

CLAUDIA REGINA BARBOSA

Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso
de Pós-Graduação Ciências Médicas da
Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP,
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Médicas, área de Ciências Biomédicas do(a)
aluno(a) **CLÁUDIA REGINA BARBOSA**.

Campinas, 25 de Agosto de 2004.

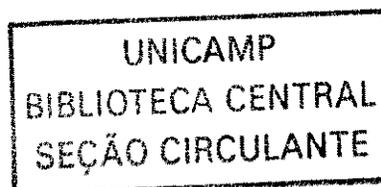
Lúcia Nassi Castilho

Prof(a). Dr(a). Lúcia Nassi Castilho
Orientador(a)

***EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM
MONOSSACARÍDEOS SOBRE O PERFIL LIPÍDICO
DE RATOS E CAMUNDONGOS***

CAMPINAS

2004



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/unicamp
	B234e
V	EX
TOMBO BC/	61689
PROC.	10-86-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	03/11/05
Nº CPD	

Bib id 338568

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

B234e

Barbosa, Claudia Regina

Efeitos da suplementação dietética com monossacarídeos sobre o perfil lipídico de ratos e camundongos / Claudia Regina Barbosa. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientadores : Lúcia Nassi Castilho, Eliana Cotta de Faria
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Camundongos. 2. Ratos Wistar. 3. Triglicérides. I. Lúcia Nassi Castilho. II. Eliana Cotta de Faria. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

SLP

CLAUDIA REGINA BARBOSA

***EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM
MONOSSACARÍDEOS SOBRE O PERFIL LIPÍDICO
DE RATOS E CAMUNDONGOS***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências
Biomédicas*

Orientador: Prof^a Dra. Lúcia Nassi Castilho

Co-Orientadora: Prof^a Dra. Eliana Cotta de Faria

CAMPINAS

2004

Data da Defesa: 25/08/2004

Banca Examinadora

Profª. Dra. Lúcia Nassi Castilho (*Orientadora*)

Profª. Dra. Célia Garlipp

Profª. Dra. Patrícia Miralda Cazita

Profª. Dra. Helena Coutinho F. de Oliveira

Profª. Dra. Márcia Marília Fagian

Profª. Dra. Águeda Cleofe Marques Zaratini

200509125

*Dedico este trabalho à Deus, que sem
Ele nada poderia fazer*

*Aos meus pais, Luiz e Vera, por todo
apoio, amor, paciência e carinho*

*A minha irmã, Rossana, que sempre
esteve ao meu lado dando - me
segurança*

*Aos meus amigos, que me ajudaram
com palavras amigas e encorajadoras*

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dra. Lúcia Nassi Castilho, que dedicou com grande empenho seu tempo e sua experiência na execução da dissertação

À Prof.^a Dra. Eliana Cotta de Faria, minha co-orientadora, pelo constante apoio no decorrer do trabalho

À Prof.^a Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira, docente do IB/UNICAMP, por ceder as instalações de seu laboratório para o desenvolvimento deste trabalho e pelo exemplo de seriedade científica e amizade

Aos colegas do IB/UNICAMP, Alessandro, Patrícia e Andréa

Aos colegas do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, especialmente ao Jorge Airton Cicala pelo apoio na diagramação da tese.

Aos colegas do Laboratório de Lípidos, da Faculdade de Medicina da USP, especialmente a Lila Harada por sua dedicação

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Clínica da Divisão de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP

A todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Patologia Clínica da UNICAMP

Aos amigos, Camilo, Patrícia, Jaime, Sandra, Roseli, Edilma, Vera, Eduardo, Lourdes, Eugênio, Aparecida Sousa Pereira (Cidinha), Laura, Sílvio, Juliana, Elizabete, Ranu, Miriam, Valéria, Denise, Bruno, Rai, por acreditarem em mim e pelas palavras de incentivo

