2. Já as ERN incluem o óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N2O3), ácido nitroso (HNO2), nitritos (NO2−), nitratos (NO3−) e peroxinitritos (ONOO−). O ON é um radical livre, uma vez que possui um elétron desemparelhado, e ainda, pode reagir facilmente com O2- produzindo o ONOO−.

A formação das moléculas ou ânions radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil ocorrem em aproximadamente 5% de todo o processo de redução do oxigênio até a água. A reação do H_2O_2com o íon ferroso ou cúprico é chamada reação de Fenton, levando a produção do radical hidroxil, muito reativo (Figura 7a). O radical hidroxil também pode ser formado pela reação de Haber-Weiss, onde o O_2^- reage com o H_2O_2 (Figura 7b) (Halliwell e Gutteridge, 1986; Droge, 2002; Halliwell, 2007).

Figura 7- Reação de Fenton e Harber Weiis

$$H_2O_2 + Fe^{+2} / Cu^{+} \rightarrow Fe^{+3} / Cu^{+2} + OH^{\bullet} + OH^{-} \quad (a)$$

$$H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \rightarrow OH^{\bullet} + OH^{-} \quad (b)$$

Legenda: (a) Reação de Fenton e (b) Haber-Weiss.

A toxicidade do estresse oxidativo pode se dar de diferentes formas: por lipoperoxidação das membranas celulares ou intracelulares, por oxidação de proteinas, por dano ao DNA ou por inativação enzimática. As células aeróbias estão sujeitas à contínua exposição das EROS em virtude do próprio “escape” de elétrons da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons. Ou seja, as EROS são produzidas naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Se há um desequilíbrio entre a formação de EROS e a atuação da defesa antioxidantes, seja pelo aumento na produção dos radicais livre ou por diminuição da defesa antioxidante, ou ainda, uma deficiência na velocidade de remoção destes, instala-se a toxicidade do estresse oxidativo. Dessa maneira, o estresse oxidativo causa alterações na estrutura e integridade funcional da célula e pode induzir respostas imunes, que culminam com mecanismos inflamatórios crônicos ou ainda, sinalizam uma resposta de proliferação celular (Droge, 2002). Avaliar os agentes antioxidantes é um meio indireto de se verificar o estresse oxidativo.

Antioxidante é uma substância que, presente em baixas concentrações, comparadas à do substrato oxidado, é capaz de regenerar o substrato ou previnir significativamente a oxidação do mesmo. O sistema de defesa antioxidante é composto de elementos enzimáticos e não-enzimáticos. Dentre os compostos não enzimáticos destacam-se: a vitamina E, o α-tocoferol, a vitamina C e o β-caroteno (precursor da vitamina A), provenientes da dieta. Os compostos enzimáticos são formados pela: superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutationa peroxidase (GPx) e a glutationa redutase (GRx) (Droge, 2002).

A enzima superóxido dismutase (SOD) é a responsável por catalisar a reação entre dois íons superóxido (dismutação) para formar o peróxido de hidrogênio. Esta reação

pode acontecer naturalmente com o pH fisiológico, porém, na presença da SOD, esta reação é catalizada em até 10^4 vezes mais (Figura 8a). A catalase (CAT) e a glutationa peroxidase (GPx) são enzimas que tem por função a redução dos peróxidos de hidrogênio (e hidroperóxidos orgânicos), impedindo a formação do radical hidroxil (Figura 8b e 8c). A glutationa redutase (GRx) recicla o dissulfeto de de glutationa (GSSG – glutationa oxidada) em glutationa reduzida (GSH) (Figura 8d). Outra classe de enzimas na detoxificação são as glutationas S-transferases (GSTs), que atuam contra agentes alquilantes, incluindo compostos ativos como herbicidas, pesticidas e xenobióticos (cloro dinitro benzeno, por exemplo) (Droge, 2002).

Figura 8- Ação das enzimas antioxidantes

$$2H^+ + 2O_2^{\bullet -} \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2 \quad \textbf{(a)}$$

$$2H_2O_2 \xrightarrow{Catalase} O_2 + H_2O \quad \textbf{(b)}$$

$$R-OOH + 2GSH \xrightarrow{GPx} R-OH + GSSG + H_2O \quad \textbf{(c)}$$

$$GSSG + 2NADPH \xrightarrow{GR} 2GSH + 2NADP^+ \quad \textbf{(d)}$$

Legenda: (a) Dismutação do radical superóxido pela superóxido dismutase (SOD); (b) Decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase (CAT); (c) Redução de hidroperóxidos pela glutationa peroxidase (GPx); (d) Regeneração da glutationa oxidada (GSSG) pela glutationa redutase (GRx).

Como descrito, em condições fisiológicas, o balanço entre os agentes pró-oxidantes e as defesas antioxidantes se mantém em equilíbrio. Quando ocorre aumento na produção de EROS, redução da defesa antioxidante ou ambas, a “homeostase oxidativa” entre os pró e antioxidantes se rompe em favor dos pró-oxidantes e instala-se os potenciais danos celulares.

O estresse oxidativo tem sido implicado na patogênese da NAFLD e NASH. Os estudos tentam elucidar o papel da EROSno estado da doença e o papel dos antioxidantes neste contexto (Malhi e Gores, 2008; Sumida *et al.*, 2013).

2 **OBJETIVOS**

2.1 **Gerais**

- Administrar dietas ricas em gordura, frutose e sacarose em camundongos C57BL/6;
- Avaliar e comparar os efeitos adversos das dietas em parâmetros morfofuncionais, bioquímicos e moleculares no fígado.

2.2 **Específicos**

- Avaliar e comparar os efeitos das dietas ricas em gordura e/ou frutose sobre a massa corporal, ingestão alimentar, sobre o colesterol total, triglicerídeos, insulina e glicose; sobre a expressão proteica de fatores de transcrição envolvidos na lipogênese, gliconeogênese e beta-oxidação hepática; e ainda, sobre as alterações morfológicas que levam à esteatose hepática não alcoólica e esteatose hepatite não alcoólica;
- Avaliar e comparar os efeitos das dietas ricas em frutose e sacarose (isoenergéticas) sobre a massa corporal e ingestão alimentar; sobre o colesterol total e triglicerídeos; sobre as enzimas hepáticas e as citocinas inflamatórias; sobre a expressão proteica e gênica de fatores de transcrição envolvidos na lipogênese, na beta-oxidação, na gliconeogênese e no equilíbrio antioxidante no fígado.

3 **MATERIAIS E MÉTODOS**

3.1 **EXPERIMENTO 1**

3.1.1 Animais e dietas

Os cuidados com os animais seguiram as recomendações do comitê de ética local para experimentação animal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro sob o protocolo (CEUA/026/2011).

Foram utilizados 40 camundongos machosC57BL6/J com 12 semanas de idade, obtidos na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), mantidos no Laboratório de Morfologia e Morfometria Cardiovascular (LMMC) em caixas apropriadas e condições de temperatura controladas (21±2ºC) e umidade (60±10%) com acesso irrestrito a comida e água. O ambiente foi submetido a ciclos de 12h claro-escuro, com início às 01:00 a.m. e de reposição de ar (15 minutos/hora). O estudo seguiu as normas estabelecidas no “Guide for Care and Use of Laboratory Animals” publicadas pelos US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23 revisados em 1985).

Com três meses de idade os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos de acordo com as seguintes dietas experimentais:

a) Dieta padrão, SC, composta por 9% de gordura, 15% de proteínas e 76% de carboidratos – fonte: amido de milho; Total: 3802.8 kcal/kg;

b) Dieta rica em gordura, HF, composta por 42% de lipídios – fonte: banha de porco; 14% de proteínas e 44% de carboidratos – fonte: amido de milho; Total: 4702.8 kcal/kg;

c) Dieta rica em frutose, HFr, composta por 9% de gordura, 15% de proteínas e 76% de carboidratos, sendo 34% de frutose; Total: 3802.8 kcal/kg;

d) Dieta rica em gordura e frutose, HF/HFr, composta por 42% de lipídios - fonte: banha de porco, 14% de proteínas e 44% de carboidratos, sendo 34% de frutose; Total: 4702.8 kcal/kg.

Todas as dietas seguiram as recomendações da AIN-93M para roedores. Os animais receberam as dietas descritas por 16 semanas (Tabela 1).

Tabela 1- Composição nutricional das dietas (experimento 1)

Nutrientes (g/Kg)	**Grupos**			
	SC	**HF**	**HFr**	**HF/HFr**
Caseina (≥ 85%protein)	140.0	160.0	140.0	160.0
Amido de Milho	620.7	420.69	296.8	20.7
Sacarose	100.0	100.0	100.0	100.0
Frutose	-----	------	323.85	400.0
Óleo de Soja	40.0	40.0	40.0	40.0
Banha de Porco	----	180.0	----	180.0
Fibra	50.0	50.0	50.0	50.0
Mix de Vitaminas	10.0	10.0	10.0	10.0
Mix de Minerais	35.0	35.0	35.0	35.0
Cistina	1.8	1.8	1.8	1.8
Colina	2.5	2.5	2.5	2.5
Antioxidante	0.008	0.008	0.008	0.008
Total (g)	1.000	1.000	1.000	1.000
Energia (Kcal/Kg)	3802.8	4702.8	3802.8	4702.8
Carboidrato (%)	76	44	76	44
Frutose (%)	(-)	(-)	(34)	(34)
Proteína (%)	15	14	15	14
Lipídio (%)	9	42	9	42

Legenda: Grupos: SC – grupo stardart show, dieta padrão; HF – dieta high fat; HFr – grupo high fructose; e HF/HFr – grupo high fat e high fructose

3.1.2 Massa corporal e ingestão alimentar

A massa corporal (MC) foi aferida semanalmente, em balança digital (precisão 0,01g), a partir da 12^0 semana de vida até o final do experimento. A dieta foi oferecida diariamente (4g/animal) e todo o restante do dia anterior foi desprezado, assim obtivemos o controle da ingestão alimentar (g/animal/semana) e calórica (Kcal/animal/semana).

3.1.3 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e Teste Intraperitoneal de tolerância à insulina (TITI)

O TOTG e TITI foram realizadas ao final do experimento, na 15a e 16a semana. Os animais foram mantidos em jejum durante seis horas (TOTG) ou quatro horas (TITI) antes do teste. Para o TOTG, foi administrado glicose (1g/kg) por via oral (por sonda oro-gástrica), enquanto que para o TITI, foi administrado insulina (0,5 unidades/kg) por via intraperitoneal. Amostras de sangue foram coletadas através de uma pequena incisão na ponta da cauda no tempo 0 (em jejum) e nos tempos de 15, 30, 60 e 120 minutos após sobrecarga de glicose e insulina para ambos, TOTG e TITI respectivamente. A concentração de glicose no sangue foi determinada com um glicosímetro (Accu-Chek Ativa; Roche Applied Science, Brasil). A "área sob a curva" (AUC, em unidades arbitrárias, a.u) foi calculado para avaliar a intolerância à glicose e a resistência à insulina.

3.1.4 Eutanásia

No dia da eutanásia, os animais foram mantidos em jejum durante 6 horas e foram então profundamente anestesiados (pentobarbital de sódio intraperitoneal de 150 mg/kg). As amostras de sangue foram rapidamente obtidas por punção cardíaca a partir do átrio direito. O fígado foi dissecado, cortado e fixado durante 48h em formaldeído preparado fresco (4% p/v em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2) para a microscopia de luz ou armazenadas em freezer a -80 ° C para análise por Western blot.

