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

Liliane Soares Corrêa de Oliveira

# Dieta rica em sacarose: perfil inflamatório e danos hepáticos em camundongos

Rio de Janeiro
2013

Liliane Soares Corrêa de Oliveira

**Dieta rica em sacarose: perfil inflamatório e danos hepáticos em camundongos**

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

Orientadora: Prof.ª Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda

Rio de Janeiro

2013

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

O48 Oliveira, Liliane Soares Corrêa de.
Dieta rica em sacarose: perfil inflamatório e danos hepáticos em camundongos / Liliane Soares Corrêa de Oliveira. – 2013.
64 f.

Orientadora: Márcia Barbosa Àguila Mandarim-de-Lacerda.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Sacarose na dieta – Teses. 2. Gorduras na dieta – Teses. 3. Tecido adiposo – Teses. 4. Fígado gorduroso. 5. Adipocinas. 6. Inflamação. I. Mandarim-de-Lacerda, Márcia Barbosa Àguila. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. III. Título.

CDU 616.24

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

Assinatura Data

Liliane Soares Corrêa de Oliveira

**Dieta rica em sacarose: perfil inflamatório e danos hepáticos em camundongos**

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

Aprovada em 18 de julho de 2013.

Banca Examinadora:

_____

Prof[a]. Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof.[a] Dra. Sílvia Maria Custódio das Dôres
Universidade Federal Fluminense

_____

Prof.[a] Dra. Cristiane Matsuura
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2013

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ana e Nilson,
que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui.
Ao Paschoal, sempre ao meu lado.

## AGRADECIMENTOS

A Deus! Pelo inesgotável amor, por ter concedido saúde, força e tantas bênçãos em minha vida.

Aos meus pais, Nilson e Ana, pelo apoio e amor incondicionais. Por acreditarem em mim e me concederem toda a base necessária para essa conquista. Vocês são a fonte de toda minha inspiração, exemplo de luta e trabalho. Obrigada por compreenderem a minha ausência, pelos conselhos, por estarem sempre comigo, mesmo que um pouquinho distante, e principalmente, por me fazerem feliz! Amo vocês!

À minha mãe Ana, pelo exemplo de “professora”, acho que este dom também herdei de você!

Ao meu amado esposo Paschoal. Sem você eu não teria chegado até aqui! Durante este meu período no laboratório, você passou de namorado a noivo e a esposo. Não preciso nem dizer que foi uma das fases mais importantes em minha vida! Obrigada por acreditar em mim, por me apoiar a cada dia, pelo seu incentivo, pelas palavras amigas e de carinho, por sempre me escutar, secar as minhas lágrimas, me transmitir paz e confiança. Obrigada pela sua compreensão! Amo você!

À minha irmã Simone, pelos conselhos, palavras amigas e por me escutar tantas vezes... Obrigada pelo apoio constante! À minha sobrinha e afilhada Elisa Luz. Por todos os momentos de alegria vividos juntas! Obrigada por aceitar a minha ausência e por me fazer divertir nos momentos de descanso!

Aos pais do Paschoal, Jalva e Paschoal Oliveira, por me apoiarem sempre.

À minha orientadora, Prof.ª Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda, que me acolheu no laboratório e não mediu esforços para me orientar. Obrigada por confiar no meu potencial, por me abrir as portas para a pesquisa básica, pelos inúmeros ensinamentos (até mesmo lidar com os animais), pela sua dedicação e compreensão.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, por ter me recebido no seu grupo de pesquisa, por ter confiado no meu trabalho, por todos os ensinamentos diários. Esse período no laboratório foi para mim, de grande crescimento pessoal e profissional. Estou feliz em saber que vou continuar trabalhando próxima de vocês!

Ao Prof. Dr. Sérgio Cunha, por me convencer a trabalhar com animais e me apresentar ao Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doenças Cardiovasculares (LMMC), obrigada pela oportunidade a mim concedida e por acreditar no meu trabalho desde o período da residência.

À amiga Sandra, que após o meu primeiro ano de mestrado, além de se tornar minha vizinha, se tornou uma grande amiga e “coorientadora” na pesquisa e na vida. Obrigada por todos os seus conselhos e orientações, você também foi fundamental para a conclusão deste trabalho!

A todos os colegas do LMMC! À Flávia Lima pela companhia nos estudos para prova, seminários e durante o período do biotério (longos sacrifícios), obrigada por tudo! Às companheiras dos dias de sacrifícios, Fernanda Ornellas, Marcela Anjos e Eliete Frantz, muito obrigada! Ornellas obrigada por me apresentar o laboratório e por todos os seus conselhos. Eliete, não tenho nem como agradecer a sua boa vontade em ensinar sempre, muito obrigada! E a todos os outros alunos, Isabele, Alini Schultz, Jéssica, D’Angelo, Thereza, Franciele, André, Victor, Marcel, Aline Penna, Jorge, Hélder, Fernanda Cavalcante, Flávia Gombar e Paula, e as professoras Cristiane Ramos, Vanessa Mello e Tatiane Faria, integrantes do LMMC, todos contribuíram de alguma forma para este trabalho, muito obrigada!

Aos técnicos do LMMC Aline Penna, Thatiany Marinho, Gezileia Lau, Michele Soares e Willian Lannes por todo o apoio técnico, vocês foram fundamentais.

Aos meus alunos de iniciação científica, Igor, que colaborou com a parte inicial deste trabalho, e Daiane, que esteve sempre presente com muita dedicação. Torço pelo sucesso de vocês! Obrigada!

Deixe que a alimentação seja o seu remédio
e o remédio a sua alimentação.
*Hipócrates*

**RESUMO**

OLIVEIRA, Liliane Soares Corrêa de. *Dieta rica em sacarose:* perfil inflamatório e danos hepáticos em camundongos. 2013. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2013.

Ainda não está bem definido na literatura se uma dieta rica em sacarose, mesmo sendo isoenergética, provoca danos à saúde. Camundongos C57BL/6 foram alimentados com uma dieta controle (10% da energia proveniente de gordura, 8% da energia proveniente da sacarose - SC), uma dieta rica em sacarose (10% de energia proveniente da gordura, 32% da energia proveniente da sacarose - HSu), uma dieta hiperlipídica (42% da energia proveniente de gordura, 8% da energia proveniente da sacarose - HF) ou uma dieta combinada HF/HSu (42% da energia proveniente de gordura, 32% da energia proveniente da sacarose), durante oito semanas. Apesar da massa corporal e do índice de adiposidade não terem sofrido alteração, o grupo HSu apresentou hipertrofia dos adipócitos, o que também foi observado nos grupos HF e HF/HSu. Os grupos HF, HSu e HF/HSu foram intolerantes à glicose e apresentaram níveis séricos de insulina elevados. Os níveis séricos de leptina, resistina e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) aumentaram, enquanto adiponectina sérica reduziu nos grupos HF, HSu e HF/HSu. No tecido adiposo, os animais HF, HSu e HF/HSu apresentaram maiores níveis de expressão protéica de leptina e níveis mais baixos de expressão protéica de adiponectina, em comparação ao grupo SC. Colesterol hepático foi maior nos grupos HF e HF/HSu, enquanto TG hepático foi maior nos grupos HSu e HF/HSu. Os animais dos grupos HF, HSu e HF/HSu apresentaram esteatose hepática, aumento da expressão protéica hepática de elemento regulador de esterol ligante da proteína 1 (SREBP-1c) e diminuição da expressão protéica do receptor ativador de proliferação peroxissomal alfa (PPAR-α). Em conclusão, a dieta rica em sacarose não provoca obesidade nos animais, mas provoca alterações nos adipócitos (hipertrofia), intolerância à glicose, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, esteatose hepática e aumento de citocinas inflamatórias. Os efeitos prejudiciais da dieta rica em sacarose, mesmo quando a sacarose substitui isocaloricamente o amido na alimentação, pode ter consequências para a saúde.

Palavras-chave: Dieta rica em sacarose. Dieta hiperlipídica. Tecido adiposo. Fígado. Adipocinas. Inflamação.

**ABSTRACT**

It is still unclear if an isoenergetic, sucrose-rich diet leads to health consequences. Mice were fed a control diet (10% energy from fat, 8% energy from sucrose - SC), a high-sucrose diet (10% energy from fat, 32% energy from sucrose - HSu), a high-fat diet (42% energy from fat, 8% energy from sucrose - HF) or a HF/HSu diet (42% energy from fat, 32% energy from sucrose) for eight weeks. Despite the unchanged body mass and adiposity indices, HSu presented adipocyte hypertrophy, which was also observed in the HF and HF/HSu. The HF, HSu and HF/HSu were glucose intolerant and had elevated serum insulin levels. The levels of leptin, resistin and Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) increased, while the serum adiponectin decreased in the HF, HSu and HF/HSu. In the adipose tissue, the HF, HSu and HF/HSu showed higher levels of leptin protein expression and lower levels of adiponectin protein expression in comparison with the SC. Hepatic cholesterol was higher in the HF and HF/HSu, while hepatic TG was higher in the HSu and HF/HSu. Liver steatosis was higher, sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) hepatic expression was increased, and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR-α) hepatic protein expression was decreased in the HF, HSu and HF/HSu in comparison with the SC. In conclusion, a sucrose-rich diet does not lead to a state of obesity but has the potential to cause changes in the adipocytes (hypertrophy) as well as glucose intolerance, hyperinsulinemia, hyperlipidemia, hepatic steatosis, and increases in the number of inflammatory cytokines. The deleterious effects of a sucrose-rich diet in an animal model, even when the sucrose replaces starch isocalorically in the feed, can have far-reaching consequences for health.

Keywords: High-sucrose diet. High-fat diet. Adipose tissue. Liver. Adipokines. Inflammation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos potenciais da inflamação induzida por obesidade..... 24
Figura 2 – Interação entre o tecido adiposo e o fígado..... 27
Figura 3 – Evolução da massa corporal dos grupos estudados..... 36
Figura 4 – Distribuição do tamanho dos adipócitos e fotomicrografias do tecido adiposo..... 41
Figura 5 – Densidade de volume de esteatose hepática e fotomicrografias representativas do fígado..... 42
Figura 6 – Expressão protéica de adiponectina e leptina no tecido adiposo epididimal corrigidas por beta-actina..... 46
Figura 7 – Expressão protéica hepática de SREBP-1c e PPAR-α, corrigidas por beta-actina..... 47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição e conteúdo energético das dietas experimentais..... 29
Tabela 2 – Parâmetros biométricos e bioquímicos dos camundongos dos grupos estudados..... 38
Tabela 3 – Dados sobre tecido adiposo, adipocinas e fígado dos camundongos dos grupos estudados..... 44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| AGLs | Ácidos graxos livres |
| AGM | Ácidos graxos monoinsaturados |
| AGP | Ácidos graxos poli-insaturados |
| AGS | Ácidos graxos saturados |
| AIN | American Institute of Nutrition = Instituto americano de nutrição |
| ASC | Área sob a curva |
| CT | Colesterol total |
| EA | Eficiência alimentar |
| HE | Hematoxilina e Eosina |
| HF | High-Fat = grupo dieta hiperlipídica |
| HF/HSu | High-Fat-High-Sucrose = grupo dieta hiperlipídica e rica em sacarose |
| HSu | High-Sucrose = grupo dieta rica em sacarose |
| I/G | Razão Insulina / Glicose |
| IL-6 | Interleucina-6 |
| IOM | Institute of Medicine = Instituto de medicina |
| MCP-1 | Monocyte Chemotactic Protein-1 = Proteína quimiotática de monócitos-1 |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PAI-1 | Plasminogen activator inhibitor-1 = Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 |
| $P_P$ | Pontos parciais |
| PPAR | Peroxisome Proliferator-Activated Receptor = Receptor ativador de proliferação peroxissomal |
| $P_T$ | Pontos totais |
| RI | Resto-ingestão |
| SC | Standard Chow = grupo dieta controle |
| SCD-1 | Estearoil-CoA desaturase-1 |
| SREBP-1c | Sterol Receptor Element Binding Protein-1c = Elemento regulador de esterol ligante da proteína 1 |
| TG | Triglicerídeos |
| TNF-α | Tumor Necrosis Factor-alpha = Fator de necrose tumoral-alfa |

| | |
|---|---|
| TOTG | Teste Oral de Tolerância à Glicose |
| VET | Valor Energético Total |
| VLDL | Lipoproteína de densidade muito baixa |
| Vv | Densidade de volume |

**SUMÁRIO**


| | | |
|---|---|---|
| | **INTRODUÇÃO** | 14 |
| 1 | **OBJETIVOS** | 16 |
| 1.1 | **Geral** | 16 |
| 1.2 | **Específicos** | 16 |
| 2 | **REVISÃO DE LITERATURA** | 17 |
| 2.1 | **Macronutrientes** | 17 |
| 2.1.1 | Sacarose | 17 |
| 2.1.2 | Lipídios | 19 |
| 2.2 | **Tecido adiposo e inflamação** | 21 |
| 2.3 | **Dieta e danos hepáticos** | 24 |
| 3 | **MATERIAL E MÉTODOS** | 28 |
| 3.1 | **Animais e dieta** | 28 |
| 3.2 | **Massa corporal e ingestão alimentar** | 29 |
| 3.3 | **Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)** | 30 |
| 3.4 | **Eutanásia** | 30 |
| 3.5 | **Análises plasmáticas** | 31 |
| 3.6 | **Quantificação de adipócitos** | 32 |
| 3.7 | **Estrutura e bioquímica hepática** | 32 |
| 3.8 | **Western blot** | 33 |
| 3.9 | **Análise estatística** | 34 |
| 4 | **RESULTADOS** | 35 |
| 4.1 | **Massa corporal e ingestão alimentar** | 35 |
| 4.2 | **Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)** | 36 |
| 4.3 | **Análises Plasmáticas** | 37 |
| 4.4 | **Insulina de jejum e razão Insulina/Glicose (I/G)** | 37 |
| 4.5 | **Adipocinas** | 39 |
| 4.6 | **Tecido adiposo** | 39 |
| 4.7 | **Fígado** | 42 |
| 4.8 | **Western blot** | 45 |
| 5 | **DISCUSSÃO** | 48 |
| 6 | **CONCLUSÃO** | 52 |
| | **REFERÊNCIAS** | 53 |
| | **ANEXO A -** Comprovante de submissão de artigo científico | 63 |
| | **ANEXO B -** Comitê de ética em experimentação animal | 64 |

## INTRODUÇÃO

Atualmente os hábitos alimentares vêm sofrendo alterações, particularmente no que toca ao conteúdo de açúcar nas dietas. Por isso, torna-se imperativo o interesse em estudar o papel dos tipos de carboidratos na dieta, na prevenção ou na promoção de desordens do metabolismo lipídico e de carboidratos, bem como suas repercussões nos diversos órgãos e tecidos. O consumo exagerado de açúcares, tais como aqueles abundantes em muitos refrigerantes e bebidas adocicadas pode estar associado ao aumento da prevalência da obesidade, do diabetes (Nikpartow *et al.*, 2012) e das doenças cardiovasculares (Malik *et al.*, 2010).