Ao CNPQ pelo apoio financeiro

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xii</i>
ABSTRACT	<i>xv</i>
1 - INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1 - Carboidratos.....	19
1.2 - Lípides.....	21
1.3 - Hipertriacilglicerolemia e consumo de carboidratos.....	24
2 - OBJETIVOS	29
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	31
4 - RESULTADOS	35
Capítulo: Wistar rats and C57BL/6 mice present distinct lipemic responses to an oral carbohydrate supplementation.....	36
5 - DISCUSSÃO GERAL	55
6 - CONCLUSÕES GERAIS	59
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
8 - ANEXOS	69

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL	Ácidos Graxos Livres
AIUC	Area Incremental Under Curve (Área Incremental sob a Curva)
Apo	Apolipoprotein (Apolipoproteína)
Apo A	Apolipoprotein A (Apolipoproteína A)
Apo B48	Apolipoprotein B48 (Apolipoproteína B48)
Apo C	Apolipoprotein C (Apolipoproteína C)
Apo CII	Apolipoprotein CII (Apolipoproteína CII)
Apo E	Apolipoprotein E (Apolipoproteína E)
AUC	Area Under Curve (Área sob a Curva)
CETP	Cholesteryl Ester Transfer Protein (Proteína de Transferência de Colesterol Éster)
Chol	Cholesterol
Col	Colesterol
FFA	Free Fatty Acids
FRUT	Fructose
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas)
GLIC	Glicose

HDL	High Density Lipoprotein (Lipoproteína de Alta Densidade)
HDL – col	Colesterol de HDL
HOMA	Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance (Modelo Homeostático para Resistência Insulínica)
IDL	Intermediate Density Lipoprotein (Lipoproteína de Densidade Intermediária)
LCAT	Lecithin- Cholesterol Acyltransferase (Lecitina: Colesterol Acil Transferase)
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de Baixa Densidade)
LDL-col	Colesterol de LDL
LH	Hepatic Lipase (Lipase Hepática)
LLP	Lipoprotein Lipase (Lipoproteína Lipase)
LRP	LDL Receptor-Related Protein (Receptor de Partículas Remanescentes)
mRNA	RNA Mensageiro
QM	Quilomícron
R-QM	Remanescentes de Quilomícrons
R –VLDL	Receptor de VLDL
SR-B1	Scavenger Receptor B1, (Receptor <i>Scavenger</i> Classe B tipo 1)
VLDL	Very Low Density Lipoprotein, (Lipoproteína de Densidade Muito Baixa)

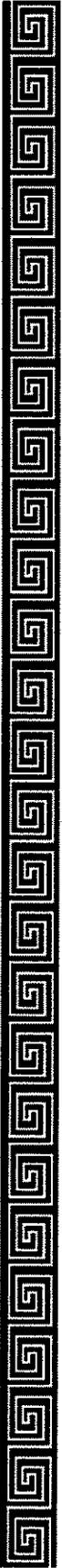
LISTA DE TABELAS

	<i>Pág.</i>
Table 1 - Wistar rats fasting biochemical parameters before and after supplementation during 21 days with glucose or fructose.....	50
Table 2 - C57BL/6 mice fasting biochemical parameters before and after supplementation during 21 days with glucose or fructose.....	51

	Pág.
Figura I - Metabolismo de lipoproteínas plasmáticas. LLP- lipoproteína lipase, LH- lipase hepática, LCAT- lecitina colesterol acil transferase, CETP- proteína de transferência de ésteres de colesterol. Adaptada de: Lipoprotein Metabolism. Univ. South Florida, disponível no endereço hsc.usf.edu/2005/firstsemester.html . Acesso em: 26/06/2004.....	24
Figura 1 - Area under the curve (AUC) and area incremental under the curve (AIUC) of body weigh, diet and water consumptions of Wistar rats (A, B) and mice (C, D) treated during 21 days with glucose or fructose. *P=0.0027; **P<0.001; #P=0.0041; †P=0.0016; ‡P=0.0003..	52
Figura 2 - Lipid percentual composition of Wistar rats serum lipoproteins isolated by FPLC before and after dietary supplementation (21 days) with glucose (panel A, C) or fructose (panel B, D).....	53
Figura 3 - Lipid percentual composition of C57BL/6 mice serum lipoproteins isolated by FPLC before and after (21 days) dietary supplementation with glucose (panel A, C) or fructose (panel B, D).....	54