3.1.5 Análises plasmáticas

Após a coleta de sangue, o plasma foi separado por centrifugação (120 x g por 15 min) à temperatura ambiente. O colesterol total (CT), o triglicerídeo (TG), a glicose plasmática e a alanina aminotransferase - ALT foram determinados pelo método enzimático colorimétrico e cinético utilizando um espectrofotômetro semiautomático e respectivos kits para análise (Bioclin, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil). Além disso, a concentração plasmática de insulina foi mensurada por kit de ELISA (Insulin, cat. #EZRMI-13K, Millipore, Missouri, USA). A resistência à insulina foi estimada pelo

modelo de avaliação da homeostase - HOMA-IR = [(insulina x glicose)/ 22.5](Matthews *et al.*, 1985).

3.1.6 Fígado

Fragmentos de todos os lobos do fígado foram preparados, incluídos em paraplast Plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.), seccionados em 5µm e corados com hematoxilina-eosina. Cinco campos microscópicos aleatórios foram analisadas por animal, usando vídeo-microscopia (microscópio Leica DMRBE, Wetzlar, Alemanha; câmera Lumenera Infinity, Otawwa, Canadá).Um sistema teste composto por 36 pontos, programa STEPanizer, foi utilizado para estimar a densidade de volume (V_v) de NAFLD a partir da contagem de pontos que tocavam as gotículas de gordura nos hepatócitos: V_v [esteatose] = P_P [esteatose]/P_T, onde P_P é o número de pontos que se sobrepõem a esteatose e P_T o número de pontos totais do sistema (36 pontos) (Aguila *et al.*, 2003; Catta-Preta *et al.*, 2011).

3.1.7 Western Blotting

A expressão das proteínas de ligação ao elemento de regulação de esterol (SREBP-1c - *sterol regulatory element-binding proteins*; Santa Cruz Biotechnology, sc-código 367, CA, EUA), os receptores ativados por proliferador de peroxissomo (PPAR-gama - *peroxisome proliferator-activated receptors*; Santa Cruz Biotecnology, código sc-7273), PPAR-alfa (Santa Cruz Biotechnology, sc-9000 código, CA, EUA), o transportador de glucose (GLUT-2; Millipore, cat#07-1402, MA, EUA) e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK - *phosphoenolpyruvate carboxykinase*; Santa Cruz Biotechnology, código sc-32879), foram detectados por *imunoblotting* utilizando anticorpos policlonais de coelho. Aproximadamente 120mg de fígado foi homogeneizado em tampão de lise (pH 6,4) contendo inibidores de protease. A concentração de proteína no sobrenadante foi determinada com um kit de ensaio de proteínas BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). Vinte microgramas de proteína foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10 % (SDS -PAGE) e transferidos para uma membrana de PVDF (GE Healthcare BioSciences). As membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado, em solução salina tamponada com Tris (T-TBS) (Amershan Biosciences, Uppsala, Suécia) contendo

0,05 % de Tween-20 (Bio Rad, CA, EUA) e, em seguida, incubadas *durante a noite*a 4 ° C com anti-SREBP-1c, anti-PPAR-γ, anti-PPAR-α, anti-GLUT2 e anti-PEPCK. Subsequentemente, as membranas foram lavadas três vezes com T-TBS contendo 0,05 % de Tween-20 e incubadas com o anticorpo secundário durante 1 hora. A proteína estrutural β-actina (Santa Cruz Biotechnology, sc-código 81178, CA, EUA) foi obtida por *stripping* das proteínas da membrana de PVDF do fígado e foi utilizada para corrigir a expressão das proteínas mencionadas. As bandas foram detectadas por quimiluminescência utilizando o kit de reagente ECL (GE Healthcare BioSciences) e obtidas pelo sistema de imagens ChemiDoc (Bio Rad, EUA). A densidade dos sinais foram analisados usando a versão do software Image J. 1.47q (Wyne Rasband, National Institutes of Health, EUA).

3.1.8 Análise estatística

Os dados são expressos como médias e os respectivos desvios padrão da média. Todas as amostras foram testadas para normalidade e homogeneidade das variâncias e as diferenças entre os grupos foram testados com ANOVA de um fator com teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak (GraphPad Prism versão 6.03 para Windows, San Diego, CA, EUA). Em todos os casos, um valor de $P \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo

3.2 **EXPERIMENTO 2**

3.2.1 Animais e dietas

Trinta camundongos machos C57BL6/J com 12 semanas de vida foram divididos aleatoriamente em 3 grupos nutricionais: dieta controle/stardart show - SC, dieta high frutose - HFru e dieta high sucrose - HSu durante 15 semanas (Tabela 2).

a) Dieta padrão, SC, composta por 76% de carboidratos – fonte: amido de milho;
b) Dieta rica em frutose, HFru, composta por 50% de frutose;
c) Dieta rica em sacarose, HSu, composta por 50% de sacarose.

Os cuidados com os animais seguiram as recomendações do comitê de ética local (CEUA/043/2012), ficaram em caixas apropriadas com condições de temperatura controladas (21±2ºC) e umidade (60±10%) com acesso irrestrito a comida e água. O ambiente foi submetido a ciclos de 12h claro-escuro. As dietas seguiram as normas estabelecidas no "*Guide for Care and Use of Laboratory Animals*" publicadas pelos US *National Institutes of Health* (NIH Publication No. 85-23 revisados em 1985).

Tabela 2 - Composição nutricional das dietas (experimento 2)

Nutrientes (g/Kg)	**SC**	**HFru**	**HSu**
Caseína (≥ 85%proteina)	140,0	140,0	140,0
Amido de Milho	620,7	246,3	146,3
Sacarose	100,0	100,0	474,4
Frutose	-----	474,4	------
Óleo de soja	40,0	40,0	40,0
Fibra	50,0	50,0	50,0
Vitamina Mix	10,0	10,0	10,0
Mineral Mix	35,0	35,0	35,0
Cistina	1,8	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5	2,5
Antioxidante	0,008	0,008	0,008
Total (g)	1.000	1.000	1.000
Energia (Kcal/Kg)	3802,8	3802,8	3802,8
Carboidrato (%)	76	76	76
Sacarose (%)	(-)	(-)	50
Frutose (%)	(-)	50	(-)
Proteina (%)	15	15	15
Lipidio (%)	9	9	9

Legenda: Grupos: SC – grupo stardart show, dieta padrão; HFru – grupo high frutose; e HSu – grupo high sucrose.

3.2.2 Massa corporal e ingestão alimentar

A massa corporal (MC) e a ingestão alimentar seguem a mesma metodologia já descrita na página 40, experimento 1.

3.2.3 Eutanásia

Os métodos para a eutanásia dos animais seguem o descrito na página 41, experimento 1

3.2.4 Análises plasmáticas

Os cuidados com o plasma estão descritos na página 41, experimento 1. Foram analisados: o colesterol total, o triglicerídeo, a glicose plasmática, a alanina aminotrasferase (ALT) e o aspartato aminotransferase (AST) (Bioclin, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil). As concentrações de insulina, adiponectina, leptina, resistina, interleucina-6 (IL-6) e da proteína quimiotática de monócitos-1(MCP-1) foram obtidas por kit de ELISA (painel MMHMAG-44K-08, Millipore, Missouri, USA). A resistência à insulina foi estimada pelo modelo de avaliação da homeostase: HOMA-IR = [(insulina x glicose) / 22.5] (Matthews *et al.*, 1985).

3.2.5 Fígado

A histologia hepática seguiu a rotina descrita na página 42, experimento 1.

3.2.6 Western Blotting

Os procedimentos do western blotting foram os mesmos empregados no experimento 1, página 42. Foram avaliados a expressão dos seguintes anticorpos: de expressão das proteínas de ligação ao elemento de regulação de esterol (SREBP-1c - *sterol regulatory element-binding proteins*; Santa Cruz Biotechnology, sc-código 367, CA, EUA), as proteínas de ligação ao elemento de hidrato de carbono-responsivo (ChREBP - *carbohydrate-responsive element-binding protein;* Santa Cruz Biotechnology, sc-código 33764, CA, EUA), os receptores ativados por proliferador de peroxissomo (PPAR-gama - *peroxisome proliferator-activated receptors*; Santa Cruz Biotecnology, código sc-7273), PPAR-alfa (Santa Cruz Biotechnology, sc-9000 código, CA, EUA), o transportador de glucose (GLUT-2; Millipore, cat#07-1402, MA, EUA), a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK - *phosphoenolpyruvate carboxykinase*; Santa Cruz Biotechnology, código sc-32879), a glicose-6-fosfatase (G6Pase – *glucose-6-phosphatase*; Santa Cruz Biotechnology, sc-código 25840, CA, EUA), a superóxido desmutase (SOD-2 – *manganese superoxide dismutase*; Santa Cruz Biotechnology, sc-código 30080, CA, EUA), a Catalase (Santa Cruz Biotechnology, sc-código 50508, CA, EUA), a glutationa peroxidase (GPx – *glutathione peroxidase*; Santa Cruz Biotechnology, sc-código 133160, CA, EUA) e a

glutationa redutase (GRx – *glutathione reductase*; Santa Cruz Biotechnology, sc-código 133245, CA, EUA).

3.2.7 PCR quantitativo em tempo real

O RNA total foi extraído a partir de 50mg de fígado utilizando reagente Trizol (Invitrogen, CA, EUA). A quantificação do RNA foi determinada em espectrofotometria NanoVue (GE Life Sciences) e 1 mg de RNA foi tratado comDNase I (Invitrogen). A síntese da primeira cadeia de cDNA foi realizada utilizando iniciadores Oligo (dT)para RNAm e Superscript III da transcriptase reversa (ambos daInvitrogen). O PCR quantitativo em tempo real (RT- qPCR) foi realizado utilizando StepOnePlus Real-Time PCR System (Life Technologies, CA, USA) e o SYBR Green mix(Invitrogen). Primers para qPCR foram desenhados utilizando o software Primer3 on-line como indicados na Tabela 3. A β-actina foi utilizada para normalizar a expressão dos genes selecionados. As eficiências de RT-qPCR para o gene alvo e da β-actina foram aproximadamente iguais e calculados a partir de séries de diluição de cDNA. As reações em tempo real de PCR foram realizadas como se segue: depois de uma pré-desnaturação e programa desativação da polimerase (4 min a 95ºC), quarenta e quatro ciclos, cada uma consistindo em95°C durante 10s e 60°C durante 15s foram seguidos por um programa de curva de fusão (60 a 95ºC, com taxa de aquecimento de 0.1ºC/s). Os controles negativos consistiram em poços nos quais o cDNA foi substituído por água deionizada. A relação de expressão relativa (RQ) de RNAm foi calculado pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, em que -ΔCT expressa a diferença entre o número de ciclos (TC) dos genes-alvo e da β-actina.

Tabela 3. RT-qPCR primers e respectivas sequências (experimento 2).

Gene	(5'-3')	Primers
β-actin	FW	TGTTACCAACTGGGACGACA
β-actin	RV	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA
SREBP-1c	FW	AGCAGCCCCTAGAACAAACA
SREBP-1c	RV	TCTGCCTTGATGAAGTGTGG
ChREBP/ MLXIPL	FW	GCATCCTCATCCGACCTTTA
ChREBP/ MLXIPL	RV	GATGCTTGTGGAAGTGCTGA
PPAR-γ	FW	CATCGAGGACATCCAAGACA
PPAR-γ	RV	ACGATCTGCCTGAGGTCTGT
PPAR-α	FW	TCTTCCCAAAGCTCCTTCAA
PPAR-α	RV	TCGGACTCGGTCTTCTTGAT
MNSOD	FW	AACCATCCACTTCGAGCAGA
MNSOD	RV	GGTCTCCAACATGCCTCTCT
CATALASE	FW	ACATGGTCTGGGACTTCTGG
CATALASE	RV	CAAGTTTTTGATGCCCTGGT
GPX-1	FW	GTCCACCGTGTATGCCTTCT
GPX-1	RV	TCTGCAGATCGTTCATCTCG
GRx	FW	CACGACCATGATTCCAGATG
GRx	RV	CAGCATAGACGCCTTTGACA

Legenda: Sterol Regulatory Element-Binding Proteins (SREBP-1C), Carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP), Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-γ), Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-α), Manganese superoxide dismutase 2, mitochondrial (MNSOD), Glutathione peroxidase (GPx) e Glutathione reductase (GRx).