A sacarose é um dissacarídeo que consiste de um monômero de glicose e um monômero de frutose ligados por ligações glicosídicas (White, 2008; Wolf *et al.*, 2008). Estudos têm sugerido que dietas ricas em hidratos de carbono simples apresentam alta carga glicêmica e representam uma das principais causas de obesidade e de distúrbios metabólicos em humanos (Brand-Miller *et al.*, 2002; Schulze e Hu, 2004). Estudos mostram que o consumo de frutose em grande quantidade na dieta (e estes estudos têm relação direta com a sacarose, uma vez que este dissacarídeo é a principal fonte dietética de frutose) provoca aumento da adiposidade visceral, desequilíbrio no metabolismo de lipídios e favorece o desenvolvimento de resistência à insulina (Stanhope e Havel, 2010), além de aumento da lipogênese de novo e de acúmulo ectópico de gordura no fígado e no músculo esquelético (Unger, 2003; Faeh *et al.*, 2005), efeitos semelhantes ao observado com o elevado consumo de sacarose (Stanhope *et al.*, 2009).

Estes efeitos favorecem o desenvolvimento de síndrome metabólica em longo prazo (Tappy *et al.*, 2010). Por outro lado, não há evidências consistentes de que a restrição de sacarose em uma dieta isoenergética possa alterar os indicadores de risco cardiometabólicos, com exceção, talvez, de indivíduos com anormalidades metabólicas pré-existentes (Gibson *et al.*, 2013). E ainda está em questão, se níveis normais ou moderados de frutose na dieta, podem induzir efeitos adversos consideráveis (Livesey, 2009). Neste caso, o excesso energético pode ser mais importante, tendo em vista que, na maioria das vezes, uma dieta rica em frutose está associada a uma dieta hiperlipídica ou rica em sacarose (Tappy *et al.*, 2010).

As consequências de dietas hiperlipídicas já são bem estabelecidas na literatura especializada (Fraulob *et al.*, 2010; Barbosa-da-Silva *et al.*, 2012; Catta-Preta *et al.*, 2012). Porém, dietas ricas em hidratos de carbono simples, particularmente a sacarose, ainda necessitam de mais estudos sobre o seu verdadeiro papel no desequilíbrio orgânico.

Entretanto, na vida moderna, é cada vez mais comum o consumo de dietas hiperlipídicas e/ou ricas em sacarose. Mas a real interação entre esses dois hábitos alimentares nos parâmetros metabólicos, na gênese e consequências da obesidade e nos efeitos adversos à saúde ainda não está bem clara. Por isso, este estudo foi concebido para testar a seguinte hipótese: dietas com sobrecarga de sacarose e/ou gordura podem provocar respostas diferenciadas no tecido adiposo, no fígado e no perfil inflamatório de camundongos.

# 1 **OBJETIVOS**

## 1.1 **Geral**

Verificar os efeitos de uma dieta com sobrecarga de sacarose no perfil inflamatório, tecido adiposo e fígado de camundongos C57BL/6 em comparação com uma dieta hiperlipídica.

## 1.2 **Específicos**

Avaliar nos animais submetidos às dietas com sobrecarga de sacarose e/ou lipídios os seguintes parâmetros:

- Evolução da massa corporal
- Metabolismo glicídico
- Perfil lipídico (colesterol total, triglicerídeos)
- Parâmetros morfológico-quantitativos do tecido adiposo e do fígado
- Citocinas inflamatórias secretadas pelo tecido adiposo branco: adiponectina, leptina, resistina e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1)
- Marcadores de lipogênese e beta-oxidação no fígado: elemento regulador de esterol ligante da proteína 1 (SREBP-1c) e receptor ativador de proliferação peroxissomal-alfa (PPAR-α).

# 2 **REVISÃO DE LITERATURA**

## 2.1 **Macronutrientes**

### 2.1.1 Sacarose

Carboidratos são produzidos por plantas e são as principais fontes de energia na dieta compreendendo cerca de metade das calorias totais. Os carboidratos são compostos de carbono, hidrogênio e oxigênio na razão C:O:$H_2$. Hidratos de carbono dietéticos importantes podem ser categorizados como (1) monossacarídeos, (2) dissacarídeos e oligossacarídeos, e (3) polissacarídeos. Os monossacarídeos não ocorrem normalmente como moléculas livres na natureza, mas como componentes dos dissacarídeos e polissacarídeos, os mais importantes na dieta humana são aqueles com 3 a 6 carbonos, como glicose, galactose e frutose (Cummings *et al.*, 1997; FAO/WHO, 1998). Embora exista uma variedade ampla de dissacarídeos e oligossacarídeos na natureza, os três dissacarídeos mais importantes na nutrição humana são: sacarose, lactose e maltose. Estes açúcares são formados de monossacarídeos unidos por uma ligação glicosídica entre o aldeído ou cetona e um grupo hidroxila específico de outro açúcar. Os polissacarídeos são carboidratos com mais de dez unidades de monossacarídeos, são armazenados nas plantas como grãos de amido (Cummings e Stephen, 2007; Palou *et al.*, 2009).

A sacarose é um dissacarídeo formado pela ligação de uma unidade de glicose e uma unidade de frutose. É a principal forma em que a glicose é transportada entre células vegetais, é o açúcar de mesa comum, ocorre naturalmente em muitos alimentos e é também um aditivo em itens comerciais processados; é consumida em grandes quantidades por americanos (White, 2008; Wolf *et al.*, 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).

De acordo com o Instituto de Medicina (IOM), deve-se usar uma recomendação diária de 45-65% do valor energético total (VET) da dieta provenientes do grupo

de carboidratos, e menos de 25% da energia diária de açúcares (Trumbo *et al.*, 2002). Dados disponíveis de inquéritos alimentares nacionais mostram um consumo mundial de açúcares, entre 10% e 21% da ingestão diária de energia (Ruxton *et al.*, 2010). No que diz respeito ao açúcar de adição, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda uma ingestão de não mais que 10% do VET (WHO/FAO, 2003).

O Instituto Americano de Nutrição (AIN-93), em 1993, alterou as recomendações de dietas para roedores, sendo tais recomendações utilizadas até os dias atuais. Em relação aos carboidratos, houve redução na recomendação de sacarose, devido aos seus efeitos adversos, sendo substituída em partes por amido de milho. A recomendação diária internacional preconizada para animais adultos, em fase de manutenção é: sacarose: 100g/Kg de dieta; amido de milho dextrinizado: 155g/Kg de dieta e amido de milho: 470g/Kg de dieta (Reeves *et al.*, 1993).

Ao longo dos últimos 50 anos, o consumo de açúcar triplicou em todo o mundo. Nos Estados Unidos, há controvérsias sobre o uso generalizado de um açúcar de adição em particular – o xarope de milho rico em frutose (*High-fructose-corn-syrup*). Ele é fabricado a partir de xarope de milho (glicose) e processado para se obter uma mistura aproximadamente igual de glicose e frutose (Fulgoni, 2008). A maioria dos outros países desenvolvidos evita o uso de xarope de milho, acreditando que a sacarose seja um açúcar de adição natural, que também consiste de partes iguais de glicose e frutose (Lustig *et al.*, 2012).

Autoridades consideram açúcar como “calorias vazias”, mas não há nada de vazio sobre essas calorias. Um número crescente de dados científicos mostra que a frutose pode desencadear processos que levam à toxicidade hepática e uma série de outras doenças crônicas (Bizeau e Pagliassotti, 2005).

O destino metabólico da glicose e frutose, além da degradação para a produção de ATP, também inclui armazenamento na forma de glicogênio ou conversão em ácidos graxos (Walker *et al.*, 2007). A exposição prolongada ao excesso de glicose regula a transcrição do fator lipogênico SREBP-1c e dos principais genes que codificam enzimas lipogênicas no músculo (Aas *et al.*, 2004; Guillet-Deniau *et al.*, 2004), permitindo um aumento na capacidade de síntese de ácidos graxos (Abu-Elheiga *et al.*, 2001).

É importante considerar que o açúcar pode induzir todas as doenças associadas com a síndrome metabólica, como por exemplo, hipertensão arterial sistêmica (pelo aumento do ácido úrico), hipertrigliceridemia, resistência à insulina através da

lipogênese hepática e diabetes (pelo aumento da produção de glicose hepática combinada com resistência à insulina) (Tappy *et al.*, 2010).

Além disso, existe uma tendência ao uso abusivo de açúcar, assim como o tabaco e o álcool, ele age no cérebro, induzindo ingestões subsequentes (Benton, 2010; Lustig *et al.*, 2012). Existem vários estudos que avaliam as propriedades do açúcar produzir dependência em humanos (Cummings e Foster, 2003; Garber e Lustig, 2011). Especificamente, o açúcar atenua a supressão do hormônio grelina, o qual sinaliza a fome para o cérebro (Cummings *et al.*, 2001; Sanchez *et al.*, 2010). Ele também interfere com o transporte normal e com a sinalização do hormônio leptina, o qual ajuda a produzir a sensação de saciedade (Ahima e Flier, 2000; Pico *et al.*, 2003). O açúcar ainda reduz a sinalização de dopamina no centro de recompensa do cérebro, diminuindo assim o prazer derivado da alimentação e convencendo o indivíduo a consumir mais (Lustig, 2010).

### 2.1.2 Lipídios

Os lipídios constituem importante fonte de energia na dieta. Fornecem nove quilocalorias por cada grama de lipídio consumida, atuando também como reserva energética. Os seres humanos são capazes de obter energia suficiente com um consumo diário razoável de alimentos ricos em lipídios (Saúde, 2008). As principais fontes de lipídios da dieta são os triglicerídeos que são compostos por três cadeias de ácidos graxos ligados a uma cadeia de glicerol (Fritsche, 2006).

Os ácidos graxos, lipídios simples, ocorrem principalmente como cadeias de hidrocarbonetos não ramificados, com um número par de átomos de carbono e são classificados de acordo com o número de átomos de carbono, o número de ligações duplas e a posição das ligações duplas na cadeia. Nos ácidos graxos saturados (AGS), todos os locais de ligação do carbono não ligados a outro carbono estão ligados ao hidrogênio e, portanto, são saturados, não há duplas ligações entre átomos de carbono. Os ácidos graxos monoinsaturados (AGM) contêm apenas uma ligação dupla, e os ácidos graxos poli-insaturados (AGP) contêm duas ou mais ligações duplas (Schachter *et al.*, 2004; McCowen e Bistrian, 2005).

O “Guia Alimentar para a População Brasileira” preconiza que o consumo diário de gorduras não ultrapasse 15% a 30% do VET da alimentação. O consumo excessivo de gorduras saturadas está relacionado a várias doenças crônicas não transmissíveis (doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, acidentes cerebrovasculares e câncer). Dessa forma, o consumo de gordura saturada não deve ultrapassar 10% do total da energia diária e o total de gordura trans consumida deve ser menor que 1% do valor energético total diário (no máximo 2g/dia para uma dieta de 2.000 kcal) (Saúde, 2008).

O Instituto Americano de Nutrição, em 1993, propôs alteração na recomendação de lipídios dietéticos para roedores, sendo determinada a substituição do óleo de milho por óleo de soja, devido ao melhor requerimento de ácido graxo linolênico e a adequada relação entre ácido graxo linoléico (n-6) e ácido graxo linolênico (n-3). O óleo de soja é a fonte de lipídio dietético que melhor se adéqua a este critério, sendo sua composição: AGS = 14%; AGM = 23%; ácido linoléico: 51% e ácido linolênico: 7%. Isto fornece uma relação (n-6):(n-3) de 7 e AGP:AGS de 4. A recomendação diária internacional preconizada de óleo de soja para animais adultos, em fase de manutenção é: 40g/Kg de dieta (Reeves *et al.*, 1993).

Os efeitos deletérios das dietas com sobrecarga de gordura saturada já estão bem descritos na literatura. 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 resistência à insulina, hipertensão e obesidade, em modelos animais e humanos (Walker *et al.*, 2007; Flanagan *et al.*, 2008), além de hipertrofia de adipócitos (Barbosa-da-Silva *et al.*, 2012), diabetes mellitus, hipetrigliceridemia (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).

Existe paralelos entre os efeitos das dietas ricas em frutose e das dietas ricas em gorduras saturadas em induzir resistência à insulina, o que pode ser devido ao aumento na captação de lipídios nos tecidos sensíveis à insulina (Walker *et al.*, 2007). No entanto, isto pode ser amenizado pela redução de lipídios circulantes e pela dissipação de lipídios nos tecidos, como por exemplo, com alimentação restrita em gordura, jejum e exercício ou ativação do PPAR- α (Furuhashi *et al.*, 2002; Nagai *et al.*, 2002; Holness *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2003).