LISTA DE ANEXOS

	<i>Pág.</i>
Anexo 1 - Distribuição de colesterol e triacilglicerol nas lipoproteínas séricas em “pool” de ratos antes e após tratamento dietético com frutose, obtida por FPLC.....	70
Anexo 2 - Distribuição de colesterol e triacilglicerol nas lipoproteínas séricas em “pool” de camundongos antes e após tratamento dietético com frutose, obtida por FPLC.....	71
Anexo 3 - Diferenças percentuais da suplementação dietética com glicose e frutose 50% para parâmetros bioquímicos em ratos e camundongos.....	72



RESUMO

A dieta é um dos fatores externos mais importantes que atuam sobre os lipídeos plasmáticos e que pode ser facilmente modificada. Vários estudos na literatura mostram que dieta rica em carboidratos especialmente em sacarose, aumentam as concentrações séricas de triacilgliceróis e diminuem o colesterol presente nas lipoproteínas de alta densidade, contribuindo assim para o aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares em seres humanos.

O objetivo do presente trabalho foi comparar o efeito da suplementação dietética com monossacarídeos (glicose e frutose) sobre o perfil lipídico, a glicemia, a insulinemia e a resistência à insulina em ratos e camundongos, comparando a eficiência destes carboidratos em alterar esses parâmetros bioquímicos séricos e comparar as respostas metabólicas dentro da família *Muridae*.

Ratos Wistar e camundongos C57BL/6 adultos, machos foram submetidos à suplementação dietética por 21 dias com solução de glicose ou frutose 50%, administrada diariamente por gavagem. Amostras de sangue dos animais foram coletadas, em jejum de 12 horas, antes e após o tratamento com carboidratos para quantificação dos parâmetros bioquímicos séricos, por métodos enzimáticos colorimétricos ou imunoenzimáticos. A porcentagem de colesterol e triacilgliceróis nas lipoproteínas séricas foi determinada após seu isolamento por cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC).

Em ratos, a glicemia e a colesterolemia não sofreram alterações significativas após o tratamento com glicose, porém diferenças significativas (aumento da glicemia e diminuição da colesterolemia) foram encontradas nestes parâmetros quando o carboidrato suplementado era a frutose. A frutose também foi responsável por aumento importante, porém não estatisticamente significativo, nas concentrações séricas de insulina (54%), quando comparada à suplementação com glicose (26%) e o índice que avalia a resistência à insulina (HOMA) também foi aumentado em média 1,2 vezes após os tratamentos. O tratamento com glicose ou frutose promoveu variações significativas importantes na triacilglicerolemia dos ratos (aumento de 62% x 41%, respectivamente para tratamento com glicose e frutose).

Camundongos apresentaram, em média, um aumento de 45% na glicemia de jejum após o tratamento com carboidratos e uma diminuição significativa (somente para os camundongos tratados com glicose) na insulina sérica (33%). O índice que avalia a resistência à insulina (HOMA) não foi alterado pelo tratamento com monossacarídeos. Em relação ao perfil lipídico, os camundongos após tratamento com carboidratos apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) nas concentrações séricas de colesterol total, colesterol nas lipoproteínas de alta e baixa densidades, triacilgliceróis e ácidos graxos livres. Comparando-se o efeito produzido pelos monossacarídeos nos parâmetros séricos, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos.

Ratos e camundongos apresentaram diferentes respostas metabólicas quando submetidos à suplementação dietética com carboidratos por curto período de tempo: ratos são mais resistentes à insulina, desenvolvendo hipertriacilglicerolemia e hiperinsulinemia diferentemente dos camundongos que apresentaram diminuição destes parâmetros. Além disso, nos camundongos houve uma redução nas concentrações séricas de colesterol total e no colesterol presente em HDL, VLDL e LDL.