3.2.8 Análise estatística

Os dados são expressos como as médias e erro padrão da média. Todas as amostras foram testadas para normalidade e homogeneidade das variâncias e as diferenças entre os grupos foram testados com ANOVA de um fator com análise de comparações múltiplas de Holm-Sidak (GraphPad Prism versão 6.03 para Windows, San Diego, CA, EUA). Em todos os casos, um valor de $P \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 **RESULTADOS**

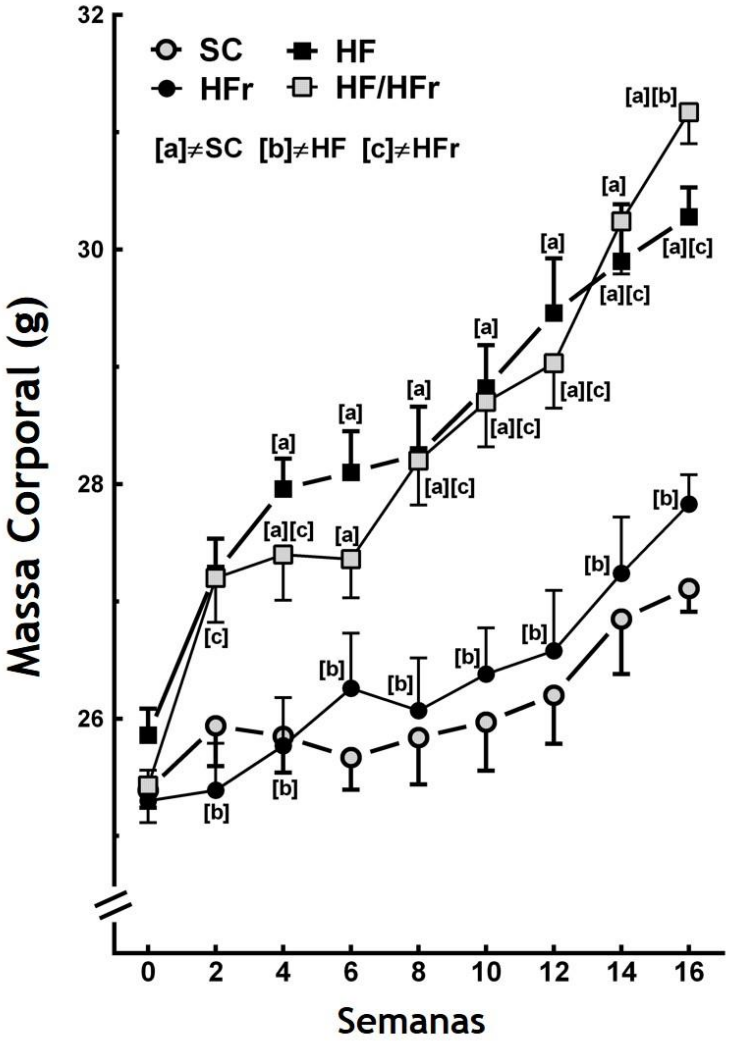
4.1 **EXPERIMENTO 1**

4.1.1 Massa corporal e ingestão alimentar

A massa corporal dos grupos HF e HF/HFr foram 12% (P<0,001) e 15% (P<0,001) maiores, respectivamente, quando comparados aos animais SC. A massa corporal do grupo HF/HFr foi 12% maior em relação ao grupo HFr (P<0,001). Contudo, a massa corporal do grupo HFr não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo SC (Figura 9). Além disso, a ingestão alimentar (g/animal/semana) não apresentou diferença entre os grupos estudados (Tabela 4).

Os resultados da ingestão energética (kcal/animal/semana) seguem os resultados encontrados na massa corporal. Não houve diferença entre os grupos SC e HFr ou entre os grupos HF e HF/HFr. Devido a maior densidade energética das dietas que contém gordura na sua composição, a ingestão energética foi 11% maior no grupo HF (P<0,001) e 10% maior no grupo HF/HFr (P<0,001) em relação ao grupo SC (Tabela4).

Figura 9- Gráfico de evolução da massa corporal (experimento 1)



Legenda: As dietas foram administradas por 16 semanas. SC – standard chow/grupo controle, HF – grupo high-fat, HFr – grupo high-frutose, HF/HFr – grupo high-fat e high-frutose. Valores expressos como média ± erro padrão da média. Diferenças significativas foram consideradas em cada semana (P≤0,05) comparados com [a]SC, [b]HF e[c]HFr.

4.1.2 <u>TOTG, TITI e Insulina</u>

A área sobre a curva (AUC) do TOTG foi maior nos grupos HF (+15%; *P*<0,05), HFr (+16%; *P*<0,01) e HF/HFr (+12%; *P*<0,05) quando comparados ao grupo SC (Tabela 4). A AUC do TITI seguiu a mesma tendência, foi maior nos grupos HF (+36%, *P*<0,05), HFr (+49%; *P*<0,01) e HF/HFr (+38%, *P*<0,05) em relação ao SC. A concentração de insulina plasmática foi maior nos grupos HF (+68%; *P*<0,001), HFr

(+49%; *P*<0,01) e HF/HFr (+47%; *P*<0,01). Consequentemente, o HOMA-IR foi maior nos grupos HF (+295%; *P*<0,001), HFr (+194%; *P*<0,001) e HF/HFr (+194%; *P*<0,01) quando comparados ao grupo SC (Tabela 4).

4.1.3 Colesterol, triglicerídeos e glicose

Houve aumento do colesterol nos três grupos dietéticos estudados: HF (+49%; *P*<0,01), HFr (+37%; *P*<0,05) e HF/HFr (+68%; *P*<0,001) em relação grupo SC. O triglicerídeo plasmático acompanhou os resultados do colesterol total, sendo 14% maior no grupo HF (*P*<0,001), 15% maior no grupo HFr (*P*<0,001) e 14% maior no grupo HF/HFr (*P*<0,001). Ao final do experimento, a glicose plasmática foi 142% maior no grupo HF (*P*<0,001), 96% maior no grupo HFr (*P*<0,01) e 101% maior no grupo HF/HFr (*P*<0,01) quando comparados ao grupo SC (Tabela 4).

4.1.4 Fígado

A concentração de ALT foi maior nos grupos HF (+134%; *P*<0,001), HFr (+115%; *P*<0,01) e HF/HFr (+102%; *P*<0,01) quando comparados ao grupo SC (Tabela 4).

Os resultados do triglicerídeo hepático foram similares ao observado no triglicerídeo plasmático. Foi encontrado aumento nos grupos HF (+69%; *P*<0,001), HFr (+24%; *P*<0,05) e HF/HFr (+48%; *P*<0,001) em relação ao grupo SC. Os níveis de triglicerídeo hepático no grupo HF/HFr ainda foram 19% maiores quando comparados ao grupo HFr (*P*<0,05) (Tabela 4).

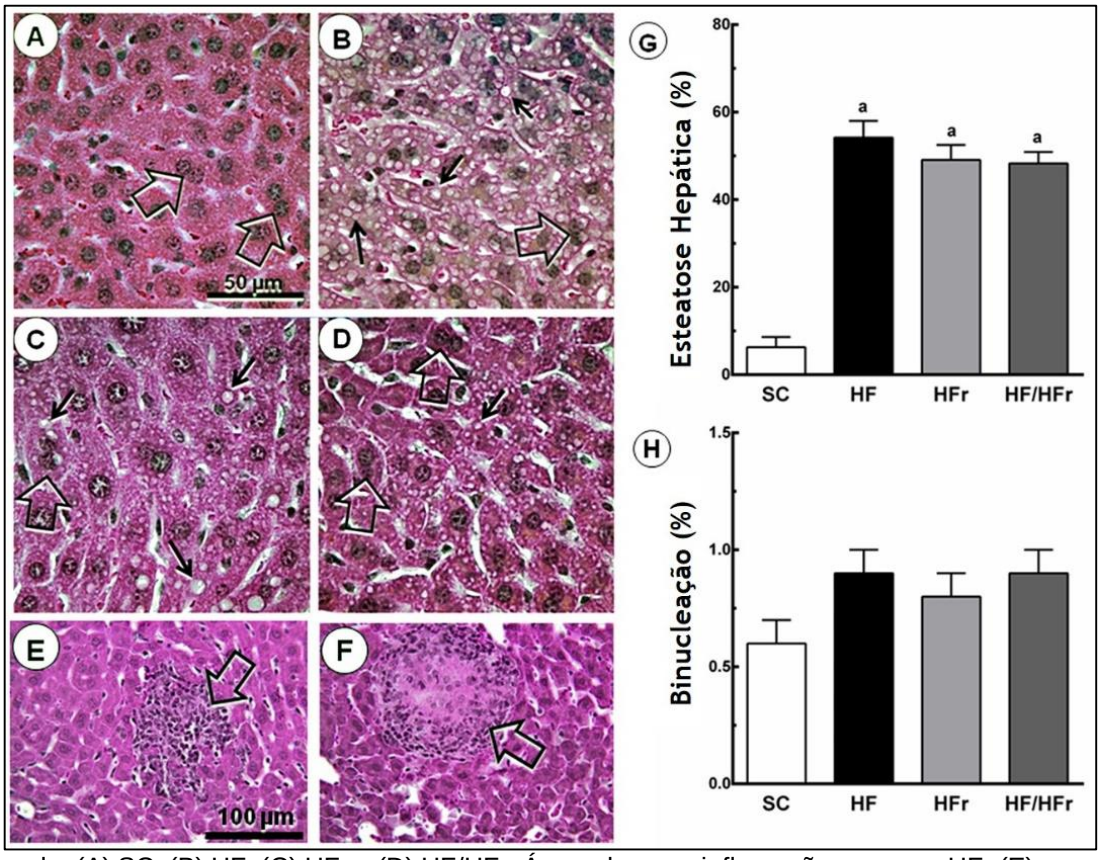
Tabela 4 - Ingestão alimentar e respostas bioquímicas (experimento 1)

Variáveis	Grupos			
	SC	**HF**	**HFr**	**HF/HFr**
Alanina aminotransferase (mg/dl)	35,05±7,81	81,93±6,53[a]	75,20±5,66[a]	70,97±4,92[a]
Ingestão Energética (kcal/animal/ semana)	12330 ± 204	13741 ± 348[a]	12126 ± 427[b]	13565 ± 216[a,c]
Ingestão alimentar (g/animal/semana)	3,24±0,40	2,92±0,37	3,18±0,56	2,88±0,23
Glicose (mmol/L)	5,08±0,70	12,31±1,14[a]	9,98 ±0,88[a]	10,20±1,04[a]
Triglicerídeo Hepático (mg/dl)	74,8±1,4	126,2±4,6[a]	93,0±1,8[a,b]	110,9±6,1[a,b,c]
HOMA-IR	1,0±0,14	4,1±0,35[a]	3,1±0,32[a]	3,1±0,31[a]
Insulina (µIU/ml)	4,6±0,11	7,8±0,50[a]	6,9±0,36[a]	6,8±0,49[a]
TITI (AUC, a.u.)	601,7±59,9	817,0±23,4[a]	896,9±22,3[a]	829,8±73,0[a]
TOTG (AUC, a.u.)	1086,2±21,2	1249,2±24,5[a]	1261,8±42,8[a]	1214,8±32,5[b,c]
Colesterol Total (mg/dl)	74,2±5,6	110,8±5,9[a]	101,8±3,8[a]	124,5±8,4[a]
Triglicerídeo (mg/dl)	58,0±1,4	66,0±0,5[a]	66,8±0,9[a]	66,4±0,7[a]

Nota: Valores expressos como média ± erro padrão da média. Diferenças significativas foram consideradas ($P \leq 0,05$) comparados com [a]SC, [b]HF e [c]HFr. Abreviações: a.u (unidade arbitrária), AUC (área sobre a curva), HOMA-IR (*homeostasis model assessment for insulin resistance*), TITI (teste intraperitoneal de tolerância à insulina) e TOTG (teste oral de tolerância à glicose).