Ácidos graxos poli-insaturados são ativadores mais potentes do PPAR-α que os ácidos graxos saturados ou monoinsaturados (Lin *et al.*, 1999), no entanto, PPAR-α é ativado durante a alimentação crônica rica em gordura saturada e age como mediador do efeito desta alimentação sobre a expressão gênica hepática (Patsouris *et al.*, 2006).

## 2.2 **Tecido Adiposo e Inflamação**

O tecido adiposo é considerado um reservatório de energia, nos seres humanos, 15 kg de gordura corporal fornece cerca de 110.000 Kcal, suficientes para a sobrevivência por cerca de dois meses. Além disso, o tecido adiposo tem uma notável capacidade de expansão, para aumentar o número de células, os adipócitos, individualmente, podem alterar seus volumes até mil vezes, tornando-se ingurgitados com triglicerídeos (TG) (Fruhbeck *et al.*, 2001). É o principal estoque de TG no corpo, portanto contribui significativamente para o metabolismo de nutrientes em vários tecidos e influencia a concentração plasmática de ácidos graxos e glicose (Sun *et al.*, 2012).

No estado alimentado, a insulina aumenta o estoque de TG no adipócito. Isto ocorre pelo aumento da captação de glicose pelos adipócitos, permitindo a produção de glicerol-3-fosfato para a esterificação de ácidos graxos para formar TG, bem como a síntese de novo de ácidos graxos (Guan *et al.*, 2002; Picard e Auwerx, 2002; Tordjman *et al.*, 2003).

Durante a obesidade, muitas células do sistema imunológico infiltram o tecido adiposo e promovem uma inflamação crônica de baixo grau. Os estudos até então sugerem que as alterações da inflamação são criticamente relacionadas às vias metabólicas de nutrientes e que a obesidade está associada a complicações, tais como resistência à insulina, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (Shoelson *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2012). (Figura 1).

Além disso, o tecido adiposo branco produz adipocitocinas, como adiponectina, leptina, resistina, entre outras, as quais possuem um elo entre obesidade, resistência à insulina e doenças inflamatórias (Wellen e Hotamisligil, 2005; Weisberg *et*

*al.*, 2006). Estas adipocinas exercem efeito sistêmico, neuro-endócrino e autócrino/parácrino. Devido à importância destes efeitos no balanço ponderal, no metabolismo do próprio tecido adiposo, na resistência à insulina, conferem ao tecido adiposo uma importância fisiológica e fisiopatológica que transcendem o papel que o tecido adiposo tem como depósito de energia (Ouchi *et al.*, 2003; Berg e Scherer, 2005).

Os adipócitos são capazes de sintetizar proteínas pró e antiinflamatórias, dentre elas a MCP-1, que pode induzir a infiltração e ativação de macrófagos no tecido adiposo (Trayhurn e Wood, 2004). A expressão gênica de MCP-1 no tecido adiposo é elevada em casos de resistência à insulina induzida por dieta e em camundongos ob/ob e db/db. Estudos mostraram que a superexpressão de MCP-1 nos adipócitos de camundongos relacionou-se ao aumento no recrutamento de macrófagos no tecido adiposo, a resistência insulínica sistêmica e a esteatose hepática (Kamei *et al.*, 2006; Kanda *et al.*, 2006).

Os macrófagos são importante fonte de citocinas inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) e a interleucina-6 (IL-6), caracterizando uma ação inflamatória do tecido adiposo (Trayhurn e Wood, 2004). Além disso, estas citocinas, TNF-α, IL-6, MCP-1, mediadores do processo de coagulação, como inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e certos fatores do complemento (Calle e Kaaks, 2004; Wellen e Hotamisligil, 2005) exercem papel importante na interface entre sistema imune e metabólico (Tilg e Moschen, 2006).

A adiponectina e a leptina são consideradas adipocitocinas primárias porque parecem ser produzidas primariamente por adipócitos. A resistina, porém, é produzida em humanos por células mononucleares como os macrófagos e por ambos adipócitos e macrófagos em roedores (Steppan *et al.*, 2001; Tilg e Moschen, 2006). As primeiras informações sobre a resistina foram descritas em 2001, sendo originalmente descrita como um peptídeo secretado pelo adipócito que induz a resistência à insulina em roedores (Steppan *et al.*, 2001).

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 é um hormônio principalmente produzido e secretado pelo tecido adiposo branco, em proporção a quantidade de gordura estocada, que 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, atu-

almente, está descrito na literatura um cenário de resistência à leptina em indivíduos obesos (Meier e Gressner, 2004).

A adiponectina foi descoberta em meados dos anos 1990 por quatro diferentes grupos de pesquisadores (Scherer *et al.*, 1995). Ela é produzida no tecido adiposo e sua concentração, diferente das demais adipocinas, é reduzida na presença de obesidade e resistência à insulina. Está envolvida na resposta inflamatória e na regulação do balanço energético, desenvolvendo um papel anorexígeno e antiinflamatório (Gil-Campos *et al.*, 2004; Ronti *et al.*, 2006).

Portanto, o tecido adiposo é um órgão complexo e ativamente secretor, que envia e recebe sinais que modulam o gasto energético, o apetite, a sensibilidade à insulina, funções endócrinas e reprodutoras, metabolismo ósseo, inflamação e ainda a imunidade (Shoelson *et al.*, 2007).

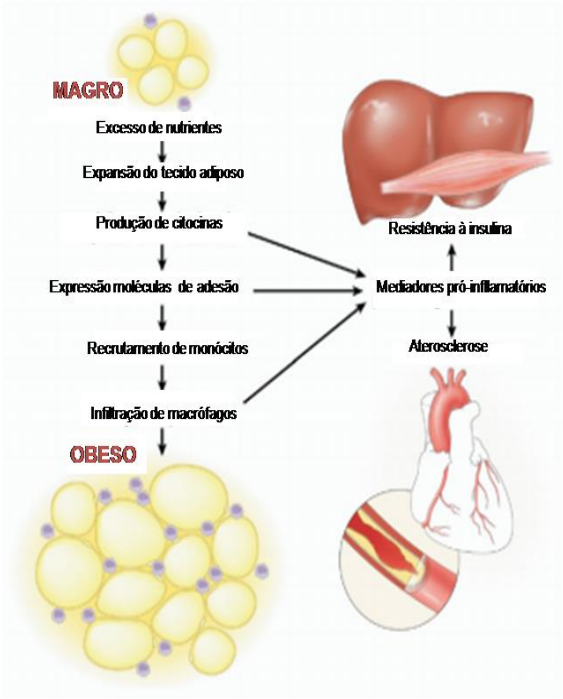


**Figura 1:** Mecanismos potenciais da inflamação induzida por obesidade. O acúmulo de lipídios no tecido adiposo e a expansão deste tecido levam ao início do processo inflamatório. Este processo pode ser iniciado pela produção de citocinas inflamatórias pelos adipócitos. Células endoteliais respondem através do aumento da expressão de moléculas de adesão, as quais atuam no recrutamento de monócitos e na infiltração de macrófagos. Os adipócitos, as citocinas, as células endoteliais e os macrófagos atuam em conjunto criando um ambiente inflamatório, que promove resistência à insulina e aumenta o risco de aterosclerose. Adaptado de (Shoelson *et al.*, 2007).

## 2.3 **Dieta e danos hepáticos**

É importante considerar que a sobrecarga alimentar de açúcares e lipídios pode prejudicar a função hepática, uma vez que o fígado é responsável pelo metabolismo destes nutrientes. A função metabólica central do fígado é manter os níveis de glicemia, independente do estado nutricional (Musso *et al.*, 2009). O fígado é um

importante sítio de captação de glicose, mas também está envolvido na captação de lipídios e aminoácidos da dieta, e a presença de um ou ambos destes nutrientes pode influenciar a captação hepática de glicose (Bizeau e Pagliassotti, 2005). A glicose é convertida em ácidos graxos, sendo utilizada para a síntese dos triglicerídeos - principal fonte de energia armazenada e de transporte (Musso *et al.*, 2009).

A composição de hidratos de carbono ingeridos também influencia o metabolismo da glicose hepática. Por exemplo, a frutose pode aumentar a absorção de glicose hepática. Além disso, a extração de frutose pelo fígado é extremamente alta, aproximando-se de 50% a 70% do fornecimento de frutose. O metabolismo hepático seletivo de frutose, e a capacidade da frutose de aumentar a absorção hepática de glicose podem, em condições apropriadas (por exemplo, dieta rica em sacarose ou frutose), provocar grandes adaptações no metabolismo hepático (Bizeau e Pagliassotti, 2005).

A insulina normalmente exerce os seus efeitos sobre o metabolismo hepático através de duas vias metabólicas primárias. Na primeira, ocorre a fosforilação da proteína Foxo1, excluindo-a do núcleo do hepatócito e, assim, reduzindo a transcrição dos genes para as enzimas envolvidas na gliconeogênese, mantendo dessa forma a normoglicemia (Naimi *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2008). A segunda via é a ativação do SREBP-1c. Este fator de transcrição ativa a lipogênese de novo, para transformar o excesso de energia, oriundos de gorduras ou carboidratos, em triglicerídeos, que é armazenado em lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), e então exportado para ser estocado perifericamente em adipócitos (Lustig, 2010).

Da mesma forma, as dietas que aumentam a resposta ao carboidrato e a atividade do SREBP-1c levam à deposição de lipídios hepáticos aumentando assim a lipogênese de novo (Zivkovic *et al.*, 2007). A hiperinsulinemia, a hipertrigliceridemia e o acúmulo de gordura visceral após a ingestão de uma dieta rica em frutose, podem estar associados com o aumento na expressão hepática de SREBP-1c, e a susceptibilidade a alterações metabólicas após essa dieta pode ser determinada por polimorfismos no gene SREBP-1c (Bizeau e Pagliassotti, 2005).

Alterações moleculares e fisiológicas na resistência à insulina resultam em um acúmulo excessivo de triglicerídeos no hepatócito. Este excesso de gordura no fígado resulta de um aumento na captação e síntese de gordura, de redução na oxidação e/ou exportação sob a forma de VLDL (Browning e Horton, 2004), todas estas vias são implicadas na patogênese da esteatose hepática. (Figura 2). Os seres hu-

manos (Araya *et al.*, 2004) e camundongos (Shimomura *et al.*, 1998) com esteatose hepática acumulam excesso de ácido oleico, o produto final da síntese de novo de ácidos graxos, sugerindo aumento na taxa de síntese de ácidos graxos e um fígado resistente à insulina (Aguila *et al.*, 2010).

Os ácidos graxos que não são incorporados em triglicerídeos são degradados por oxidação sendo catalisada por enzimas localizadas nas mitocôndrias, nos peroxissomos e microssomos. A transcrição de enzimas que catalisam a beta-oxidação de ácidos graxos nos peroxissomos e mitocôndrias é regulada pelos receptores ativadores de proliferação peroxissomal (PPAR)-α sensível aos ácidos graxos (Reddy e Hashimoto, 2001). A oxidação mitocondrial de ácidos graxos gera superóxido, trifosfato de adenosina (ATP), corpos cetônicos e acetil-CoA. Como na esteatose hepática ocorre dano mitocondrial, a capacidade de oxidação de ácidos graxos nesta organela é limitada, conduzindo a um aumento da oxidação peroxissomal (e microssomal) de ácidos graxos, que por sua vez gera peróxido de hidrogênio, uma fonte potencial de estresse oxidativo (Macdonald e Prins, 2004).

O fígado humano adulto saudável consiste de até 5% da sua massa, como lipídio, localizado em vesículas citoplasmáticas. Considerando a esteatose anatomicamente, ela pode se apresentar em duas formas, dependendo do tamanho da vesícula lipídica: na esteatose microvesicular, a gordura é armazenada em várias pequenas vesículas; na esteatose macrovesicular, a gordura é armazenada em uma grande vesícula. Portanto, histologicamente a esteatose microvesicular é um citoplasma do hepatócito rico em múltiplas pequenas vesículas lipídicas, com os seus núcleos no centro da célula (Burt *et al.*, 1998). E na esteatose macrovesicular uma grande gota lipídica desloca o núcleo dos hepatócitos para a periferia da célula (Gramlich *et al.*, 2004; Oleszczuk *et al.*, 2007).

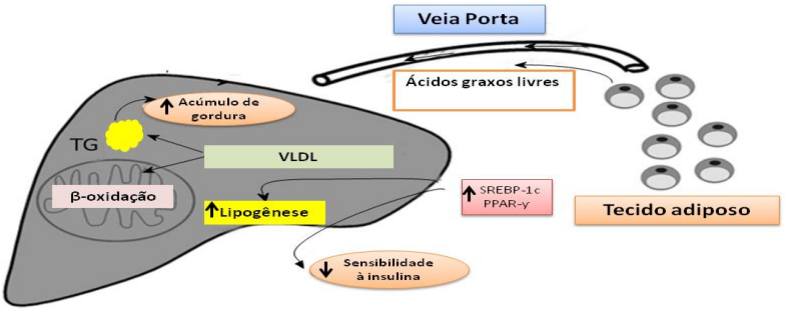


**Figura 2:** Interação entre o tecido adiposo e o fígado. Os ácidos graxos livres (AGLs) liberados pelo tecido adiposo são transportados para o fígado pela veia porta, e em excesso promovem esteatose hepática. Adaptado de (Schaffler *et al.*, 2005). Legenda: TG: Triglicerídeos; VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa; SREBP-1c: *Sterol receptor element binding protein-1c;* PPAR-ɤ: *Peroxisome Proliferator Activated Receptor-gama.*

# 3 **MATERIAL E MÉTODOS**

## 3.1 **Animais e Dieta**

Todos os procedimentos experimentais realizados seguiram as normas estabelecidas no guia convencional para a experimentação com animais (publicação Nº. 85-23 do NIH, revisada em 1996). O protocolo de experimentação foi submetido ao Comitê de Ética do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e aprovado pelo número CEUA/037/2011.