ABSTRACT

The diet is one of the most important external factors that acts on serum lipids and that can be easily modified. Some studies in literature show that diet rich in carbohydrates especially sucrose, increase the triacylglycerol levels and diminish the cholesterol in high density lipoproteins, thus contributing for the increased risk of development of cardiovascular diseases in humans. The objective of the present work was to compare the effect of the dietary supplementation with monossacharides (glucose or fructose) on the lipid profile, the glycemia, the insulinemia and the insulin resistance index of rats and mice, comparing the efficiency of these carbohydrates in modifying these serum parameters and also compare the metabolic responses of the *Muridae* family. Adult, male Wistar rats and mice C57BL/6 were submitted to a dietary supplementation for 21 days with 50% glucose or fructose solution, administrated daily by oral gavage. Blood samples were collected, after 12 hours fasting, before and after the treatment with carbohydrates for biochemical parameter quantifications by colorimetric or imunoenzymatic methods. The percentage of cholesterol and triacylglycerol in lipoproteins was determined after plasma fractionation by fast protein liquid chromatography (FPLC). In rats, the glycemia and the cholesterolemia were not altered significantly after the glucose treatment, however significant differences (increase in glycemia and decrease in cholesterolemia) were found in these parameters when the supplemented carbohydrate was fructose. Fructose also induced increase in insulin levels (54%), when compared with glucose supplementation (26%). The index that evaluate the insulin resistance (HOMA) was increased in average 1.2 times after the treatments. The treatment with glucose or fructose promoted significant elevations in the triacylglycerolemia in rats (62% x 41%, respectively for glucose or fructose treatments). Mice presented, in average, an increase of 45% in fasting glycemia after the carbohydrate treatments and a significant reduction (only for glucose treated mice) in serum insulin (33%). The HOMA index was not modified by the monossacharide treatments. Regarding the lipid profile, the carbohydrate treated mice presented a significant reduction ($p < 0,05$) in serum concentrations of total cholesterol, cholesterol in high and low density lipoproteins, triacylglycerol and free fatty acids. Comparing the effect produced by the two monossacharides on the serum parameters, no significant differences were found in the treated animals.

Rats and mice presented different metabolic responses when submitted to a short period of dietary supplementation with carbohydrate: rats are susceptible to insulin resistance by developing hypertriacylglycerolemia and hyperinsulinemia, while mice presented reduction in these parameters. On the other hand, the mice presented greater variations (reduction) in the total cholesterol levels and in the cholesterol in HDL, VLDL and LDL.



1 - INTRODUÇÃO GERAL

1.1 - CARBOIDRATOS

Os carboidratos são compostos constituídos por carbono, hidrogênio e oxigênio, onde normalmente a proporção de hidrogênio e oxigênio é de 2:1, semelhante à da água e apresentam fórmula geral $C_n(H_2O)_n$.

Fisiologicamente os carboidratos mais importantes são a glicose, a frutose e a galactose que contém 6 átomos de carbono (hexoses) (THREATTE e HENRY, 1996). A glicose é a principal fonte de energia para o organismo humano e é derivada primariamente dos carboidratos ingeridos da dieta (cereais, farinhas e legumes), dos estoques de carboidratos do organismo e de síntese endógena a partir de proteínas ou do glicerol que compõe os triacilgliceróis (CARAWAY e WATTS, 1986).

Estruturalmente os açúcares são aldeídos ou cetonas poli-hidroxiladas. A molécula que apresentar uma única dessas estruturas, será um monossacarídeo e, se apresentar mais de uma dessas estruturas, teremos os polissacarídeos ou, mais especificamente, dissacarídeos no caso de duas estruturas.

Os monossacarídeos contendo 3, 4, 5 ou 6 átomos de carbonos não podem ser hidrolisados a unidades menores, em condições razoavelmente suaves. Os monossacarídeos mais simples são a aldose gliceraldeído e o seu isômero, a diidroxiacetona. Desta forma, os monossacarídeos podem ser descritos não apenas pelo grupo funcional, como também pelo número de átomos de carbono que possuem (LEHNINGER, 1976). Os principais monossacarídeos encontrados nos alimentos são a glicose, a frutose e a galactose.