A estrutura hepática ficou marcada pela vasta quantidade de gordura infiltrada em seus hepatócitos. Houve aumento da esteatose hepática não alcoólica nos grupos HF (+760%; P<0,001), HFr (+679%; P<0,001) e HF/HFr (+667%; P<0,001) em relação ao SC (Figura 10G). Foi observado maior frequência de binucleação nos grupos HF (+50%), HFr (+33%) e HF/HFr (+50%) quando comparado ao grupo SC (Figura 10H). Além disso, focos de necroinflamação foram observados somente nos grupos HFr e HF/HFr (Figura 10E e 10F).

Figura 10 - Densidade de volume de esteatose hepática e frequência de binucleação

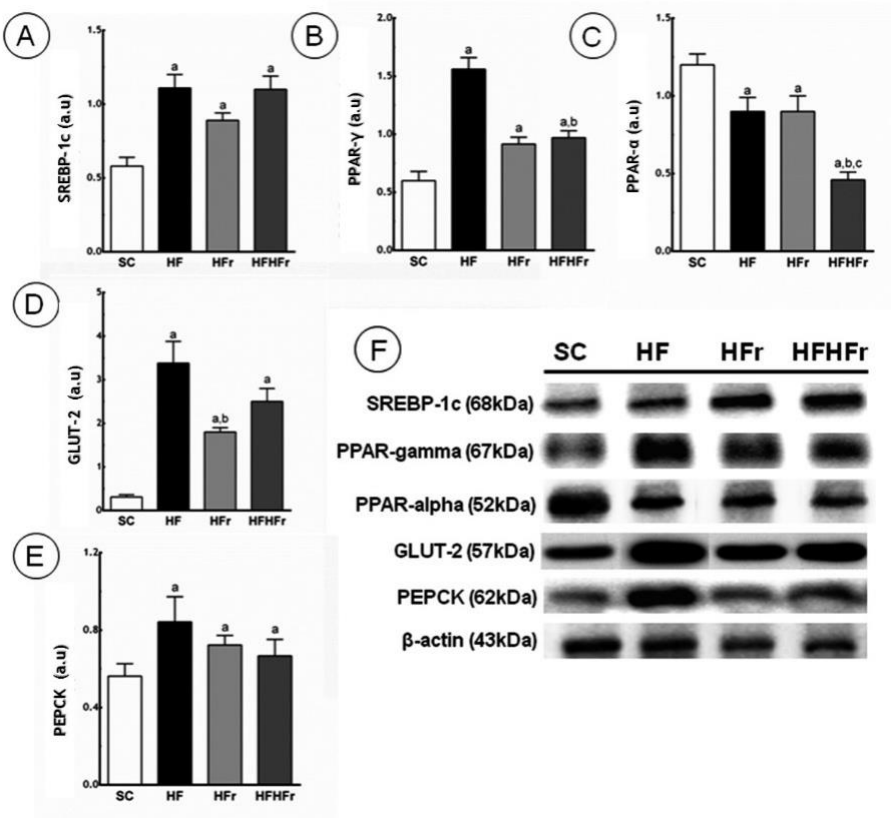


Legenda: (A) SC; (B) HF; (C) HFr e (D) HF/HFr. Áreas de necroinflamação no grupo HFr (E) e no grupo HF/HFr (F – setas abertas). A quantificação da esteatose hepática no gráfico (G) e da binucleação em (H). Valores expressos como média ± erro padrão da média. Diferenças significativas foram consideradas (*P*≤0,05) comparados com [a]SC.

Nota: Os fígados dos grupos HF, HFr e HF/HFr apresentam aumento da esteatose hepática com macro (setas fechadas) e microvesículas de gordura (setas abertas).

Comparado ao grupo SC, foi observado aumento na expressão hepática de SREBP-1c nos grupos HF (91%; *P*<0,001), HFr (53%; *P*<0,05) e HF/HFr (90%; *P*<0,001) (Figura 11A); e na expressão de PPAR-γ nos grupos HF (+160%; *P*<0,001), HFr (52%; *P*<0,05) e HF/HFr (62%; *P*<0,01) (Figura 11B). Em contraste, a expressão hepática de PPAR-α foi reduzida nos grupos HF (-25%; *P*<0,05), HFr (-25%; *P*<0,05) e HF/HFr (-62%; *P*<0,001). A menor expressão de PPAR- α foi observada no grupo HF/HFr em comparação com o grupo HF (-49%; *P*<0,01) e com o grupo HFr (-49%; *P*<0,01) (Figura 11C).

Figura 11 - Expressão proteica dos fatores de transcrição lipogênicos, oxidativos e glicolíticos



Legenda: (A), peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-γ) (B), PPAR-α (C), *glucose transporter* (GLUT-2) (D)e*phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPCK) (E). A expressão hepática das proteínas mencionadas foram corrigidas, normalizadas, pela expressão hepática de beta-actina e expressas em unidades arbitrárias (a.u). Valores expressos como média ± erro padrão da média. Diferenças significativas foram consideradas (*P*≤0,05) comparados com [a]SC, [b]HF e [c]HFr.

Nota: Sterol regulatory element-binding proteins (SREBP-1c).

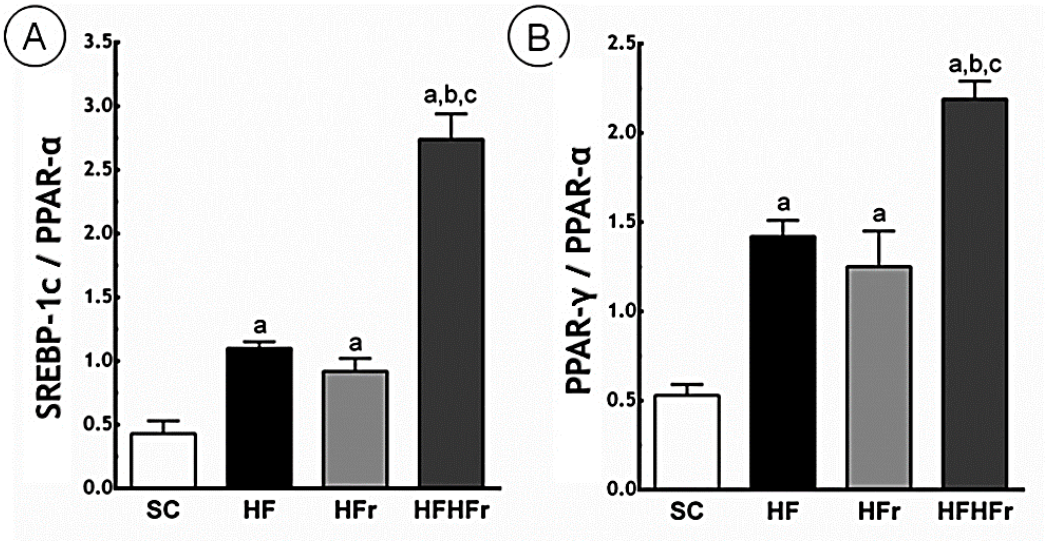
A PEPCK foi aumentada nos grupos HF (113%; *P*<0,001), HFr (68%; *P*<0,05) e HF/HFr (74%; *P*<0,01) (Figura 11E); bem como do GLUT2 nos grupos HF (990%;

P<0,001), HFr (481%; *P*<0,01) e HF/HFr (706%; *P*<0,001) quando comparados ao grupo SC (Figura 11D).

Em comparação com o grupo de SC, a relação entre SREBP-1c e PPAR–α foi maior no grupo HF (156%; *P*<0,01), no grupo HFr (114%; *P*<0,05) e no HF/HFr (537%; *P*<0,001). O grupo HF/HFr mostrou a maior razão entre a SREBP-1c e PPAR-α, maior que o grupo de HF (149%; *P*<0,001) e maior que o grupo HFr (198 %; *P*<0,001) (Figura 12A).

Da mesma forma, a relação entre o PPAR-γ e PPAR-α também foi maior no grupo de HF (168%; *P*<0,001), no grupo HFr (136%; *P*<0,01) e no grupo HF/HFr (313%; *P*<0,001). Mais uma vez o grupo HF/HFr mostrou os maiores valores na relação entre PPAR-γ e PPAR-α, maior que o grupo HF (54%; *P*<0,001) e o grupo HFr (75%; *P*<0,001) (Figura 12B).

Figura 12- Razão lipogênese e beta-oxidação



Legenda: (A) e a razão entre o PPAR-γ/PPAR-α (B); expressos em unidades arbitrárias (a.u). Valores expressos como média ± erro padrão da média. Diferenças significativas foram consideradas (*P*≤0,05) comparados com [a]SC, [b]HF e [c]HFr.

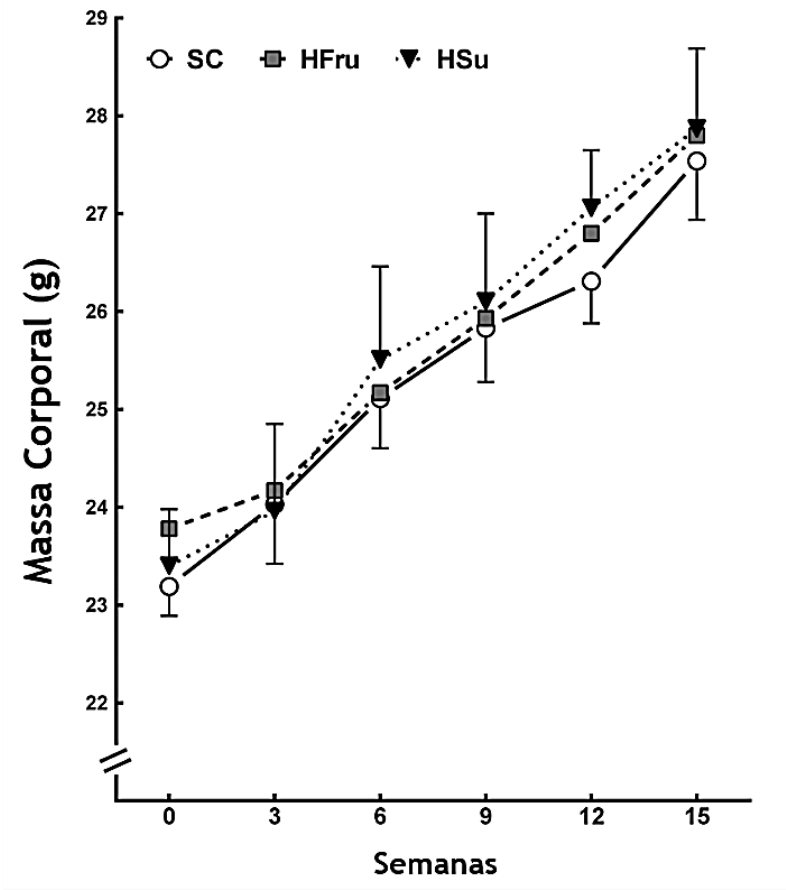
Nota: O sterol regulatory element-binding proteins (SREBP-1c) /peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-α).

4.2 **EXPERIMENTO 2**

4.2.1 Massa corporal e ingestão alimentar

Devido as dietas estudadas serem isoenergéticas entre si, não houve diferença na massa corporal entre os três grupos dietéticos (SC, HFru e HSu) (Figura 13), bem como na ingestão alimentar em g/animal/semana e calórica em Kcal/animal/semana (Tabela 5).