Camundongos machos da linhagem C57BL/6, aos três meses de idade (adultos), foram alocados no biotério do Laboratório de Morfometria, Metabolismo e doença Cardiovascular (LMMC), em caixas de polipropileno, mantidos em condições controladas de temperatura (21±2ºC) e umidade (60±10%), com livre acesso à alimentação e à água. O ambiente foi submetido a ciclos de 12/12h claro-escuro e de renovação de ar (15 minutos/h).

Os camundongos foram separados aleatoriamente em quatro grupos (n=10 animais por grupo, total 40), e foram alimentados com diferentes dietas durante oito semanas:

a) Grupo com dieta padrão (*Standard Chow* - **SC**) para camundongos;

b) Grupo dieta hiperlipídica (*High-Fat* - **HF**);

c) Grupo dieta rica em sacarose (*High-Sucrose* - **HSu**);

d) Grupo dieta hiperlipídica e rica em sacarose (*High-Fat-High-Sucrose* - **HF/HSu**).

As dietas foram preparadas de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN-93M) (Reeves *et al.*, 1993) e foram produzidas pela empresa Pragsoluções (Jau, SP, Brasil; http://www.pragsolucoes.com.br). As composições das dietas experimentais estão detalhadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição e conteúdo energético das dietas experimentais. Mistura de vitaminas* e de minerais** segundo recomendação da AIN-93-M (Reeves *et al.*, 1993).

| Ingredientes (g) | SC | HF | HSu | HF/HSu |
|---|---|---|---|---|
| Caseína | 140,0 | 160,0 | 140,0 | 160,0 |
| Maisena | 620,692 | 420,692 | 320,692 | 120,692 |
| Sacarose | 100,0 | 100,0 | 400,0 | 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 |
| Mistura de vitaminas* | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 |
| Mistura 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 | 1.000,0 | 1.000,0 | 1.000,0 | 1.000,0 |
| Energia (Kcal) | 3804 | 4704 | 3804 | 4704 |
| Colesterol (mg) | 0,0 | 438 | 0,0 | 438 |
| • Sacarose (% energia) | 8 | 8 | 32 | 32 |
| • Hidratos de carbono (% energia) | 76 | 44 | 76 | 44 |
| • Proteínas (% energia) | 14 | 14 | 14 | 14 |
| • Lipídios (% energia) | 10 | 42 | 10 | 42 |

## 3.2 **Massa corporal e ingestão alimentar**

A massa corporal de todos os animais foi aferida semanalmente em balança de precisão 0,1g (Marte A-1500) ao longo de todo experimento.

Os animais tiveram livre acesso à ração e à água durante todo o período experimental. A ingestão alimentar foi monitorada diariamente, no mesmo horário, através da verificação do resto-ingestão (RI), onde a ração restante na gaiola foi mensurada e subtraída daquela oferecida no dia anterior, sendo o resto da ração desprezado e oferecida nova ração. Dessa forma, foi verificada a quantidade de ração consumida em gramas por dia, por animal. Essa mensuração foi multiplicada pela energia da dieta (kcal/g de dieta) para o cálculo da ingestão energética diária por camundongo. Posteriormente, esses dados foram utilizados para calcular a eficiência alimentar (EA) dos animais, que foi calculada como um indicador digestivo e

metabólico, o qual relaciona o ganho de peso semanal com a ingestão energética semanal dos animais de cada grupo experimental. Sendo: EA=Ganho de peso (g)/Ingestão energética (kcal). No final do experimento foi considerada a EA média ao longo das 8 semanas.

### 3.3 **Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)**

Após sete semanas de dieta experimental, uma semana antes da eutanásia, os animais dos quatro grupos foram mantidos em jejum por 6 horas, em seguida foi coletado sangue da veia da cauda e aferida a glicemia (tempo 0). Depois foi administrada, por gavagem orogástrica, uma solução contendo glicose (25% em salina estéril- 0,9% NaCl) na dosagem de 1g/kg de massa corporal. Então foi aferida novamente a glicemia nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos. A determinação dos níveis de glicose no sangue (em mg/dL) foi realizada com glicosímetro (Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brasil). Para a avaliação da tolerância à glicose foi considerada a área sob a curva glicêmica (ASC), mensurada a partir da utilização do software do Prisma (versão 6.01 para Windows, software GraphPad, La Jolla, CA, USA).

### 3.4 **Eutanásia**

No dia da eutanásia, após oito semanas de dieta, e aos cinco meses de idade, os animais foram deixados em jejum por 6 horas. Em seguida foram profundamente anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (150 mg/kg). O tórax foi aberto expondo o coração e as amostras de sangue foram obtidas rapidamente por punção cardíaca (átrio direito). O plasma foi separado por centrifugação em temperatura ambiente (120g por 15min) e estocado em -80ºC, para posteriores análises bioquímicas.

O tecido adiposo inguinal localizado entre a parte inferior da caixa torácica e o meio da região femoral, foi considerado gordura subcutânea. A gordura retroperitoneal, ligada a parede abdominal posterior, próxima aos rins e a porção abdominal

dos ureteres, e a gordura epididimal, localizada na parte inferior do abdome e ligada ao epidídimo, foram consideradas gordura intra-abdominal. Portanto, após a punção cardíaca, os depósitos de tecido adiposo branco, subcutâneo e intra-abdominal, foram cuidadosamente dissecados e pesados. O índice de adiposidade foi determinado pela razão entre a soma das massas de gordura subcutânea e intra-abdominal, dividida pela massa corporal total, apresentado como percentual (Neyrinck *et al.*, 2009).

Além disso, no momento da eutanásia, o fígado foi removido cuidadosamente e pesado usando o método de Scherle (Scherle, 1970).

## 3.5 **Análises Plasmáticas**

As concentrações plasmáticas de colesterol total (CT) e de triglicerídeos (TG) foram mensuradas por método enzimático colorimétrico usando um espectrofotômetro automático e kits comerciais conforme as instruções preconizadas (Bioclin System II, Quibasa Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil).

As concentrações plasmáticas de insulina, leptina, resistina e proteína quimiotática de monócitos (*Monocyte Chemotactic Protein – MCP)*-1 foram mensuradas usando a tecnologia de imunoensaio, na placa de multiplex, de acordo com as recomendações do fabricante *(Multiplex Biomarker Immunoassays for Luminex xMAP technology)* (Millipore, Billerica, MA, USA) com o kit MMHMAG-44K-08 e as concentrações séricas de adiponectina foram avaliadas com o kit MADPK-71K-01. Todas as análises foram realizadas em equipamento Luminex 200, com o software Xponent/Analist, versão 4.2. A razão insulina e glicemia de jejum (I/G) foi então calculada para avaliar resistência à insulina.

### 3.6 **Quantificação de adipócitos**

Fragmentos dos depósitos de gordura intra-abdominal (tecido adiposo epididimal) foram fixados em 1,27mol de formaldeído em 0,1M de tampão fosfato, pH 7,2/L,durante 48 horas em temperatura ambiente e depois foram incluídos em Paraplast plus (Sigma-Aldrich Co, St. Louis. MO, USA) (n=10 animais/grupo). Os blocos foram seccionados com 5μm de espessura e as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina. Imagens digitais foram adquiridas, sendo 10 campos microscópios aleatórios por animal (formato TIFF, 36-bit color, 1280x1024 pixels, câmara LC Evolution e microscópio Olympus BX51). Foram mensurados os diâmetros, menor e maior, de pelo menos 50 adipócitos por animal, para estimar o diâmetro médio, com o auxílio do programa Image-ProPlus versão 7.01 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

### 3.7 **Estrutura e bioquímica hepática**

Uma parte do fígado foi congelada a -80°C para posterior análise dos TG e colesterol hepáticos (n=5 animais/grupo). Outra parte foi dividida em fragmentos menores, contemplando todos os lobos do fígado, e fixados para microscopia de luz (1,27mol/L de formaldeído em 0,1M de tampão fosfato, pH 7,2), permanecendo no fixador durante 48 horas em temperatura ambiente (n=10 animais/grupo). Os fragmentos hepáticos foram desidratados em concentrações crescentes de alcoóis, diafanizados em xilol e incluídos em Paraplast plus (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA). O material foi seccionado com 5 μm de espessura e os cortes foram corados com HE.

Para a determinação da quantidade de esteatose hepática usou-se a análise estereológica com um sistema de vídeo-microscopia. As imagens digitais foram obtidas com um microscópio Leica DMRBE (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) e uma câmera Infinity 1-5C (Lumenera Co., Otawa, ON, Canadá). A densidade de volume (Vv) de esteatose hepática foi avaliada usando um sistema-teste

com 36 pontos (Aguila *et al.*, 2003). Foram considerados 10 campos aleatórios por animal (Catta-Preta *et al.*, 2011). Este sistema-teste foi produzido usando o STEPanizer (www.stepanizer.com) (Tschanz *et al.*, 2011). A densidade de volume da esteatose hepática (Vv) foi estimada através da razão entre os pontos parciais que tocam as gotículas de gordura ($P_P$) em relação aos pontos totais ($P_T$): [$Vv=P_P/P_T$ (%)] (Souza-Mello *et al.*, 2007).

Os níveis de TG e colesterol hepático foram quantificados pelo método enzimático colorimétrico utilizando espectrofotômetro automático (Bioclin System II, Quibasa Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil) e o seu respectivo kit para análise (Quibasa Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil), de acordo com protocolo pré-estabelecido no laboratório (Catta-Preta *et al.*, 2011).

### 3.8 ***Western blot***

O conteúdo total de proteínas presentes no tecido adiposo epididimal e no fígado foi extraído em um tampão contendo inibidor de protease, formando um homogenato que foi centrifugado duas vezes por 10 minutos a 4ºC (n=5 animais/grupo). A solução infranadante foi coletada e a concentração de proteínas foi então determinada usando o Kit BCA para avaliação de proteínas (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Após a desnaturação, as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). A membrana foi então bloqueada com leite desnatado (diluição de 6% em solução tampão de *tris* com *tween*: T-TBS) e incubada durante a noite a 4°C com os seguintes anticorpos primários: adiponectina (A6354, Sigma Aldrich; 1:1000) e leptina (L3772, Sigma Aldrich; 1:1000) para tecido adiposo epididimal; SREBP-1c (SC367, Santa Cruz Biotechnology; 1:500) e PPAR-α (SC 9000, Santa Cruz Biotechnology; 1:500) para fígado. A seguir foi incubada com anticorpos secundários específicos, por uma hora a temperatura ambiente.

As expressões das proteínas foram detectadas através de um sistema detector de quimioluminescência (ECL-Amersham). As imagens foram obtidas por equipamento *Bio-Rad's Molecular Imaging ChemiDoc XRS Systems* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A intensidade da quimioluminescência das bandas foi analisada através

de análises quantitativas utilizando o software Imaje J, versão 1.47 (NIH, imagej.nih.gov/ij, USA). Finalmente, fez-se a correção das bandas através da expressão de uma proteína estrutural, β-actina (SC81178; Santa Cruz Biotechnology; 1:1000) como um controle para normalizar os dados.

### 3.9 **Análise estatística**

Diferenças nos dados quantitativos foram testadas para normalidade e homoscedasticidade das variâncias. As diferenças entre os grupos foram analisadas por *one-way analysis of variance* (ANOVA), seguida por pós-teste de Holm-Sidak. Em todos os casos foi usado o índice de significância de $P<0,05$, sendo considerado estatisticamente significativo (GraphPad Prism versão 6.01 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média (M±EPM).

# 4 **RESULTADOS**

## 4.1 **Massa corporal e ingestão alimentar**

Os animais dos quatro grupos iniciaram o experimento sem diferença significativa na massa corporal (*P*=0,67). Como demonstrado na figura 3, a massa corporal foi alterada a partir da primeira semana de consumo das dietas experimentais, quando os animais dos grupos HF e HF/HSu apresentaram maior ganho na massa corporal em relação aos animais dos grupos SC e HSu. Esta diferença se manteve durante todo o experimento, chegando ao final das oito semanas de dietas experimentais com o grupo HF apresentando aumento de 14% na massa corporal em relação ao grupo SC (*P*=0,0001) e 13% em relação ao grupo HSu (*P*=0,0004). Da mesma forma o grupo HF/HSu apresentou massa corporal final 15% maior que o grupo SC (*P*<0,0001) e 14% maior que o grupo HSu (*P*=0,0002).

A ingestão alimentar (gramas) foi maior no grupo HSu que nos outros três grupos, sendo 7% maior que SC (*P*=0,0105); 11% maior que HF (*P*=0,0003); e 8% maior que HF/HSu (*P*=0,0066) (Tabela 2).

Dessa forma, a ingestão energética (Kcal) foi também maior no grupo HSu que no grupo SC (+7%, *P*=0,0156), apesar das dietas serem isoenergéticas. Porém, essa ingestão foi ainda maior nos grupos HF e HF/HSu, os quais consumiram dietas hipercalóricas, sendo 20% maior que no grupo SC (*P*<0,0001) e 12% maior que no grupo HSu (*P*=0,0001), como demonstrado na tabela 2.

A eficiência alimentar (EA) média, após oito semanas de dietas experimentais, foi 60% maior no grupo HF e 69% maior no HF/HSu em relação aos grupos SC e HSu (*P*<0,0001) (Tabela 2). Este dado demonstra que os animais que receberam dieta hipercalórica e rica em lipídios saturados foram mais eficientes em acumular massa corporal, uma vez que os grupos que apresentaram maior EA apresentaram maior ganho de massa corporal.