Os dissacarídeos são carboidratos ditos glicosídeos, pois são formados a partir da ligação de 2 monossacarídeos por meio de ligações glicosídicas que ocorrem entre o grupo aldeído ou cetona de um monossacarídeo ao grupo aldeído, cetona ou álcool de outro monossacarídeo, com a perda de uma molécula de água. Os glicosídeos podem ser formados também pela ligação de um carboidrato a uma estrutura não-carboidrato, como uma proteína, por exemplo. Os dissacarídeos mais importantes são: maltose (glicose+glicose), lactose (glicose+galactose) e sacarose (glicose+frutose).

Os polissacarídeos, carboidratos complexos, são macromoléculas formadas por várias unidades monossacarídicas, ligadas entre si por ligações glicosídicas. Os polissacarídeos mais importantes são os formados pela polimerização da glicose: amido (polissacarídeo de reserva das células vegetais), glicogênio (polissacarídeo de reserva das células animais) e celulose (componente importante da parede das células vegetais).

Os carboidratos desempenham importantes funções nos seres vivos: energéticas, de reserva e estruturais (OLIVEIRA e MARCHINI, 1998). Do ponto de vista energético, um dos carboidratos mais simples, a glicose, representa a substância de aproveitamento mais rápido e efetivo nos seres vivos sendo sua combustão extremamente importante para suprir as necessidades calóricas. Quando a ingestão calórica diária excede o gasto energético, o excesso de glicose é convertido a ácidos graxos e estocado no tecido adiposo e, inversamente quando as necessidades diárias calóricas não são suficientemente supridas, a glicose é obtida a partir da hidrólise do glicogênio hepático ou de fontes não carboidratos como aminoácidos, lactato e glicerol.

Como material de reserva, os carboidratos existem no reino vegetal sob a forma de amido e, no reino animal sob forma de glicogênio, ambos suscetíveis à hidrólise. O amido é encontrado nas gramíneas, leguminosas, tubérculos e cereais que, em conjunto, constituem a fonte mais importante de carboidratos na dieta do ser humano. Nos animais, o glicogênio é material de reserva que fornece glicose, quando as condições fisiológicas o exigem. Sob o ponto de vista nutritivo, a ingestão de grande diversidade de alimentos que contém amido, dextrina, sacarose e outros carboidratos, fornecem glicose diretamente utilizável (MONTGOMERY e CONWAY, 1994).

Em relação à função estrutural, os carboidratos têm importante papel nos animais e nas plantas. Nos animais, alguns carboidratos de grande peso molecular formam substâncias como a quitina, o ácido condroitinossulfúrico e o ácido hialurônico, que constituem parte dos tecidos de sustentação.

A absorção da glicose nos mamíferos se dá por meio de mecanismos específicos mediados por carreadores com especificidade e estereoespecificidade pelo substrato, capaz de apresentar uma cinética de saturação e inibição específica. Além disso, a glicose atravessa a borda em escova da membrana do enterócito por um processo de difusão simples, embora seja extremamente lento. Pelo menos dois mecanismos de

transporte de monossacarídeos mediados por carreador são conhecidos: - um co-transportador dependente de Na^+ e um transportador independente de Na^+ . Na membrana da borda em escova do enterócito, tanto a glicose como a galactose são transportadas pelo transportador de glicose dependente de Na^+ . Esta proteína ligada à membrana liga-se com a glicose e com o Na^+ em sítios independentes para transportá-los para o citosol. Desta forma, o Na^+ é transportado contra um gradiente de concentração, carreando uma molécula de glicose. Este mecanismo de transporte é ligado à ATPase dependente de Na^+ , que remove o Na^+ da célula, em substituição pelo K^+ , com hidrólise concomitante de ATP. Desta forma, o transporte da glicose é um processo ativo indireto (STRYER, 1992). Já a frutose, por outro lado, é transportada do lúmen intestinal por um processo de difusão facilitada (independente de Na^+) por meio de sua ligação com o transportador GLUT5 associado à membrana (BOOM, 2000).