Figura 13- Gráfico de evolução da massa corporal (experimento 2)



Legenda: As dietas foram administradas por 15 semanas. SC – standard chow/grupo controle, HFru – grupo high-frutose e HSu – grupo high sucrose. Valores expressos como média ± erro padrão da média.

Tabela 5 -. Ingestão alimentar e energética (experimento 2)

Variáveis	Grupos		
	SC	**HFru**	**HSu**
Ingestão alimentar (g/animal)	2,55 ± 0,08	2,79 ± 0,10	2,59 ± 0,15
Ingestão energética (10^3KJ/animal)	40,6 ± 1,2	44,4 ± 1,5	41,2 ± 2,5

Nota: Valores expressos como média ± erro padrão da média

4.2.2 Respostas bioquímicas

Houve aumento do colesterol total nos grupos HFru (+40%; P<0,05) e HSu (+35%; P<0,05) quando comparados ao grupo SC. O mesmo foi observado para o triglicerídeo, aumento nos grupos HFru (+27%; P<0,01) e HSu (+28%; P<0,01). As enzimas hepáticas encontraram-se alteradas com aumento da ALT nos grupos HFru (+128%; P<0,001) e HSu (+58%; P<0,05). Neste parâmetro o grupo HFru apresentou os maiores valores de ALT quando comparados ao grupo HSu (+31%; P<0,05). A AST também foi maior nos grupos HFru (+100%; P<0,01) e HSu (+90%; P<0,01). A glicose plasmática também foi maior nos grupos HFru (+84%; P<0,01) e HSu (+96%; P<0,001). Houve hiperinsulinemia nos animais HFru (+132%; P<0,05) e HSu (+117%; P<0,05). Quando calculado o HOMA-IR, observou-se resistência à insulina nos grupos HFru (+296%; P<0,05) e HSu (+287%; P<0,05). A leptina acompanhou os resultados da insulina. Houve hiperleptinemia nos grupos HFru (+50%; P<0,05) e HSu (+143%; P<0,001) quando comparados ao grupo SC. Os maiores valores de leptina foram observados no grupo HSu (+62%; P<0,001), quando comparados ao grupo HFru. Em contrapartida, foi observado redução da adiponectina plasmática nos animais HFru (-34%; P<0,05) e HSu (-37%; P<0,05). A resistina foi maior nos grupos HFru (+40%; P<0,05) e HSu (+33%; P<0,05). O perfil inflamatório foi aumentado nos grupos frutose e sacarose, com aumento da IL-6 nos animais HFru (+148%; P<0,01) e HSu (+83%; P<0,05); e da MCP-1 em HFru (+139%; P<0,05) e HSu (+258%; P<0,001), em relação ao grupo SC. Os maiores valores de MCP-1 foram observados no grupo HSu (+50%; P<0,05) quando comparado ao grupo HFru (Tabela 6). No grupo OB-NT, a estrutura

do fígado foi caracterizada por uma infiltração de gordura e pela presença de macro e microvesículas intra-hepáticos, caracterizando a esteatose hepática.

Tabela 6 - Respostas bioquímicas (experimento 2)

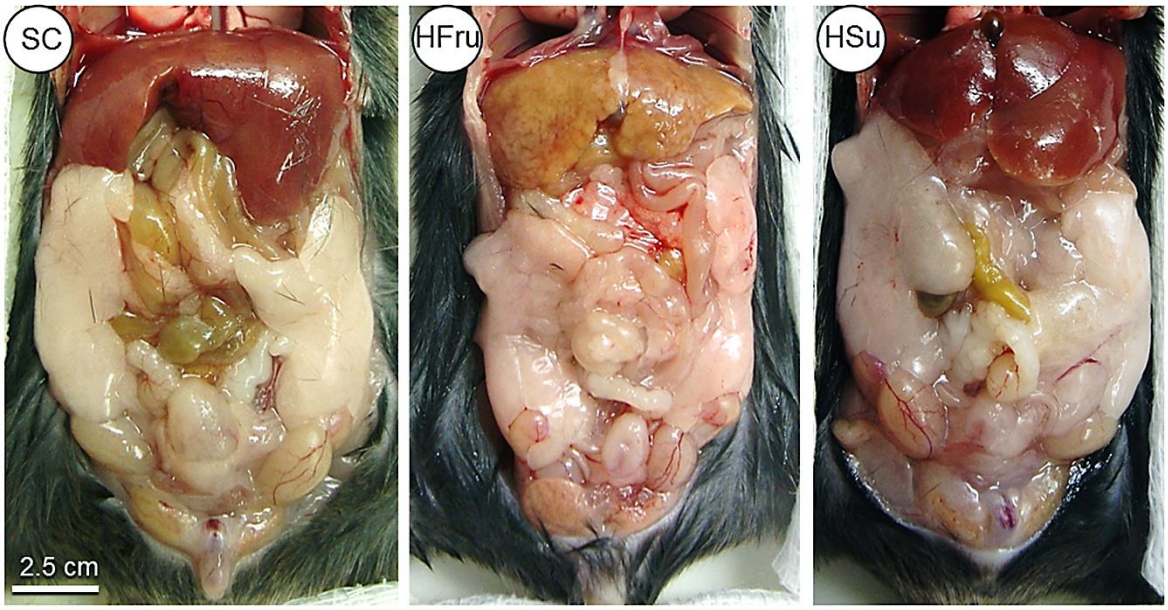
Plasma	**Grupos**		
	SC	**HFru**	**HSu**
Adiponectina (pg/ml - x10^6)	7,1 ± 6,9	4,6 ± 6,6 **[a]**	4,4 ± 6,9 **[a]**
ALT (U/L)	19,8 ± 3,3	45,2 ± 4,2 **[a]**	31,2 ± 1,8 **[a][b]**
AST (U/L)	42,2 ± 4,9	84,6 ± 7,8 **[a]**	80,2 ± 9,6 **[a]**
Colesterol Total (mg/dl)	117,6 ± 6,9	164,5 ± 13,1 **[a]**	159,0 ± 12,3 **[a]**
Glicose (mmol/L)	5,6 ± 0,2	10,3 ± 0,7**[a]**	11,0 ± 1,1 **[a]**
HOMA-IR	5,5 ± 0,9	21,8 ± 4,6 **[a]**	21,3 ± 3,4 **[a]**
Insulina (µIU/L)	18,9 ± 3,8	43,8 ± 7,9 **[a]**	41,0 ± 6,4**[a]**
IL-6 (pg/ml)	6,5 ± 1,5	16,1 ± 1,6 **[a]**	11,9 ± 1,3**[a]**
Leptina (pg/ml - x10^3)	6,1 ± 0,3	9,2 ± 0,9 **[a]**	15,0 ± 0,9 **[a][b]**
MCP-1 (pg/ml)	8,4 ± 0,6	20,1 ± 2,1 **[a]**	30,1 ± 4,1 **[a][b]**
Resistina (pg/ml - x10^3)	1,3 ± 0.05	1,8 ± 0,1 **[a]**	1,7 ± 0.07 **[a]**
Triglicerídeo (mg/dl)	59,4 ± 3,5	75,7 ± 2,8 **[a]**	76,0 ± 2,7 **[a]**

Nota: Valores expressos como média ± erro padrão da média. Diferenças significativas foram consideradas ($P \leq 0,05$) comparados com [a]SC e [b]HFru. Abreviação: HOMA-IR (*homeostasis model assessment for insulin resistance*)

4.2.3 Fígado

O dano hepático foi observado desde a dissecção do órgão, como demostrado na Figura 14, principalmente no grupo HFru.

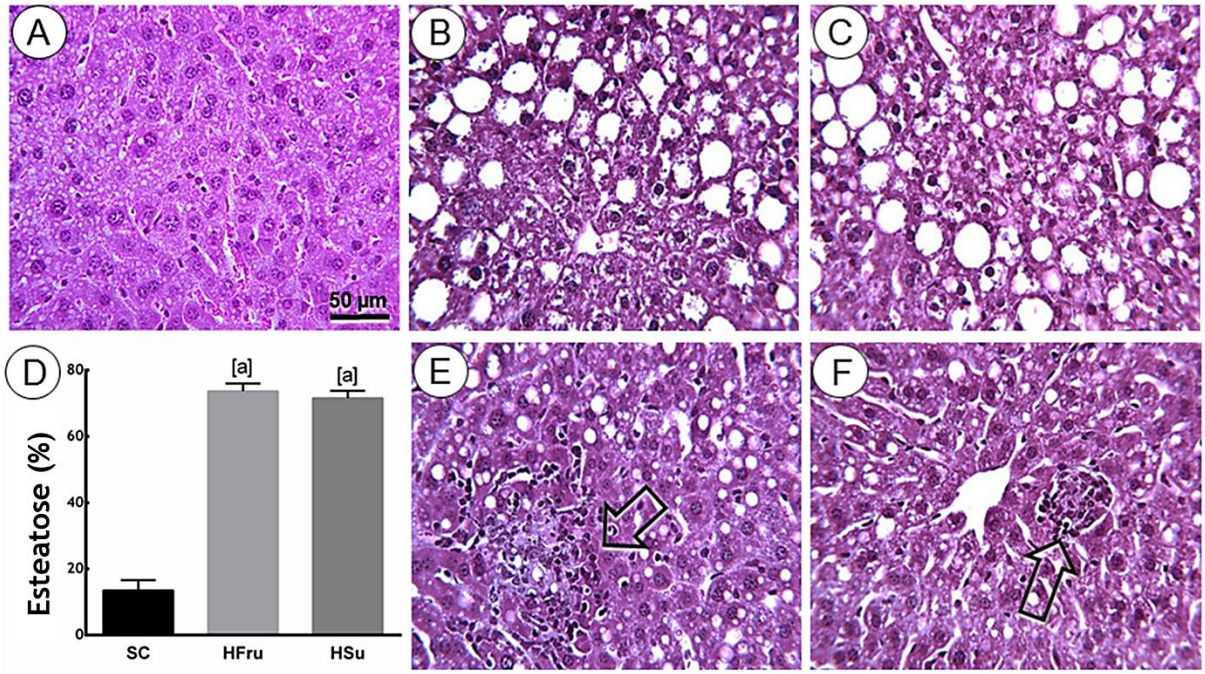
Figura 14- Imagens do fígado in situ



Legenda: SC – standard chow/grupo controle, HFru – grupo high-frutose e HSu – grupo high sucrose

Os fígados dos grupos nutricionais estudados apresentaram abundante infiltrado gorduroso e algumas áreas de necroinflamação, como demonstrado na Figura 15. Foi observado um aumento de 446% de esteatose hepática no grupo HFru (P<0,001) e um aumento de 430% no grupo HSu (P<0,001), quando comparados ao grupo SC.

Figura 15 - Densidade de volume de esteatose hepática



Legenda: Grupos SC – standard chow/grupo controle, HFru – grupo high-frutose e HSu – grupo high sucrose.
Nota: As fotomicrografias demonstram o aumento da NAFLD com macro e microvesículas de gordura; e ainda, a presença de infiltrado necroinflamatório, principalmente nos grupos HFru e HSu.

4.2.4 Expressão proteica e gênica no fígado

Foi observado aumento da lipogênese, da gliconeogênese e redução da beta-oxidação e do balanço antioxidante nos animais que consumiram frutose e sacarose quando comparado aos animais que consumiram dieta controle.