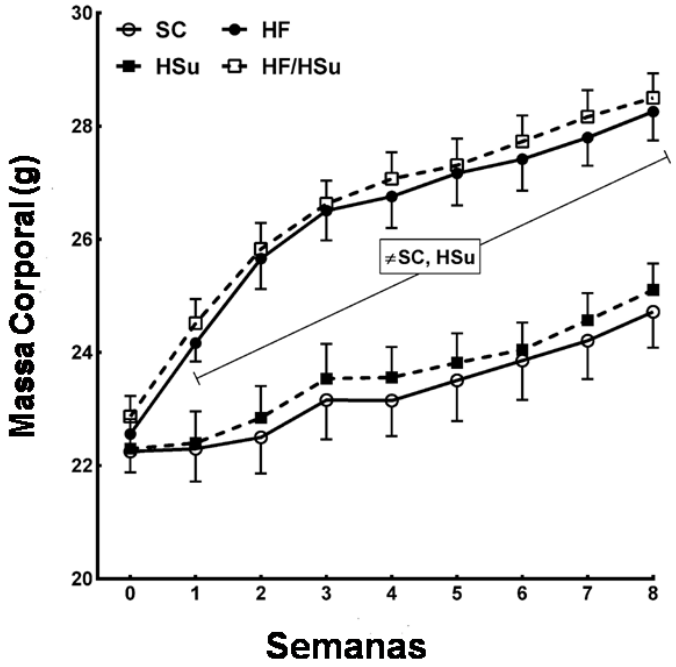


**Figura 3:** Evolução da massa corporal dos grupos estudados: Os dados foram expressos em média±EPM. *P*<0,05 sob as seguintes condições: HF e HF/HSu versus (≠) SC e HSu (one-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak) (n=10 animais/grupo). **SC:** grupo que recebeu dieta controle; **HF:** grupo que recebeu dieta hiperlipídica; **HSu:** grupo com dieta rica em sacarose; **HF/HSu:** grupo com dieta hiperlipídica e rica em sacarose.

## 4.2 **Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)**

Após sete semanas de dietas experimentais, os animais dos grupos HF, HSu e HF/HSu apresentaram intolerância à glicose em comparação ao grupo SC, evidenciada por aumento da área sob a curva, como demonstrado na tabela 2. Sendo 33% maior no grupo HF (*P*=0,0006), 29% maior no grupo HSu (*P*=0,0016) e 71% maior no grupo HF/HSu (*P*<0,0001), quando relacionados ao grupo SC. Sendo assim, o

grupo HF/HSu apresentou ainda o maior nível glicêmico após administração de uma sobrecarga de glicose, o que o caracterizou como o grupo mais prejudicado no metabolismo de carboidratos. A área sob a curva deste grupo foi cerca de 30% maior que nos grupos HF e HSu ($P$<0,0001).

## 4.3 **Análises Plasmáticas**

Os níveis plasmáticos de colesterol total (CT) e triglicerídeos (TG) foram aumentados nos grupos HF, HSu e HF/HSu em relação ao grupo SC, como demonstrado na tabela 2.

Quando comparados ao grupo SC, o nível de CT foi 61% maior no grupo HF ($P$<0,0001), 48% maior no grupo HF/HSu ($P$<0,0001) e 40% maior no grupo HSu ($P$=0,0003), por outro lado, CT foi 13% menor no grupo HSu quando comparado ao grupo HF ($P$<0,05). Não houve diferença significativa entre os grupos HF e HF/HSu.

O nível de TG foi 27% maior no grupo HF ($P$=0,0008), 17% maior no grupo HSu ($P$=0,0207) e 18% maior no grupo HF/HSu ($P$=0,0192), quando comparados ao grupo SC. Sendo que, não houve diferença estatística entre os grupos HF, HSu e HF/HSu.

## 4.4 **Insulina de jejum e razão Insulina/Glicose (I/G)**

O nível sérico de insulina foi significativamente maior nos grupos HF (+148%, $P$=0,0062), HSu (+163%, $P$=0,0034) e HF/HSu (+171%, $P$=0,0028) quando comparados ao grupo SC. Da mesma forma, a razão I/G foi elevada nos grupos HF (+77%, $P$=0,0134), HSu (+92%, $P$=0,0039) e HF/HSu (+65%, $P$=0,0331) em relação ao grupo SC, confirmando assim a resistência à insulina nestes grupos (Tabela 2).

**Tabela 2:** Parâmetros biométricos e bioquímicos dos camundongos dos grupos estudados. Os valores representam média ± EPM. Nos casos sinalizados, *P*<0,05, sob as seguintes condições: [a] comparado com o grupo SC, [b] com o grupo HF, [c] com o grupo HSu. Diferenças foram testadas com análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Holm-Sidak (n=5 animais/grupo). Legenda: SC: Grupo Controle; HF: Grupo dieta Hiperlipídica; HSu: Grupo dieta rica em sacarose; HF/HSu: Grupo dieta hiperlipídica e rica em sacarose; TOTG: Teste Oral de Tolerância a Glicose; I/G: razão insulina e glicose.

| **Dados** | **Grupos** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **SC** | **HF** | **HSu** | **HF/HSu** |
| Ingestão alimentar (g/dia) | 2,70±0,04 | 2,60±0,04 | 2,90±0,04[a,b] | 2,70±0,05[c] |
| Ingestão Energética (Kcal/dia) | 10,4±0,2 | 12,4±0,2[a] | 11,1±0,1[a,b] | 12,7±0,2[a,c] |
| Eficiência Alimentar (g/Kcal %) | 0,50±0,01 | 0,80±0,02[a] | 0,50±0,02[b] | 0,81±0,03[a,c] |
| Colesterol Total (mg/dl) | 70,6±4,4 | 113,4±3,7[a] | 99,0±3,6[a,b] | 104,8±3,4[a] |
| Triglicerídeos (mg/dl) | 53,2±0,6 | 67,4±2,0[a] | 62,4±1,6[a] | 62,8±3,0[a] |
| TOTG (área sob a curva) | 14591±400 | 19439±916[a] | 18775±382[a] | 25002±959[a,b,c] |
| Insulina (µIU/L) | 7,9±1,8 | 19,6±1,8[a] | 20,8±2,9[a] | 21,3±2,0[a] |
| I/G | 0,9±0,2 | 1,7±0,1[a] | 1,8±0,1[a] | 1,6±0,1[a] |

## 4.5 **Adipocinas**

O nível plasmático de leptina foi 137% maior no grupo HF (*P*=0,0015), 109% maior no grupo HSu (*P*=0,0075) e 125% maior no grupo HF/HSu (*P*=0,0028), quando comparados ao grupo SC. De forma semelhante, em relação ao grupo SC, o nível sérico de resistina foi 21% maior no grupo HF (*P*=0,0374) e 24% maior nos grupos HSu e HF/HSu (*P*=0,0277). Além disso, MCP-1 sérica foi significativamente elevada no grupo HF (+77%, *P*=0,0022), HSu (+62%, *P*=0,0093) e HF/HSu (+73%, *P*=0,0029) quando comparados ao grupo SC, dados apresentados na tabela 3.

De forma oposta, o nível sérico de adiponectina foi significativamente reduzido nos grupos HF, HSu e HF/HSu em relação ao grupo SC. Adiponectina sérica foi 29% menor no grupo HF (*P*=0,0231), 33,5% menor no grupo HSu (*P*=0,0120) e 38% menor no grupo HF/HSu (*P*=0,0050), quando comparados ao grupo SC (Tabela 3). Não houve diferença significativa entre os grupos HF, HSu e HF/HSu, considerando todas as adipocinas avaliadas.

## 4.6 **Tecido adiposo**

a) <u>Depósitos de gordura</u>

As massas dos depósitos de gorduras intra-abdominal e subcutânea apresentaram-se significativamente elevadas nos grupos HF e HF/HSu em relação aos grupos SC e HSu, dado este que corrobora com o resultado da massa corporal dos animais, após oito semanas de dietas experimentais. No grupo HF, a gordura intra-abdominal foi 64% maior que no grupo SC (*P*=0,0003) e 34% maior que no grupo HSu (*P*=0,0209). Além disso, no grupo HF/HSu o estoque de gordura intra-abdominal foi 61% maior que o estoque do grupo SC (*P*=0,0005) e 32% maior que no grupo HSu (*P*=0,0274). Da mesma forma, o depósito de gordura subcutânea, nos grupos HF e HF/HSu apresentou-se elevado quando comparado ao grupo SC, sen-

do, +217% e +200%, respectivamente, (*P*<0,0001); e quando comparados ao grupo HSu, +124% e +112%, respectivamente (*P*<0,0001) (Tabela 3).

b) Índice de adiposidade

Foi somada a massa de gordura intra-abdominal e a massa de gordura subcutânea, multiplicadas por 100, e divididas pela massa corporal de cada animal. Este índice de adiposidade foi 76% maior no grupo HF e 71% maior no grupo HF/HSu, em relação ao grupo SC (*P*<0,0001). E quando comparado ao grupo HSu, o índice de adiposidade foi 40% maior no grupo HF (*P*= 0,0052) e 35% maior no grupo HF/HSu (*P*=0,0105). Não houve diferença estatística entre os grupos SC e HSu (Tabela 3).

c) Diâmetro de adipócitos

Quanto à morfometria do tecido adiposo intra-abdominal, foi evidenciado aumento significativo do diâmetro médio dos adipócitos nos grupos HF e HF/HSu quando comparados ao grupo SC, sendo +56% e +59%, respectivamente (*P*<0,0001), indicando hipertrofia dos adipócitos nestes animais. Da mesma forma, o diâmetro médio dos adipócitos, foi significativamente elevado no grupo HSu, quando comparado ao grupo SC (+23%, *P*=0,0055), porém foi menor no grupo HSu em relação ao grupo HF (-21%, *P*=0,0003) e HF/HSu (-23%, *P*=0,0002), como demonstrado na figura 4.

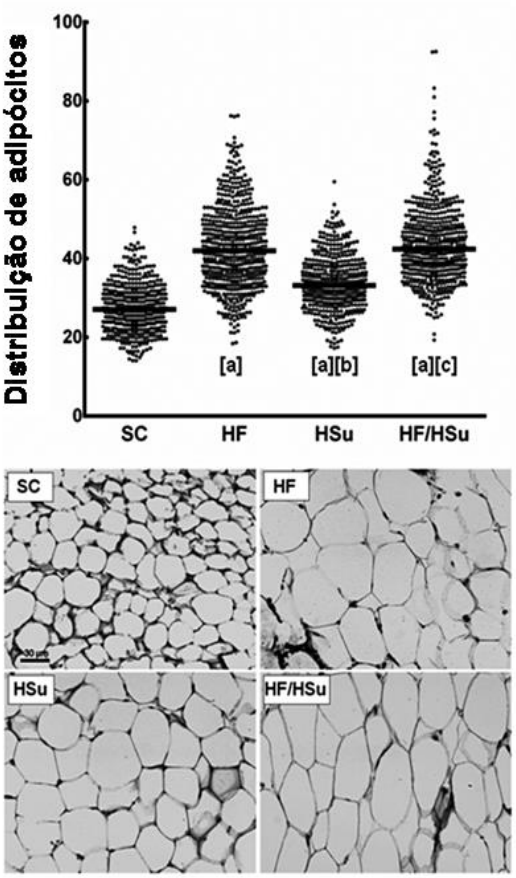


**Figura 4:** Figura superior: distribuição do tamanho dos adipócitos (barras pretas são medianas). Figura inferior: fotomicrografias do tecido adiposo (epididimal) nos seguintes grupos: **SC:** grupo que recebeu dieta controle; **HF:** grupo que recebeu dieta hiperlipídica; **HSu:** grupo com dieta rica em sacarose; **HF/HSu:** grupo com dieta hiperlipídica e rica em sacarose. Nos casos sinalizados, $P<0,05$ sob as seguintes condições: [a] ≠ SC, [b] ≠ HF, [c] ≠ HSu (one-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak) (n=10 animais/grupo).

## 4.7 **Fígado**

a) Estrutura hepática

Após oito semanas de dieta experimental, os grupos HF, HSu e HF/HSu apresentaram macro e micro esteatose. Quando comparados ao grupo SC, o nível de esteatose foi 241% maior no grupo HF (*P*<0,0001), 232% maior no grupo HSu (*P*<0,0001) e 235% maior no grupo HF/HSu (*P*<0,0001). Não houve diferença significativa entre os grupo HF, HSu e HF/HSu, como demonstrado na figura 5.