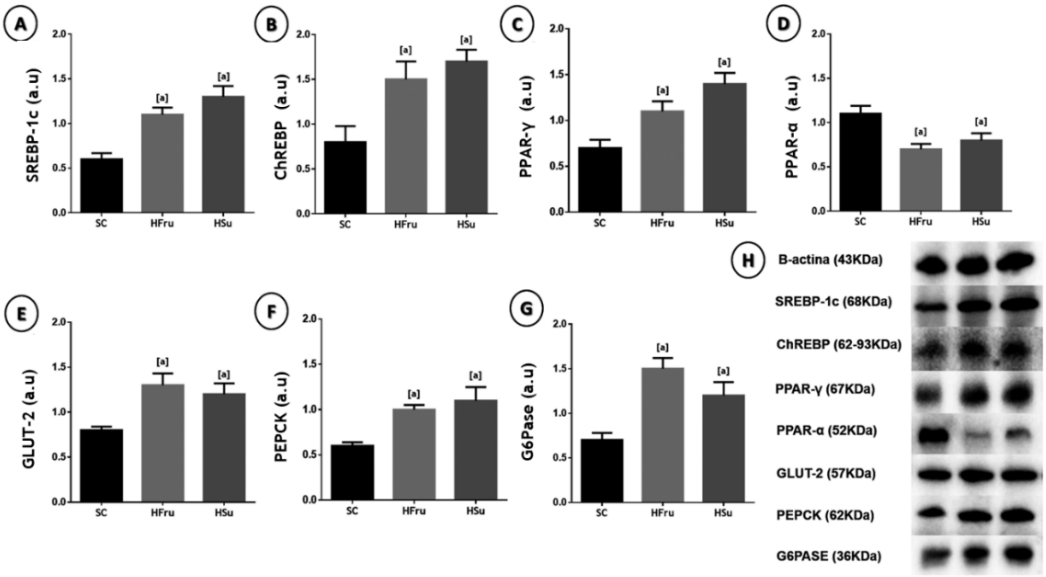
Houve aumento na expressão proteica de SREBP-1c de 83% no grupo HFru (P<0,01) e de 117% no grupo HSu (P<0,001) (Figura 16A); de ChREBP em 88% no grupo HFru (P<0,05) e 113% no grupo HSu (P<0,01) (Figura 16B); e do PPAR-γ em 57% no grupo HFru (P<0,05) e 100% no grupo HSu (P<0,01), ambos comparados ao grupo SC (Figura 16C). Em contrapartida, houve redução do PPAR-α de 37% nos animais HFru (P<0,05) e de 27% nos animais HSu (P<0,05), em relação ao SC (Figura 16D).

Observou-se aumento na expressão das proteínas envolvidas na gliconeogênese: o GLUT-2 foi maior nos grupos HFru (+63%; P<0,05) e HSu (+50%; P<0,05) (Figura 16E); assim como a PEPCK nos grupos HFru (+67%; P<0,05) e HSu (+83%; P<0,01)

(Figura 16F); e, por fim, a G6Pase foi aumentada nos grupos HFru (+114%; *P*<0,01) e HSu (+71%; *P*<0,05), comparados ao grupo SC (Figura 16G).

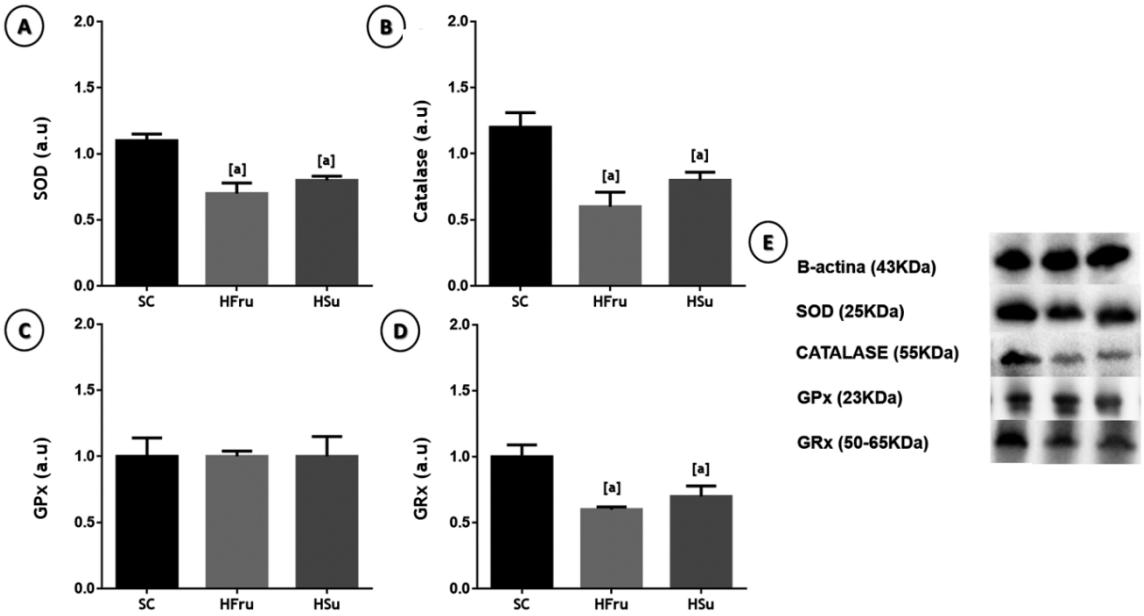
Foi observado alterações no balanço oxidante dos animais HFru e HSu com redução da SOD em 36% no grupo HFru (*P*<0,01) e de 27% no grupo HSu (*P*<0,01) (Figura 17A); da CATALASE em 50% no grupo HFru (*P*<0,01) e de 33% no grupo HSu (*P*<0,05) (Figura 17B); e da GRx em 40% no grupo HFru (*P*<0,01) e de 30% no grupo HSu (*P*<0,05) Figura 17D). Não houve diferença na expressão proteica de GPx entre os três grupos estudados (Figura 17C).

Figura 16- Expressão proteica de fatores de transcrição lipogênicos, oxidativos e glicolíticos



Legenda: (A) SREBP-1c; (B) ChREBP; (C) PPAR-γ; (D) PPAR- α; (E) GLUT-2; (F) PEPCK and (G) G6Pase. Todas as expressões proteicas foram corrigidas pela expressão da β-actina (expressas em unidade arbitrária - *arbitrary units, a.u*); (H) Bandas representativas de cada proteína estudada. Valores expressos como média ± erro padrão da média. Diferenças significativas foram consideradas (*P*≤0,05) comparados com [a]SC e [b]HFru.

Figura 17- Expressão proteica das enzimas antioxidantes

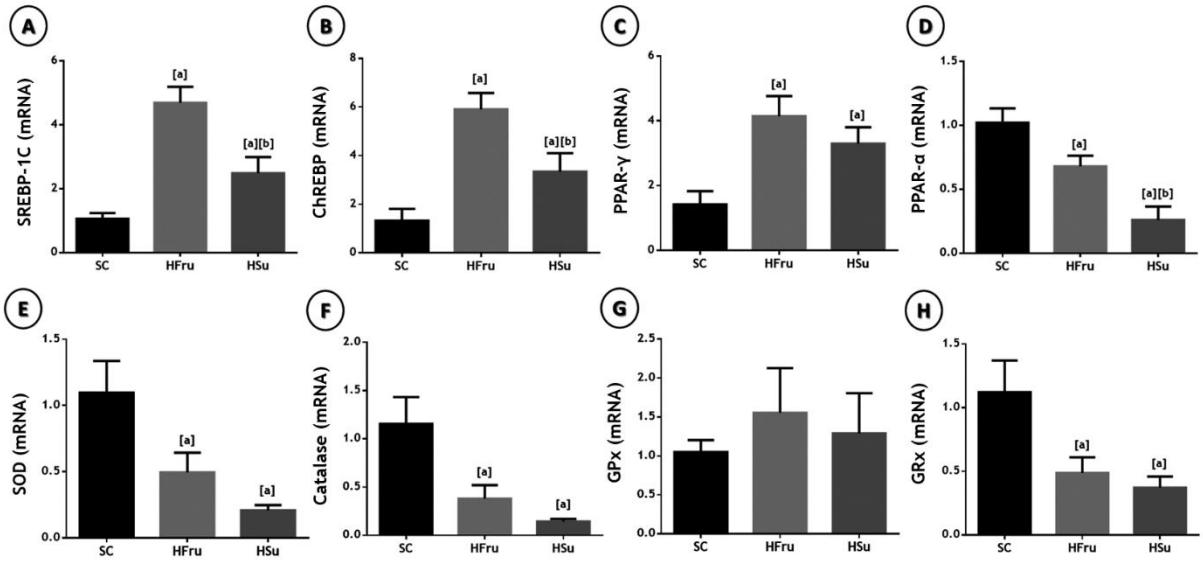


Legenda: (A) SOD; (B) CATALASE; (C) GPx; (D) GRx; Todas as expressões proteicas foram corrigidas pela expressão da β-actina (expressas em unidade arbitrária - *arbitrary units, a.u*); (**E**) Bandas representativas de cada proteína estudada. Valores expressos como média ± erro padrão da média. Diferenças significativas foram consideradas ($P \leq 0,05$) comparados com [a]SC e [b]HFru.

O comportamento da expressão gênica foi similar ao observado na expressão de proteínas. Houve aumento na expressão dos genes alvo da lipogênese e redução na expressão do gene responsável pela beta-oxidação nos grupos dietéticos estudados em relação ao grupo SC. A expressão do RNAm do SREPB-1C foi maior nos grupos HFru (+344%; $P<0,001$) e HSu (+136%; $P<0,05$); o grupo HFru apresentou os maiores valores desta expressão quando comparados ao grupo HSu (+47%; $P<0,01$) (Figura 18A). O mesmo foi observado para expressão do RNAm do ChREBP, houve aumento nos grupos HFru (+345%; $P<0,001$) e HSu (+151%; $P<0,05$); e ainda, o grupo HFru apresentou os maiores valores deste parâmetro, 44% maior que o grupo HSu ($P<0,05$) (Figura 18B). A expressão do RNAm do PPAR-γ também foi maior nos grupos HFru (+193%; $P<0,01$) e HSu (+133%; $P<0,05$) quando comparado ao SC (Figura 18C). Em contrapartida, a expressão do RNAm do PPAR-α foi menor nos grupos HFru (-34%; $P<0,05$) e HSu (-74%; $P<0,001$); a maior redução foi encontrado no grupo HSu (-62%; $P<0,05$), em relação ao grupo HFru (Figura 18D). Esses dados reforçam a prevalência dos genes envolvidos na lipogênese frente a redução da beta-oxidação.

Também foi observado a redução na expressão dos genes responsáveis pelo balanço oxidante nos grupos dietéticos estudados em relação ao grupo SC. Houve redução do RNAm da SOD nos grupos HFru (-55%; *P*<0,05) e HSu (-81%; *P*<0,01) (Figura 18E); do RNAm da Catalase nos grupos HFru (-67%; *P*<0,05) e HSu (-88%; *P*<0,01) (Figura 18F); e do RNAm da GRx nos grupos HFru (-56%; *P*<0,05) e HSu (-67%; *P*<0,05), para todos os genes comparados ao grupo SC (Figura 18H). Não houve diferença significativa na expressão gênica de GPx nos três grupos dietéticos estudados (Figura 18G).

Figura 18- Expressão gênica dos fatores de transcrição envolvidos na lipogênese, na beta-oxidação e na defesa antioxidante



Legenda: (A) SREBP-1c; (B) ChREBP; (C) PPAR-γ; (D) PPAR-α; (E) SOD; (F) CATALASE; (G) GPx and (H) GRx. Controle endógeno, β-actina, foi usada para normalizar a expressão dos genes mencionados. Valores expressos como média ± erro padrão da média. Diferenças significativas foram consideradas (*P*≤0,05) comparados com [a]SC e [b]HFru.

5 **DISCUSSÃO**

Camundongos C57BL/6, quando submetidos à intervenções dietéticas, ricas em gordura ou açúcares, de forma isolada ou combinada, mimetizam uma série de componentes características da síndrome metabólica humana, como a obesidade, a dislipidemia, a resistência à insulina (RI) e a esteatose hepática não alcoólica (NAFLD – nonalcoholic fatty liver disease) (Gallou-Kabani et al., 2007; Takahashi et al., 2012).