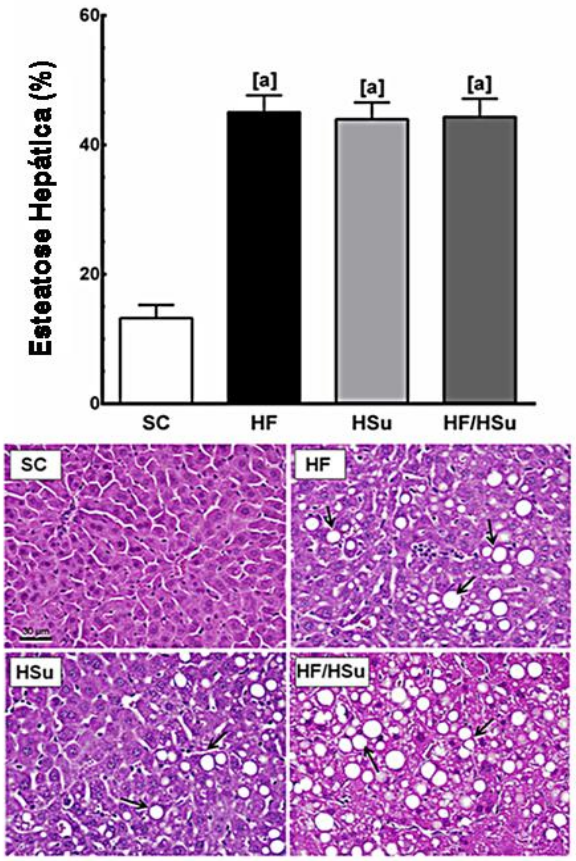


**Figura 5:** Figura superior: gráfico de barras da densidade de volume de esteatose hepática (média ± EPM) nos seguintes grupos: **SC:** grupo que recebeu dieta controle; **HF:** grupo que recebeu dieta hiperlipídica; **HSu:** grupo com dieta rica em sacarose; **HF/HSu:** grupo com dieta hiperlipídica e rica em sacarose. Nos casos sinalizados, *P*<0,05 sob as seguintes condições: [a] ≠ SC (one-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak) (n=10 animais/grupo). Figura inferior: fotomicrografias representativas do fígado (coloração: HE). Setas indicam micro e macroesteatose.

b) Bioquímica

Corroborando com os dados de esteatose hepática, o nível de TG hepático foi maior nos grupos HF, HSu e HF/HSu. Quando comparados ao grupo SC, o TG hepático foi 51% maior no grupo HF ($P<0,0001$), 78% maior no grupo HSu ($P<0,0001$) e 84% maior no grupo HF/HSu ($P<0,0001$). Além disso, o nível de TG hepático foi 17% maior no grupo HSu ($P=0,0029$) e 22% maior no grupo HF/HSu ($P=0,0006$), quando comparados ao grupo HF (Tabela 3).

O nível de colesterol hepático apresentou-se elevado nos grupos HF e HF/HSu. Quando comparados ao grupo SC, colesterol hepático foi 10% maior no grupo HF ($P=0,0109$) e 9% maior no grupo HF/HSu ($P=0,0235$). E relacionados ao grupo HSu, o colesterol hepático foi 9% maior no grupo HF ($P=0,0134$) e 8% maior no grupo HF/HSu ($P=0,0261$) (Tabela 3).

**Tabela 3:** Dados sobre tecido adiposo, adipocinas e fígado dos camundongos dos grupos estudados. Os valores representam média ± EPM. Nos casos sinalizados, *P*<0,05, sob as seguintes condições: [a] comparado com o grupo SC, [b] com o grupo HF, [c] com o grupo HSu. Diferenças foram testadas com análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Holm-Sidak (n=5 animais/grupo). Legenda: SC: Grupo Controle; HF: Grupo dieta Hiperlipídica; HSu: Grupo dieta rica em sacarose; HF/HSu: Grupo dieta hiperlipídica e rica em sacarose; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos–1.

| **Dados** | **Grupos** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **SC** | **HF** | **HSu** | **HF/HSu** |
| Gordura Intra-abdominal (g) | 0,36±0,02 | 0,59±0,05[a] | 0,44±0,01[b] | 0,58±0,05[a,c] |
| Gordura Subcutânea (g) | 0,12±0,01 | 0,38±0,05[a] | 0,17±0,01[b] | 0,36±0,03[a,c] |
| Índice de adiposidade (%) | 1,9±0,1 | 3,4±0,3[a] | 2,4±0,1[b] | 3,3±0,3[a,c] |
| Leptina (pg/mL) | 358,4±25,2 | 848,2±86,5[a] | 747,8±106,3[a] | 807,6±50,6[a] |
| Resistina (pg/mL) | 3331±23,57 | 4044±156,3[a] | 4126±161[a] | 4127±257,6[a] |
| MCP-1 (pg/mL) | 39,0±3,8 | 69,0±1,7[a] | 63,0±7,5[a] | 67,5±3,9[a] |
| Adiponectina ($10^6$ pg/mL) | 6,80±0,7 | 4,80±0,4[a] | 4,52±0,2[a] | 4,20±0,3[a] |
| Colesterol Hepático (mg/dl/mg) | 40,0±0,7 | 44,0±0,6[a] | 40,2±0,7[b] | 43,4±1,0[a,c] |
| Triglicerídeo Hepático (mg/dl/mg) | 71,4±5,4 | 108,0±1,2[a] | 126,8±1,9[a,b] | 131,4±3,7[a,b] |

## 4.8 **Western blot**

Todos os dados foram normalizados para β-actina, que foi usada como um controle. A expressão protéica de β-actina não diferiu entre os grupos SC, HF, HSu e HF/HSu.

### 4.8.1 Expressão protéica no tecido adiposo

a) Adiponectina

A expressão protéica de adiponectina no tecido adiposo epididimal, foi significativamente menor nos grupos HF, HSu e HF/HSu, quando comparados ao grupo SC. Sendo 55% menor no grupo HF ($P$=0,0034), 58% menor no grupo HSu ($P$=0,0028) e 68% menor no grupo HF/HSu ($P$=0,0007), como demonstrado na figura 6.

b) Leptina

De forma oposta à expressão protéica de adiponectina e corroborando com os dados de leptina sérica, a expressão protéica de leptina no tecido adiposo epididimal, foi maior nos grupos HF, HSu e HF/HSu, quando comparados ao grupo SC. Sendo 105% maior no grupo HF ($P$=0,0008), 107% maior no grupo HSu ($P$=0,0008) e 146% maior no grupo HF/HSu ($P$<0,0001). Assim como a adiponectina, a expressão de leptina não apresentou diferença entre os três grupos, HF, HSu e HF/HSu, como demonstrado na figura 6.

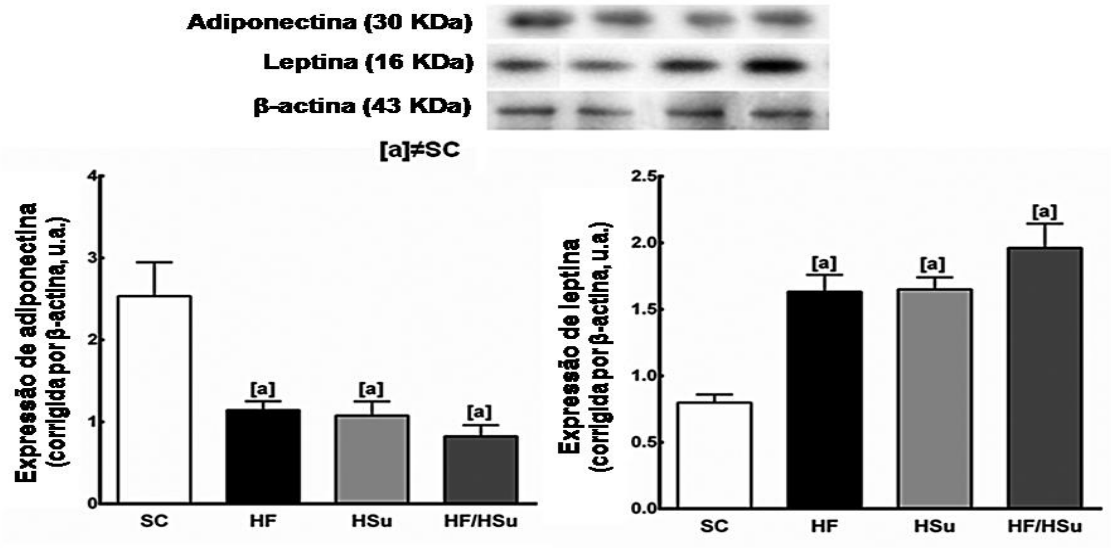


**Figura 6:** Expressão protéica de adiponectina e leptina no tecido adiposo epididimal corrigidas por β-actina. Figura superior: bandas representativas. Figura inferior: densitometria das bandas (média ± EPM) dos seguintes grupos: **SC:** grupo que recebeu dieta controle; **HF:** grupo que recebeu dieta hiperlipídica; **HSu:** grupo com dieta rica em sacarose; **HF/HSu:** grupo com dieta hiperlipídica e rica em sacarose. Nos casos sinalizados, *P*<0,05 sob as seguintes condições: [a] ≠ SC (one-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak) (n=5 animais/grupo).

4.8.2 Expressão protéica no fígado

a) Elemento regulador de esterol ligante da proteína 1 (SREBP-1c)

A expressão protéica hepática de SREBP-1c foi significativamente elevada nos grupos HF, HSu e HF/HSu em relação ao grupo SC. A expressão protéica de SREBP-1c foi 89% maior no grupo HF (*P*=0,0014), 76% maior no grupo HSu (P=0,0043) e 95% maior no grupo HF/HSu (P=0,0009), como demonstrado na figura 7.

b) Receptor ativador de proliferação peroxissomal-alfa (PPAR-α)

Contrária à expressão protéica de SREBP-1c, a expressão protéica hepática de PPAR-α, foi significativamente menor nos grupos HF, HSu e HF/HSu em relação ao grupo SC. A expressão protéica de PPAR-α foi 63% menor no grupo HF (*P*=0,0012), 52% menor no grupo HSu (*P*=0,0045) e 57% menor no grupo HF/HSu (*P*=0,0026). Não houve diferença estatística entre os grupos HF, HSu e HF/HSu, como demonstrado na figura 7.

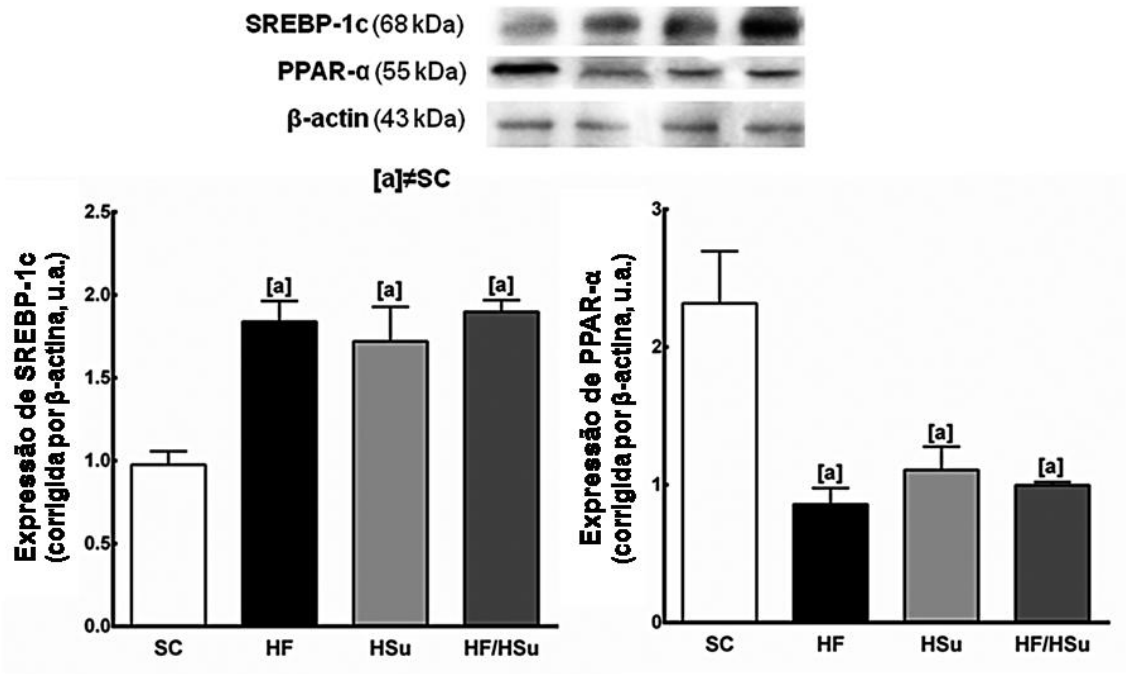


**Figura 7:** Expressão protéica hepática de SREBP-1c e PPAR-α, corrigidas por beta-actina. Figura superior: bandas representativas. Figura inferior: densitometria das bandas (média ± EPM) dos seguintes grupos: **SC:** grupo que recebeu dieta controle; **HF:** grupo que recebeu dieta hiperlipídica; **HSu:** grupo com dieta rica em sacarose; **HF/HSu:** grupo com dieta hiperlipídica e rica em sacarose. Nos casos sinalizados, *P*<0,05 sob as seguintes condições: [a] ≠ SC (one-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak) (n=5 animais/grupo).

# 5 **DISCUSSÃO**

Os efeitos deletérios de uma dieta hiperlipídica têm sido bem documentados na literatura, mas menos atenção tem sido dada aos efeitos de uma dieta rica em sacarose. O presente estudo demonstrou que há efeitos adversos e persistentes com a ingestão de uma dieta rica em sacarose, os quais podem ser comparados a uma dieta hiperlipídica. Nossos dados sugerem que uma dieta rica em sacarose, mesmo quando há apenas a substituição do amido de milho por açúcar comum na alimentação, e a dieta é isocalórica em comparação com a dieta controle, pode ter consequências em longo prazo para a saúde.

Nos animais que ingeriram dieta hiperlipídica, observamos relação entre a evolução da massa corporal e o teor de gordura da dieta (como mostrado nos grupos HF e HF/HSu). No entanto, os animais que ingeriram a dieta rica em sacarose (grupo HSu) não apresentaram aumento de massa corporal, mas apresentaram alterações marcantes no metabolismo da glicose e de lipídios, hipertrofia dos adipócitos, aumento da secreção de citocinas inflamatórias pelo tecido adiposo, e esteatose hepática, os quais, neste caso, não foram associados ao aumento de massa corporal e sim ao consumo elevado de sacarose.

Os animais alimentados com dieta hiperlipídica e dieta rica em sacarose apresentaram efeitos bem semelhantes no que diz respeito ao metabolismo de hidratos de carbono. Os animais dos grupos HF e HSu apresentaram hiperglicemia, hiperinsulinemia e diminuição da tolerância à glicose. E os animais que ingeriram a dieta hiperlipídica e também rica em sacarose (grupo HF/HSu) apresentaram efeitos mais pronunciados em relação a tolerância à glicose. Nossos resultados são semelhantes aos encontrados em trabalhos anteriores do nosso laboratório, em que os autores usaram dieta com sobrecarga de sacarose associado com dieta hiperlipídica e observaram aumento da glicemia e resistência à insulina em camundongos (Fernandes-Santos *et al.*, 2009).