A ingestão crônica de dieta hiperlipídica leva ao ganho de peso, desenvolve a RI e a NAFLD, além da produção de citocinas inflamatórias, como bem descrito na literatura. Embora o aumento do consumo de frutose como açúcar de adição tenha um impacto >400kcal/dia/pessoa no mundo, o que corrobora com os dados epidemiológicos atuais da obesidade, os efeitos da frutose, parece, em parte, ser independente do aumento da massa corporal (Janevski et al., 2012; Lustig et al., 2012). Nossos dados demonstram que não houve aumento da massa corporal dos animais que consumiram frutose isoladamente ou sacarose. Em parte, isto pode estar relacionado com o tempo de administração da dieta e/ou a percentual de frutose e sacarose utilizado. E ainda, as dietas foram isoenergéticas entre si. As alterações na massa corporal foram apenas observadas nos grupos que consumiram dieta rica em gordura de forma isolada ou combinada com a frutose, devido à densidade energética do lipídio.

A sacarose é um dissacarídeo formado por glicose e frutose cujos efeitos sobre o perfil dos carboidratos, principalmente sobre o controle da glicemia para indivíduos diabéticos, vêm sendo estudados há alguns anos. Inicialmente acreditou-se que a utilização da frutose para esses indivíduos poderia ser benéfica por minimizar o impacto sobre a glicemia, quando comparado à glicose (Muraki et al., 2013). No entanto, a médio e longo prazo dietas ricas em frutose resultaram em hiperglicemia, hipertrigliceridemia, inflamação, RI e NAFLD, resultados estes também observado com o consumo de sacarose (Schaefer et al., 2009; Tranchida et al., 2012).

A frutose é um carboidrato simples, com baixo índice glicêmico, que retarda a absorção de glicose. No entanto, parece que a médio e longo prazo é capaz de interromper a via de sinalização de insulina, conduzindo à hiperglicemia acompanhada por uma hiperinsulinemia compensatória (Coate et al., 2013). A hiperglicemia e a hiperinsulinemia ocorre possivelmente porque ativam proteínas da família MAPK

(MKK7 e MAPK8) induzindo a fosforilação em serina do receptor de insulina (IRS-1) levando a resistência à insulina hepática (Lim et al., 2010). Este fenômeno, por sua vez suprime a absorção de glicose, levando ao aumento dos níveis de glicose no sangue e um aumento concomitante da secreção insulina. Embora não tenha sido avaliada o IRS-1, a redução de sua fosforilação no fígado dos animais alimentados com frutose pode estar relacionada com a resistência à insulina neste modelo(Bezerra et al., 2000). Os nossos dados indicam que o consumo de frutose e/ou lipídios (isolados ou combinados) e sacarose favoreceram o desenvolvimento da RI, com aumento do HOMA-IR, glicose e insulina plasmática.

Tanto animais quanto humanos alimentados com dietas ricas em sacarose e frutose apresentam aumento de colesterol e triglicerídeo devido ao aumento da produção de VLDL (Fried e Rao, 2003; Tappy et al., 2010). A literatura pontua que, por vias distintas, o consumo de frutose e de sacarose, de forma crônica, levam ao quadro de resistência à insulina e à leptina. Dois mecanismos são propostos para o desenvolvimento da obesidade: o aumento da palatabilidade associada à hiperfagia e ao ganho de peso; e ainda reduzida capacidade de resposta da leptina que contribui para continuidade desde ciclo vicioso, com aumento do consumo nutricional (overnutrition) e ganho de peso (Vasselli, 2012). Embora não tenha sido observada hiperfagia nos nossos dados, a resistência à leptina foi encontrada. O aumento dos níveis de leptina podem ocorrer devido à hiperinsulinemia crônica. Animais submetidos ao consumo de dieta rica em sacarose (32% de sacarose) combinada ou não com uma dieta hiperlipídica (42% de lipídio) por oito semanas, também apresentaram hiperglicemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia, sem incremento da massa corporal no grupo sacarose (Oliveira et al., 2014).

O aumento da lipogênese, dos ácidos graxos livres circulantes, favorecendo o quadro de NAFLD, associado à RI correlacionam-se positivamente com o aumento da inflamação sistêmica (Van Gaal et al., 2006). Estudos recentes já mostram que há aumento pós-prandial das adipocinas inflamatórias IL-6, resistina, leptina e redução da adiponectina entre uma hora e até quatro horas após alimentação rica em frutose (Rodrigues et al., 2014). Outra adipocina envolvida no processo é o MCP-1 que pode induzir a ativação e a infiltração de macrófagos no tecido adiposo e ainda, sua expressão aumentada está correlacionada à NAFLD e a RI (Kamei et al., 2006; Kanda et al., 2006). Os macrófagos, por sua vez, fornecem importante fonte de fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e de IL-6 (Trayhurn e Wood, 2004). No presente estudo,

nós demonstramos aumento de IL-6, MCP-1, leptina, resistina e redução da adiponectina plasmática em ambos os grupos, frutose e sacarose.

No fígado, a frutose é transformada em glicose através da frutoquinase. A glicose será usada pelo próprio fígado com três destinos distintos: gerar energia, para ser convertida em glicogênio hepático ou ser transformada em triglicerídeo. Quando suplanta a capacidade de armazenamento hepático de glicogênio, estes ácidos graxos se depositam no próprio fígado, levando a NAFLD; ou se dirigem à corrente sanguínea e se depositam no tecido adiposo (Fried e Rao, 2003). Além disso, a RI contribui para esta sinalização lipogênica no interior do fígado (Gaggini et al., 2013). Os principais reguladores da lipogênese hepática (de novo lipogenesis – DNL) são o SREBP-1C, ChREBP e o PPAR-γ. Níveis aumentados de SREBP-1c ativam à acetil-CoA carboxylase-2 (ACC2), que é a isoforma da acetil-carboxilase (ACC). Esta última, por sua vez, produz malonil-CoA que inibe a ação da carnitina-palmitol transferase (CPT1), resultando em diminuição da oxidação dos ácidos graxos livres (FFA- fatty free acids), via redução do PPAR-α. E ainda, a atividade aumentada de SREBP-1c resulta em aumento da expressão de PPAR-γ, contribuindo ainda mais para a lipogênese hepática em detrimento a oxidação (Lim et al., 2010; Nomura e Yamanouchi, 2012). Nós observamos aumento da expressão proteica e gênica de SREBP-1c, de PPAR-γ, de ChREBP e redução do PPAR-α, corroborando assim com a NAFLD evidenciada nas fotomicrografias.

O PPAR-γ além de estar diretamente envolvido no metabolismo lipídio, é capaz de regular a expressão de proteínas e de genes envolvidos na homeostase glicídica. Sua ativação induz a expressão de genes envolvidos na sinalização da insulina como a adiponectina, da PEPCK e do receptor de insulin-2 (IRS-2) (Guo e Tabrizchi, 2006).

A PEPCK e G6Pase são as enzimas chave da gliconeogênese e são reguladas em nível transcricional no fígado (Perry et al., 2014). São ativadas pelo glucagon durante o jejum e suprimidas após a alimentação, pela insulina. O GLUT2 também atua neste processo, promovendo o influxo de glucose no fígado no período pós-prandial e o efluxo da mesma em situações de jejum (Guillemain et al., 2000). No entanto, na presença de RI observamos superexpressão de PEPCK, de G6Pase e de GLUT2, como observado em nosso experimento.

O aumento na produção hepática de glicose, em resposta ao aumento da expressão da G6Pase, resulta em ativação da ChREBP e consequente ativação de seus genes-alvo, que inclui: a ACC, a síntese de ácido graxo (FAS – fatty acid

synthase) e a piruvato quinase hepática (L-PK - L-type pyruvate kinase), favorecendo nova síntese de ácidos graxos (DNL) (Garber e Lustig, 2011).

Alterações nas enzimas hepáticas (ALT e AST), em resposta a lesão hepática, também foram observadas no nosso modelo. Recente publicação demonstrou correlação positiva entre a avaliação da ALT com o diagnóstico da NAFLD, da RI e dos marcadores inflamatórios em uma amostra de 348 crianças entre, aproximadamente, 5 e 16 anos de idade (Loureiro et al., 2014).

A presença de NAFLD favorece a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a redução da síntese de antioxidantes hepáticos. Fisiologicamente, níveis baixos de EROS, envolvidos em processos celulares vitais, são necessários indicando o equilíbrio entre a atividade oxidativa e a resposta antioxidante. Por definição, o estresse oxidativo pode ser entendido como o desequilíbrio entre a formação e remoção de agentes oxidantes no metabolismo, decorrente da geração excessiva de EROS e/ou diminuição de antioxidantes endógenos. O fígado é rico em mecanismos de defesa antioxidante que incluem: a glutationa reduzida (GSH), vitaminas C e E, a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutationa peroxidase (GPx) e a glutationa reductase (GRx), dentre outras (Mahan LK, 2008). No entanto, um desequilíbrio na cadeia respiratória mitocondrial é a principal fonte de ROS, superóxido (O2-), peróxido de hidrogênio (H2O2) e radicais hidroxila (H+) (Fraulob et al., 2012). O acúmulo de colesterol tem papel na indução do estresse oxidativo mitocondrial através da depleção da GSH nos hepatócitos e na formação de citocinas pró-inflamatórias (Johnson et al., 2009a). Embora com resultados ainda muito controversos, várias evidências indicam que os mecanismos de defesa antioxidante são reduzidos na presença de NAFLD. Em pacientes com NAFLD foi observado redução do conteúdo de glutationa e da SOD, e aumento destas em pacientes com NASH (Elliott et al., 2002). Em estudo com animais alimentados com dieta hiperlipídica, foi observado redução da GRx, da GPx, da SOD e da CAT (Benton, 2010). Os hepatócitos são muito resistentes ao H2O2, em grande parte, pela alta atividade da CAT, da GRx e da GPx (Nomura e Yamanouchi, 2012). Porém, de forma crônica, a exposição continuada as EROS tende a um desequilíbrio em prol das espécies pró-oxidantes e/ou desequilíbrio das espécies antioxidantes, culminado em lesões hepáticas, como demonstrado neste experimento.

A avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que são formados a partir da peroxidação lipídica e mede o malondialdeído (MDA) gerados a

partir destes hidroperóxidos de lipídios, também é um forma de verificar o dano oxidativo. Ratos Wistar alimentados com frutose por oito semanas apresentaram redução da tolerância à glicose, da sensibilidade à insulina, da SOD, da CAT; e aumento da relação AST/ALT, do triglicerídeo e de TBARS no fígado, mostrando dano hepático significativo (Botezelli et al., 2012).

NASH é definida com a presença de NAFLD e inflamação com lesão hepatocelular (ballooning), com ou sem a presença de fibrose. E a progressão NAFLD-NASH pode ser resultado da lipotoxicidade hepática causada pelo excesso de ácidos graxos, que, por sua vez, pode induzir a formação de EROS resultando em estresse lipotóxico nas mitocôndrias (disfunção mitocondrial) e do retículo endoplasmático, com consequente disfunção e morte celular por apoptose ou necrose (Grundy et al., 2004; Schulze e Hu, 2004; Malhi e Gores, 2008). Além destas alterações funcionais, o fígado gorduroso também apresenta diminuição no parênquima hepático. O constante bombardeio de ácidos graxos promove o aumento do estresse oxidativo, o que favorece a presença de inflamação necrótica, lesão tecidual e fibrose, características estas que definem a progressão da doença para NASH (Souza-Mello et al., 2010; Scully, 2014). Pacientes obesos com lesões fibroinflamatórias também apresentam redução da adiponectina sérica (Cancello et al., 2006). No nosso estudo nós demonstramos que, apesar das dietas ricas em frutose e sacarose não apresentarem impacto positivo sobre o ganho de peso-obesidade, foram evidenciados os fatores que se correlacionam com a transição de NAFLD-NASH: a presença de gordura intrahepática, a redução da adiponectina, a inflamação, o desequilíbrio antioxidante e áreas de necroinflamação.