Em um estudo com humanos que consumiram dietas que variavam entre 5% e 15% no teor de sacarose, foi observado que, apesar de não haver diferenças na massa e na composição corporal, o nível de glicemia de jejum correspondente foi significativamente menor naqueles que consumiram dieta contendo 5% de sacarose

do que no grupo que consumiu dieta contendo 15% de sacarose, indicando assim efeitos benéficos de uma dieta com menor teor de sacarose (Lewis *et al.*, 2013).

O consumo de dietas com sobrecarga de hidratos de carbono, particularmente frutose e sacarose, aumenta os níveis de TG e colesterol circulantes em seres humanos (Swanson *et al.*, 1992) e roedores (Kuhlow *et al.*, 2010). Isto ocorre devido a um desequilíbrio entre a síntese e a secreção de VLDL, a qual é responsável pelo transporte de TG e ácidos graxos (Rinella e Green, 2004). Os nossos resultados corroboram com os dados dos trabalhos anteriores, tendo em vista que observamos níveis aumentados de colesterol total e TG séricos e também de TG hepático nos animais alimentados com dieta rica em sacarose. Além disso, estudos mostram que o acúmulo excessivo de TG hepático leva à resistência à insulina em ratos (Shindo *et al.*, 2010) acelerando o desenvolvimento da intolerância à glicose, em conjunto com a diminuição da secreção de insulina em camundongos (Aguila *et al.*, 2010; Fraulob *et al.*, 2010).

Originalmente considerado um depósito passivo para o armazenamento de energia, o tecido adiposo branco é agora conhecido por secretar uma variedade de substâncias que ajudam a regular a homeostase metabólica, e que estão envolvidas com a modulação da inflamação (Ahima, 2006). Estas substâncias incluem leptina, adiponectina, resistina, TNF-α, entre outras (Fried *et al.*, 1998; Steppan *et al.*, 2001; Fukuhara *et al.*, 2005).

Em relação aos adipócitos, estudos mostram que a hipertrofia dessas células está associada com a infiltração de macrófagos no tecido adiposo, indicando um processo inflamatório (Weisberg *et al.*, 2003). Além disso, o tamanho dos adipócitos parece correlacionar-se positivamente com a liberação de fatores pró-inflamatórios, como por exemplo, leptina, MCP-1 e IL-6 (Skurk *et al.*, 2007; Catta-Preta *et al.*, 2012). O presente estudo mostrou que os animais que se alimentaram tanto com dieta hiperlipídica como com dieta rica em sacarose (grupos HF, HSu e HF/HSu) apresentaram adipócitos maiores que os adipócitos dos animais que se alimentaram com dieta normal (grupo SC). Esta hipertrofia nos adipócitos indica o início de uma série de complicações, uma vez que o aumento do diâmetro do adipócito precede o desenvolvimento de esteatose hepática, resistência à insulina e aumento da expressão do TNF-α, sugerindo um processo inflamatório (Akagiri *et al.*, 2008).

Quanto às adipocinas secretadas pelo tecido adiposo, estudos mostram que os níveis de adiponectina estão reduzidos em modelos animais de obesidade e re-

sistência à insulina, (Fumeron *et al.*, 2004) e a diminuição da secreção de adiponectina tem sido implicada no desenvolvimento da esteatose hepática em animais obesos (Yamauchi *et al.*, 2001). A secreção desequilibrada de adipocinas agrava ainda mais a inflamação crônica, condição comum em camundongos obesos (Barbosa-da-Silva *et al.*, 2012). No presente estudo, observou-se que os animais alimentados com dieta rica em sacarose apresentaram diminuição significativa da concentração de adiponectina plasmática, assim como da expressão de adiponectina no tecido adiposo, mostrando que a sacarose na dieta é um fator a mais para a indução de inflamação sistêmica.

Na obesidade também ocorre hiperleptinemia, o que pode prejudicar consideravelmente os sistemas renal, vascular, cardíaco e hepático (Tsochatzis *et al.*, 2006; Kshatriya *et al.*, 2011). Nos nossos resultados, observamos aumento da expressão de leptina no tecido adiposo e no plasma dos animais alimentados com dieta hiperlipídica e dieta rica em sacarose (grupos HF, HSu e HF/HSu) e este aumento foi acompanhado por hipertrofia dos adipócitos, assim como esteatose hepática e resistência à insulina nesses animais.

Um ponto que merece destaque é que os animais alimentados com dieta rica em sacarose (grupo HSu) apresentaram níveis séricos elevados de resistina e de MCP-1. Sabemos que a resistina e a MCP-1 estão envolvidas com o desenvolvimento da resistência à insulina (Steppan *et al.*, 2001; Kamei *et al.*, 2006), mostrando mais um efeito nocivo do alto consumo de sacarose. A resistina é um peptídeo rico em cisteína, que é secretada no tecido adiposo e está fortemente associada com aumento de marcadores inflamatórios (Qi *et al.*, 2008). A quimiocina MCP-1 é secretada principalmente por macrófagos e por células endoteliais, mas pode também ser secretada pelos adipócitos (Chen *et al.*, 2005; Scherer, 2006; Wang *et al.*, 2008). Esta quimiocina promove o recrutamento de monócitos em tecidos inflamados (Weisberg *et al.*, 2006). Estudos com camundongos obesos mostram que níveis aumentados da expressão de MCP-1 promovem o recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo, desenvolvendo um estado de inflamação e de resistência à insulina (Kanda *et al.*, 2006).

Já está bem estabelecido na literatura que dietas hiperlipídicas podem causar esteatose hepática em animais de experimentação (Aguila *et al.*, 2003; Barbosa-da-Silva *et al.*, 2013), entretanto a esteatose hepática causada por dieta rica em sacarose não é bem descrita na literatura. Nossos resultados mostraram que camundon-

gos alimentados com dieta rica em sacarose também apresentaram esteatose hepática. Trabalhos mostram que a ingestão de grande quantidade de sacarose na dieta estimula a lipogênese de novo, aumentando a disponibilidade de ácidos graxos no fígado, provocando uma superprodução hepática de triglicerídeos (Ryu *et al.*, 2005; Postic e Girard, 2008). E este fato pode se dever ao fato da frutose e da glicose (que são componentes da sacarose) contribuírem na regulação do metabolismo de lipídios como indutores da SREBP-1c e da estearoil-CoA desaturase (SCD)-1 (Miyazaki *et al.*, 2004; Dentin *et al.*, 2005). De fato, os dados do presente estudo mostraram aumento da expressão hepática da SREBP-1c nos camundongos alimentados com dieta rica em sacarose, e isto foi consistente com os resultados de TG hepático e esteatose hepática nesses animais.

Por outro lado, a ativação do PPAR-α exerce efeitos benéficos sobre a obesidade e na diminuição da esteatose hepática (Chen *et al.*, 2010). Estes efeitos podem ser atribuídos a transcrição do PPAR-α induzida pela ativação de genes que estão envolvidos na beta-oxidação peroxissomal e mitocondrial e na oxidação de ácidos graxos no fígado (Reddy e Hashimoto, 2001; Magliano *et al.*, 2013). No presente estudo, os animais alimentados com dieta hiperlipídica e dieta rica em sacarose apresentaram diminuição da expressão hepática de PPAR-α, o que foi concomitante com o aumento da expressão de SREBP-1c.

Em resumo, os resultados do nosso trabalho, mostraram que os animais alimentados com dieta rica em sacarose não ficaram obesos, mas apresentaram hipertrofia dos adipócitos, bem como intolerância à glicose, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, esteatose hepática e aumento de citocinas inflamatórias. O consumo em excesso da sacarose, mesmo quando a sacarose substitui o amido na alimentação, mantendo a mesma densidade energética da dieta controle, pode provocar consequências importantes para a saúde.

# 6 **CONCLUSÃO**

Diante do exposto, pode-se concluir que os animais que receberam dieta hiperlipídica (grupos HF e HF/HSu) apresentaram aumento da massa corporal em relação aos animais que receberam dieta rica em sacarose e dieta controle (essas dietas são isoenergéticas) (grupos SC e HSu). O aumento da massa corporal dos animais dos grupos HF e HF/HSu pode ser justificado pelo aumento da eficiência alimentar das dietas hiperlipídicas. Entretanto, a dieta rica em sacarose, mesmo sem causar obesidade nos animais, provocou desequilíbrio no metabolismo glicídico e lipídico, hipertrofia dos adipócitos, esteatose hepática, aumento de citocinas inflamatórias e de fatores envolvidos na lipogênese hepática, além de concomitante diminuição de fatores envolvidos na beta-oxidação.

Vale ressaltar que a dieta rica em sacarose manteve o mesmo teor energético da dieta controle, havendo apenas substituição do amido de milho pela sacarose. Isto reforça o fato de que o consumo em excesso de sacarose é tão prejudicial para a saúde quanto à sobrecarga alimentar de lipídios.

**REFERÊNCIAS**

Aas V, Kase ET, Solberg R, Jensen J, Rustan AC. Chronic hyperglycaemia promotes lipogenesis and triacylglycerol accumulation in human skeletal muscle cells. Diabetologia 2004; 47:1452-1461.

Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KA, Wakil SJ. Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. Science 2001; 291:2613-2616.

Aguila MB, Fernandes-Santos C, Pinheiro-Mulder AR, Faria TS, Mandarim-de-Lacerda CA. Hepatic insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. In: Molière J, Gauthier L, eds. Insulin resistance: symptons, causes and treatment. Hauppauge, NY: Nova Science Pu. 2010:1-44.

Aguila MB, Pinheiro Ada R, 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. Adipose tissue as an endocrine organ. Obesity (Silver Spring) 2006; 14 Suppl 5:242S-249S.

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

Akagiri S, Naito Y, Ichikawa H, Mizushima K, Takagi T, Handa O, Kokura S, Yoshikawa T. A Mouse Model of Metabolic Syndrome; Increase in Visceral Adipose Tissue Precedes the Development of Fatty Liver and Insulin Resistance in High-Fat Diet-Fed Male KK/Ta Mice. J Clin Biochem Nutr 2008; 42:150-157.

Araya J, Rodrigo R, Videla LA, Thielemann L, Orellana M, Pettinelli P, Poniachik J. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Clin Sci (Lond) 2004; 106:635-643.

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.

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.

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

Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. Circ Res 2005; 96:939-949.

Bizeau ME, Pagliassotti MJ. Hepatic adaptations to sucrose and fructose. Metabolism 2005; 54:1189-1201.

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

Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. J Clin Invest 2004; 114:147-152.

Burt AD, Mutton A, Day CP. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. Semin Diagn Pathol 1998; 15:246-258.

Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. Nat Rev Cancer 2004; 4:579-591.

Catta-Preta M, Martins MA, Cunha Brunini TM, Mendes-Ribeiro AC, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by different high-fat diets. Nutrition 2012; 28:212-219.

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.

Chen A, Mumick S, Zhang C, Lamb J, Dai H, Weingarth D, Mudgett J, Chen H, MacNeil DJ, Reitman ML, Qian S. Diet induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its impact on obesity. Obes Res 2005; 13:1311-1320.

Chen H, Dardik B, Qiu L, Ren X, Caplan SL, Burkey B, Boettcher BR, Gromada J. Cevoglitazar, a novel peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/gamma dual agonist, potently reduces food intake and body weight in obese mice and cynomolgus monkeys. Endocrinology 2010; 151:3115-3124.

Cummings DE, Foster KE. Ghrelin-leptin tango in body-weight regulation. Gastroenterology 2003; 124:1532-1535.

Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. Diabetes 2001; 50:1714-1719.

Cummings JH, Roberfroid MB, Andersson H, Barth C, Ferro-Luzzi A, Ghoos Y, Gibney M, Hermansen K, James WP, Korver O, Lairon D, Pascal G, Voragen AG. A new look at dietary carbohydrate: chemistry, physiology and health. Paris Carbohydrate Group. Eur J Clin Nutr 1997; 51:417-423.

Cummings JH, Stephen AM. Carbohydrate terminology and classification. Eur J Clin Nutr 2007; 61 Suppl 1:S5-18.

Dentin R, Girard J, Postic C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key

regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. Biochimie 2005; 87:81-86.

Dong XC, Copps KD, Guo S, Li Y, Kollipara R, DePinho RA, White MF. Inactivation of hepatic Foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation. Cell Metab 2008; 8:65-76.

Faeh D, Minehira K, Schwarz JM, Periasamy R, Park S, Tappy L. Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. Diabetes 2005; 54:1907-1913.

FAO/WHO. Carbohydrates in human nutrition. Food and Agriculture Organization of the United Nations - Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. FAO Food and Nutrition. 1998; Paper no. 66.

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.

Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorti-coid. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83:847-850.

Fritsche K. Fatty acids as modulators of the immune response. Annu Rev Nutr 2006; 26:45-73.

Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. Am J Physiol Endocrinol Metab 2001; 280:E827-847.

Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. Science 2005; 307:426-430.

Fulgoni V, 3rd. High-fructose corn syrup: everything you wanted to know, but were afraid to ask. Am J Clin Nutr 2008; 88:1715S.

Fumeron F, Aubert R, Siddiq A, Betoulle D, Pean F, Hadjadj S, Tichet J, Wilpart E, Chesnier MC, Balkau B, Froguel P, Marre M. Adiponectin gene polymorphisms and

adiponectin levels are independently associated with the development of hyperglycemia during a 3-year period: the epidemiologic data on the insulin resistance syndrome prospective study. Diabetes 2004; 53:1150-1157.