CONCLUSÃO

Camundongos alimentados com dietas ricas em frutose e sacarose mimetizam vários componentes da síndrome metabólica. Respostas metabólicas dadas pelo consumo de dietas hiperlipídicas são amplamente discutidas na literatura. Este estudo é relevante em demonstrar que, alterações na expressão proteica e gênica da lipogênese, da beta-oxidação, da gliconeogênese e do desequilíbrio antioxidante são independentes do ganho de peso/obesidade. A presença da RI e a transição NAFLD-NASH parecem determinar estes efeitos. Além disso, descrevemos um modelo importante para estudos translacionais, demonstrando que alimentos ricos em frutose e sacarose são tão prejudiciais quanto alimentos ricos em gordura, principalmente a gordura saturada. Assim sendo, seu consumo deve ser controlado.

REFERÊNCIAS

Aguila MB, Pinheiro AR, Parente LB, Mandarim-de-Lacerda CA. Dietary effect of different high-fat diet on rat liver stereology. Liver Int 2003; 23:363-370.

Ahima RS, Flier JS. Leptin. Annu Rev Physiol 2000; 62:413-437.

Aller EE, Abete I, Astrup A, Martinez JA, van Baak MA. Starches, sugars and obesity. Nutrients 2011; 3:341-369.

Barbosa-da-Silva S, da Silva NC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Liver damage is not reversed during the lean period in diet-induced weight cycling in mice. Hepatol Res 2013; 10.1111/hepr.12138.

Barbosa-da-Silva S, Fraulob-Aquino JC, Lopes JR, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Weight cycling enhances adipose tissue inflammatory responses in male mice. PLoS One 2012; 7:e39837.

Basaranoglu M, Basaranoglu G, Sabuncu T, Senturk H. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. World J Gastroenterol 2013; 19:1166-1172.

Bays H, Abate N, Chandalia M. Adiposopathy: sick fat causes high blood sugar, high blood pressure and dyslipidemia. Future Cardiol 2005; 1:39-59.

Benton D. The plausibility of sugar addiction and its role in obesity and eating disorders. Clin Nutr 2010; 29:288-303.

Berson A, De Beco V, Letteron P, Robin MA, Moreau C, El Kahwaji J et al. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. Gastroenterology 1998; 114:764-774.

Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. Liver Int 2006; 26:1175-1186.

Brand-Miller JC, Holt SH, Pawlak DB, McMillan J. Glycemic index and obesity. Am J Clin Nutr 2002; 76:281S-285S.

Bringhenti I, Schultz A, Rachid T, Bomfim MA, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. An early fish oil-enriched diet reverses biochemical, liver and adipose tissue alterations in male offspring from maternal protein restriction in mice. J Nutr Biochem 2011; 22:1009-1014.

Catta-Preta M, Mendonca LS, Fraulob-Aquino J, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. Virchows Arch 2011; 459:477-485.

Cusi K. Nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2009a; 16:141-149.

Cusi K. Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. Clin Liver Dis 2009b; 13:545-563.

Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2002; 16:663-678.

Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? Gastroenterology 1998; 114:842-845.

Day CP, Saksena S. Non-alcoholic steatohepatitis: definitions and pathogenesis. J Gastroenterol Hepatol 2002; 17 Suppl 3:S377-384.

de Oliveira EP, Burini RC. High plasma uric acid concentration: causes and consequences. Diabetol Metab Syndr 2012; 4:12.

Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. Nature 2006; 444:881-887.

Diehl AM. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2002; 282:G1-5.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 2002; 82:47-95.
Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. Am J Clin Nutr 2002; 76:911-922.

Fernandes-Santos C, Carneiro RE, de Souza Mendonca L, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Pan-PPAR agonist beneficial effects in overweight mice fed a high-fat high-sucrose diet. Nutrition 2009; 25:818-827.

Flanagan AM, Brown JL, Santiago CA, Aad PY, Spicer LJ, Spicer MT. High-fat diets promote insulin resistance through cytokine gene expression in growing female rats. J Nutr Biochem 2008; 19:505-513.

Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. J Clin Biochem Nutr 2010; 46:212-223.

Fraulob JC, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effects of rosuvastatin on insulin resistance, adiposity, inflammatory markers and non-alcoholic fatty liver disease in mice fed on a high-fat diet. Clin Sci (Lond) 2012; 123:259-270.

Fried SK, Rao SP. Sugars, hypertriglyceridemia, and cardiovascular disease. Am J Clin Nutr 2003; 78:873S-880S.

Garber AK, Lustig RH. Is fast food addictive? Curr Drug Abuse Rev 2011; 4:146-162.

Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. J Gastroenterol Hepatol 2006; 21 Suppl 3:S3-6.

Goldstein BJ, Scalia R. Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:2563-2568.

Grundy SM. Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy. Nat Rev Drug Discov 2006; 5:295-309.

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

Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. Biochem Soc Trans 2007; 35:1147-1150.

Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. Arch Biochem Biophys 1986; 246:501-514.
Hanover LM, White JS. Manufacturing, composition, and applications of fructose. Am J Clin Nutr 1993; 58:724S-732S.

Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. J Gastroenterol Hepatol 2011; 26 Suppl 1:173-179.

Jalal DI, Smits G, Johnson RJ, Chonchol M. Increased fructose associates with elevated blood pressure. J Am Soc Nephrol 2010; 21:1543-1549.

Janevski M, Ratnayake S, Siljanovski S, McGlynn MA, Cameron-Smith D, Lewandowski P. Fructose containing sugars modulate mRNA of lipogenic genes ACC and FAS and protein levels of transcription factors ChREBP and SREBP1c with no effect on body weight or liver fat. Food Funct 2012; 3:141-149.

Johnson RJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Shafiu M, Sundaram S, Le M et al. Sugar, uric Acid, and the etiology of diabetes and obesity. Diabetes 2013; 62:3307-3315.

Johnson RJ, Perez-Pozo SE, Sautin YY, Manitius J, Sanchez-Lozada LG, Feig DI et al. Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? Endocr Rev 2009; 30:96-116.

Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. J Biol Chem 2006; 281:26602-26614.

Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. J Clin Invest 2006; 116:1494-1505.

Kawasaki T, Igarashi K, Koeda T, Sugimoto K, Nakagawa K, Hayashi S et al. Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. J Nutr 2009; 139:2067-2071.

Kim CH, Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease: a manifestation of the metabolic syndrome. Cleve Clin J Med 2008; 75:721-728.
Kohli R, Kirby M, Xanthakos SA, Softic S, Feldstein AE, Saxena V et al. High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 2010; 52:934-944.

Lee KS, Buck M, Houglum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myb expression. J Clin Invest 1995; 96:2461-2468.

Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2010; 7:251-264.

Lustig RH, Schmidt LA, Brindis CD. Public health: The toxic truth about sugar. Nature 2012; 482:27-29.

M.M LALNDLC. Lehninger: princípios de bioquímica. São Paulo: Savier 2002; 3. ed.

Mahan LK E-SS. The Nutrients and Their Metabolism. Elsevier S, editor. Krause's Food & Nutrition Therapy 2008; 12 ed:p 39-135.

Malaguarnera L, Di Rosa M, Zambito AM, dell'Ombra N, Nicoletti F, Malaguarnera M. Chitotriosidase gene expression in Kupffer cells from patients with non-alcoholic fatty liver disease. Gut 2006; 55:1313-1320.

Malhi H, Gores GJ. Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. Semin Liver Dis 2008; 28:360-369.

Marra F, Gastaldelli A, Svegliati Baroni G, Tell G, Tiribelli C. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. Trends Mol Med 2008; 14:72-81.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia 1985; 28:412-419.

Mayes PA. Intermediary metabolism of fructose. Am J Clin Nutr 1993; 58:754S-765S. McGarry JD. Malonyl-CoA and carnitine palmitoyltransferase I: an expanding partnership. Biochem Soc Trans 1995; 23:481-485.

Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. Clin Chem 2004; 50:1511-1525.

Moeller SM, Fryhofer SA, Osbahr AJ, 3rd, Robinowitz CB. The effects of high fructose syrup. J Am Coll Nutr 2009; 28:619-626.

Morris EM, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA. Mitochondria and redox signaling in steatohepatitis. Antioxid Redox Signal 2011; 15:485-504.

Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, Glushakova O et al. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. Am J Physiol Renal Physiol 2006; 290:F625-631.

Nanji AA. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis. Clin Liver Dis 2004; 8:559-574, ix.

Nascimento FA, Barbosa-da-Silva S, Fernandes-Santos C, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Adipose tissue, liver and pancreas structural alterations in C57BL/6 mice fed high-fat-high-sucrose diet supplemented with fish oil (n-3 fatty acid rich oil). Exp Toxicol Pathol 2010; 62:17-25.

Nomura K, Yamanouchi T. The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. J Nutr Biochem 2012; 23:203-208.

Oliveira LS, Santos DA, Barbosa-da-Silva S, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. The inflammatory profile and liver damage of a sucrose-rich diet in mice. J Nutr Biochem 2014; 25:193-200.

Parker Kea. High fructose corn syrup: Production, uses and public health concerns. Biotechnology and Molecular Biology Review 2010; 5:71-78.

Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondria in steatohepatitis. Semin Liver Dis 2001; 21:57-69.
Pessayre D, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondrial injury in steatohepatitis. Eur J Gastroenterol Hepatol 2004; 16:1095-1105.

Rippe JM, Angelopoulos TJ. Sucrose, high-fructose corn syrup, and fructose, their metabolism and potential health effects: what do we really know? Adv Nutr 2013; 4:236-245.

Robertson G, Leclercq I, Farrell GC. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001; 281:G1135-1139.

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. J Biol Chem 1995; 270:26746-26749.

Schultz A, Mendonca LS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Swimming training beneficial effects in a mice model of nonalcoholic fatty liver disease. Exp Toxicol Pathol 2012; 64:273-282.

Scully T. Public health: Society at large. Nature 2014; 508:S50-51.

Souza-Mello V, Gregorio BM, Cardoso-de-Lemos FS, de Carvalho L, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet. Clin Sci (Lond) 2010; 119:239-250.

Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. Lancet 2003; 361:226-228.

Srivastava S, Chan C. Hydrogen peroxide and hydroxyl radicals mediate palmitate-induced cytotoxicity to hepatoma cells: relation to mitochondrial permeability transition. Free Radic Res 2007; 41:38-49.

Srivastava S, Chan C. Application of metabolic flux analysis to identify the mechanisms of free fatty acid toxicity to human hepatoma cell line. Biotechnol Bioeng 2008; 99:399-410.

Sumida Y, Niki E, Naito Y, Yoshikawa T. Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH. Free Radic Res 2013; 47:869-880.
Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. World J Gastroenterol 2012; 18:2300-2308.

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

Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. Nat Rev Immunol 2006; 6:772-783.

Tomita K, Tamiya G, Ando S, Ohsumi K, Chiyo T, Mizutani A et al. Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. Gut 2006; 55:415-424.

Unger RH. Lipotoxic diseases. Annu Rev Med 2002; 53:319-336.

Walker CG, Zariwala MG, Holness MJ, Sugden MC. Diet, obesity and diabetes: a current update. Clin Sci (Lond) 2007; 112:93-111.

Wiernsperger N, Geloen A, Rapin JR. Fructose and cardiometabolic disorders: the controversy will, and must, continue. Clinics (Sao Paulo) 2010; 65:729-738.

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nat Med 2002; 8:1288-1295.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 1994; 372:425-432.