Furuhashi M, Ura N, Murakami H, Hyakukoku M, Yamaguchi K, Higashiura K, Shimamoto K. Fenofibrate improves insulin sensitivity in connection with intramuscular lipid content, muscle fatty acid-binding protein, and beta-oxidation in skeletal muscle. J Endocrinol 2002; 174:321-329.

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

Gibson S, Gunn P, Wittekind A, Cottrell R. The effects of sucrose on metabolic health: a systematic review of human intervention studies in healthy adults. Crit Rev Food Sci Nutr 2013; 53:591-614.

Gil-Campos M, Canete RR, Gil A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. Clin Nutr 2004; 23:963-974.

Gramlich T, Kleiner DE, McCullough AJ, Matteoni CA, Boparai N, Younossi ZM. Pathologic features associated with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. Hum Pathol 2004; 35:196-199.

Guan HP, Li Y, Jensen MV, Newgard CB, Steppan CM, Lazar MA. A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. Nat Med 2002; 8:1122-1128.

Guillet-Deniau I, Pichard AL, Kone A, Esnous C, Nieruchalski M, Girard J, Prip-Buus C. Glucose induces de novo lipogenesis in rat muscle satellite cells through a sterol-regulatory-element-binding-protein-1c-dependent pathway. J Cell Sci 2004; 117:1937-1944.

Holness MJ, Smith ND, Greenwood GK, Sugden MC. Acute (24 h) activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) reverses high-fat feeding-induced insulin hypersecretion in vivo and in perifused pancreatic islets. J Endocrinol 2003; 177:197-205.

Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kowatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T. 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, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. J Clin Invest 2006; 116:1494-1505.

Kshatriya S, Liu K, Salah A, Szombathy T, Freeman RH, Reams GP, Spear RM, Villarreal D. Obesity hypertension: the regulatory role of leptin. Int J Hypertens 2011; 2011:270624.

Kuhlow D, Zarse K, Voigt A, Schulz TJ, Petzke KJ, Schomburg L, Pfeiffer AF, Ristow M. Opposing effects of dietary sugar and saturated fat on cardiovascular risk factors and glucose metabolism in mitochondrially impaired mice. Eur J Nutr 2010; 49:417-427.

Lewis AS, McCourt HJ, Ennis CN, Bell PM, Courtney CH, McKinley MC, Young IS, Hunter SJ. Comparison of 5% versus 15% sucrose intakes as part of a eucaloric diet in overweight and obese subjects: Effects on insulin sensitivity, glucose metabolism, vascular compliance, body composition and lipid profile. A Randomised Controlled Trial. Metabolism 2013.

Lin Q, Ruuska SE, Shaw NS, Dong D, Noy N. Ligand selectivity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. Biochemistry 1999; 38:185-190.

Livesey G. Fructose ingestion: dose-dependent responses in health research. J Nutr 2009; 139:1246S-1252S.

Lustig RH. Fructose: metabolic, hedonic, and societal parallels with ethanol. J Am Diet Assoc 2010; 110:1307-1321.

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

Macdonald GA, Prins JB. Peroxisomal fatty acid metabolism, peroxisomal proliferator-activated receptors and non-alcoholic fatty liver disease. J Gastroenterol Hepatol 2004; 19:1335-1337.

Magliano DC, Bargut TC, de Carvalho SN, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and gamma are targets to treat offspring from maternal diet-induced obesity in mice. PLoS One 2013; 8:e64258.

Malik VS, Popkin BM, Bray GA, Despres JP, Hu FB. Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. Circulation 2010; 121:1356-1364.

McCowen KC, Bistrian BR. Essential fatty acids and their derivatives. Curr Opin Gastroenterol 2005; 21:207-215.

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.

Miyazaki M, Dobrzyn A, Man WC, Chu K, Sampath H, Kim HJ, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and -independent mechanisms. J Biol Chem 2004; 279:25164-25171.

Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Prog Lipid Res 2009; 48:1-26.

Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T, Maegawa H, Kikkawa R, Kashiwagi A. Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPARalpha. Am J Physiol Endocrinol Metab 2002; 282:E1180-1190.

Naimi M, Gautier N, Chaussade C, Valverde AM, Accili D, Van Obberghen E. Nuclear forkhead box O1 controls and integrates key signaling pathways in hepatocytes. Endocrinology 2007; 148:2424-2434.

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.

Neyrinck AM, Bindels LB, De Backer F, Pachikian BD, Cani PD, Delzenne NM. Dietary supplementation with chitosan derived from mushrooms changes adipocytokine profile in diet-induced obese mice, a phenomenon linked to its lipid-lowering action. Int Immunopharmacol 2009; 9:767-773.

Nikpartow N, Danyliw AD, Whiting SJ, Lim H, Vatanparast H. Fruit drink consumption is associated with overweight and obesity in Canadian women. Can J Public Health 2012; 103:178-182.

Oleszczuk A, Spannbauer M, Tannapfel A, Bluher M, Hengstler J, Pietsch UC, Schuhmacher A, Wittekind C, Hauss JP, Schon MR. Regenerative capacity differs between micro- and macrovesicular hepatic steatosis. Exp Toxicol Pathol 2007; 59:205-213.

Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. Curr Opin Lipidol 2003; 14:561-566.

Palou A, Bonet ML, Pico C. On the role and fate of sugars in human nutrition and health. Introduction. Obes Rev 2009; 10 Suppl 1:1-8.

Patsouris D, Reddy JK, Muller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the effects of high-fat diet on hepatic gene expression. Endocrinology 2006; 147:1508-1516.

Picard F, Auwerx J. PPAR(gamma) and glucose homeostasis. Annu Rev Nutr 2002; 22:167-197.

Pico C, Oliver P, Sanchez J, Palou A. Gastric leptin: a putative role in the short-term regulation of food intake. Br J Nutr 2003; 90:735-741.

Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. J Clin Invest 2008; 118:829-838.

Qi Q, Wang J, Li H, Yu Z, Ye X, Hu FB, Franco OH, Pan A, Liu Y, Lin X. Associations of resistin with inflammatory and fibrinolytic markers, insulin resistance, and metabolic syndrome in middle-aged and older Chinese. Eur J Endocrinol 2008; 159:585-593.

Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. Annu Rev Nutr 2001; 21:193-230.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the re-formulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr 1993; 123:1939-1951.

Rinella ME, Green RM. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. J Hepatol 2004; 40:47-51.

Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. Clin Endocrinol (Oxf) 2006; 64:355-365.

Ruxton CH, Gardner EJ, McNulty HM. Is sugar consumption detrimental to health? A review of the evidence 1995-2006. Crit Rev Food Sci Nutr 2010; 50:1-19.

Ryu MH, Sohn HS, Heo YR, Moustaid-Moussa N, Cha YS. Differential regulation of hepatic gene expression by starvation versus refeeding following a high-sucrose or high-fat diet. Nutrition 2005; 21:543-552.

Sanchez J, Cladera MM, Llopis M, Palou A, Pico C. The different satiating capacity of CHO and fats can be mediated by different effects on leptin and ghrelin systems. Behav Brain Res 2010; 213:183-188.

Saúde Md. 2008. Guia alimentar para a população brasileira: Promovendo a alimentação saudável. In: Básica. A, editor. Brasília: MS. p 210p.

Schachter HM, Reisman J, Tran K, Dales B, Kourad K, Barnes D, Sampson M, Morrison A, Gaboury I, Blackman J. Health effects of omega-3 fatty acids on asthma. Evid Rep Technol Assess (Summ) 2004:1-7.

Schaffler A, Scholmerich J, Buchler C. Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in nonalcoholic fatty liver disease. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2005; 2:273-280.

Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. Diabetes 2006; 55:1537-1545.

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.

Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. Mikroskopie 1970; 26:57-60.

Schulze MB, Hu FB. Dietary approaches to prevent the metabolic syndrome: quality versus quantity of carbohydrates. Diabetes Care 2004; 27:613-614.

Shimomura I, Shimano H, Korn BS, Bashmakov Y, Horton JD. Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. J Biol Chem 1998; 273:35299-35306.

Shindo N, Fujisawa T, Sugimoto K, Nojima K, Oze-Fukai A, Yoshikawa Y, Wang X, Yasuda O, Ikegami H, Rakugi H. Involvement of microsomal triglyceride transfer protein in nonalcoholic steatohepatitis in novel spontaneous mouse model. J Hepatol 2010; 52:903-912.

Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. Gastroenterology 2007; 132:2169-2180.

Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. J Clin Endocrinol Metab 2007; 92:1023-1033.

Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Hepatic structural alteration in adult programmed offspring (severe maternal protein restriction) is aggravated by post-weaning high-fat diet. Br J Nutr 2007; 98:1159-1169.

Stanhope KL, Havel PJ. Fructose consumption: recent results and their potential implications. Ann N Y Acad Sci 2010; 1190:15-24.

Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, Hatcher B, Cox CL, Dyachenko A, Zhang W, McGahan JP, Seibert A, Krauss RM, Chiu S, Schaefer EJ, Ai M, Otokozawa S, Nakajima K, Nakano T, Beysen C, Hellerstein MK, Berglund L, Havel PJ. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. J Clin Invest 2009; 119:1322-1334.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. Nature 2001; 409:307-312.

Sun S, Ji Y, Kersten S, Qi L. Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. Annu Rev Nutr 2012; 32:261-286.

Swanson JE, Laine DC, Thomas W, Bantle JP. Metabolic effects of dietary fructose in healthy subjects. Am J Clin Nutr 1992; 55:851-856.

Tappy L, Le KA, Tran C, Paquot N. Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. Nutrition 2010; 26:1044-1049.

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

Tordjman J, Khazen W, Antoine B, Chauvet G, Quette J, Fouque F, Beale EG, Benelli C, Forest C. Regulation of glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carbox-

ykinase by fatty acids, retinoic acids and thiazolidinediones: potential relevance to type 2 diabetes. Biochimie 2003; 85:1213-1218.

Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. Br J Nutr 2004; 92:347-355.

Trumbo P, Schlicker S, Yates AA, Poos M. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. J Am Diet Assoc 2002; 102:1621-1630.

Tschanz SA, Burri PH, Weibel ER. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. J Microsc 2011; 243:47-59.

Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. The evolving role of leptin and adiponectin in chronic liver diseases. Am J Gastroenterol 2006; 101:2629-2640.

Unger RH. Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. Endocrinology 2003; 144:5159-5165.

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

Wang P, Mariman E, Renes J, Keijer J. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. J Cell Physiol 2008; 216:3-13.

Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. J Clin Invest 2006; 116:115-124.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest 2003; 112:1796-1808.

Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. J Clin Invest 2005; 115:1111-1119.

White JS. Straight talk about high-fructose corn syrup: what it is and what it ain't. Am J Clin Nutr 2008; 88:1716S-1721S.

WHO/FAO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. World Health Organ Tech. Rep. Ser. 2003; 916:1-149.

Wolf A, Bray GA, Popkin BM. A short history of beverages and how our body treats them. Obes Rev 2008; 9:151-164.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses

insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. Nat Med 2001; 7:941-946.

Ye JM, Iglesias MA, Watson DG, Ellis B, Wood L, Jensen PB, Sorensen RV, Larsen PJ, Cooney GJ, Wassermann K, Kraegen EW. PPARalpha /gamma ragaglitazar eliminates fatty liver and enhances insulin action in fat-fed rats in the absence of hepatomegaly. Am J Physiol Endocrinol Metab 2003; 284:E531-540.

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.

Zivkovic AM, German JB, Sanyal AJ. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. Am J Clin Nutr 2007; 86:285-300.

**ANEXO A -** Comprovante de submissão de artigo científico

From: **Journal of Nutritional Biochemistry** <jnb@uky.edu>
Date: 2013/6/7
Subject: JNB Submission: Manuscript Number Assigned
To: mbaguila@uerj.br,

Ms. No.: JNB-13-329
Title: The inflammatory profile and liver damage of a sucrose-rich diet in mice
Corresponding Author: Prof. Marcia Barbosa Aguila
Authors: Liliane S Oliveira, RD; Daiane A Santos, RD; Sandra Barbosa-da-Silva, RD, PhD; Carlos A Mandarim-de-Lacerda, MD, PhD;

Dear Prof. Aguila,

Your submission, referenced above, has been assigned the following manuscript number: JNB-13-329. Please refer to this number when communicating with the Journal office.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author: http://ees.elsevier.com/jnb/
Your username is: mbaguila@uerj.br
If you need to retrieve password details, please go to:
http://ees.elsevier.com/jnb/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to the Journal of Nutritional Biochemistry.

Sincerely,

Joseph R. Richardson
Editorial Manager

The Journal of Nutritional Biochemistry
Bernhard Hennig, Editor-in-Chief

www.elsevier.com/locate/jnutbio/

University of Kentucky
900 Limestone Street
Rm. 599 Wethington Building
Lexington, KY 40536-0200
Tel: (859) 323-4933 ext. 81388
Fax: (859) 323-4933 ext. 81388
E-mail: jnb@uky.edu

**ANEXO B -** Comitê de ética em experimentação animal

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES

ibrag Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes

**COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

**C E R T I F I C A D O**

Certificamos que o Protocolo nº **CEUA/037/2011** sobre "**Efeitos da dieta hiperlipídica e/ou rica em sacarose sobre adipogênese e remodelamento hepático e pancreático em camundongos**", sob a responsabilidade de **Márcia Barbosa Águila,** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **01/09/2011.** Este certificado expira em **01/09/2015.**

Rio de Janeiro, 01 de Setembro de 2011.

Profa. Patricia Cristina Lisboa
CEA/IBRAG/UERJ

Prof. Israel Felzenszwalb
CEA/IBRAG/UERJ

Profª Dra. Patrícia Cristina Lisboa da S.
Profª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas - IBRAG - UE
Matrícula 34765-8

Israel Felzenszwalb
Diretor
IBRAG - UERJ
Mat. 2887-8

/.ass

☎ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br