1.2 - LÍPIDES

Os lípides são substâncias orgânicas insolúveis em água, porém solúveis em solventes orgânicos. São transportados no plasma e em outros compartimentos na forma de lipoproteínas, que são complexos macromoleculares compostos por um núcleo lipídico hidrofóbico (composto principalmente por colesterol esterificado e triacilglicerol) e uma superfície externa formada por fosfolípidos, colesterol livre e proteínas (apolipoproteínas). Os lípides estão amplamente distribuídos em todos os tecidos e desempenham importantes funções no organismo: armazenamento de energia (principalmente triacilglicerol), precursores de hormônios esteróides (gônadas e adrenal) e de ácidos biliares (colesterol), atuam como mensageiros intra e extracelulares (prostaglandinas), e também apresentam função estrutural (fosfolípidos e colesterol de membranas).

Quimicamente, os lípidos complexos são compostos que por hidrólise fornecem ácidos graxos ou álcoois complexos.

Fisiologicamente, os lípidos mais importantes são: a) colesterol, um álcool insaturado de alto peso molecular, componente estrutural importante de todas as membranas celulares e um precursor para biossíntese dos ácidos biliares, hormônios

esteróides e vitamina D; b) ácidos graxos, compostos por uma cadeia alquila ligada ao grupamento COOH, são classificados pelo número de duplas ligações na cadeia (saturados, mono e polinsaturados) e também pelo número de átomos de carbono (cadeia curta, média e longa); c) triacilgliceróis, cadeias longas de ésteres de ácidos graxos ligados ao glicerol, constituem aproximadamente 95% do tecido adiposo, sendo a principal forma de armazenamento de lípidos no homem; d) fosfolípidos, formados por esterificação de ácidos graxos e fosfato aos grupamentos hidroxilas do glicerol. A combinação de regiões hidrofóbicas e hidrofílicas dos fosfolípidos faz com que estes sejam miscíveis na interface água-lípidos sendo, portanto componentes importantes das membranas celulares e da superfície das lipoproteínas.

Após sua absorção, os lípidos são transportados no plasma incorporados às lipoproteínas, cuja função é suprir os tecidos com lípidos provenientes da dieta ou sintetizados pelo próprio organismo (Figura I).

O transporte de material lipídico absorvido da dieta é feito por meio da sua incorporação nos quilomícrons (QM) que são lipoproteínas sintetizadas pelas células intestinais, que possuem em sua composição apolipoproteína B-48 (apo B48). Os QM entram na circulação linfática e atingem a corrente sanguínea através do ducto torácico, podendo receber diferentes apolipoproteínas (apo A, C e E) e componentes de superfície como colesterol livre e fosfolípidos de outras lipoproteínas. Nos capilares, os QM sofrem a ação da enzima lipoproteína lipase (LLP) que, ativada pela apo C-II, hidrolisa os triacilgliceróis, liberando os ácidos graxos transformando-se em partículas de menor tamanho, os remanescentes de quilomícrons- (R-QM) (MAHLEY & HUSSAIN, 1991). Os R-QM são removidos da circulação por receptores específicos localizados nas células hepáticas. A ligação entre a partícula remanescente e seu sítio de remoção no hepatócito é exclusivamente dependente da interação entre as apoE e o receptor celular específico. A apoE possui regiões ricas em aminoácidos básicos que constituem o domínio de reconhecimento pelo receptor de alta afinidade, localizado na membrana celular e denominado “receptor de partículas remanescentes” ou “receptor E”, ou ainda, LRP (*LDL receptor-related protein*) (KRIEGER & HERZ, 1994).

As VLDL (*very low density lipoproteins* ou lipoproteínas de muito baixa densidade) são sintetizadas pelo fígado e são responsáveis pelo transporte dos lípides de origem endógena. Possuem como apolipoproteína estrutural a apo B-100. Na circulação, as VLDL sofrem a ação da LLP que hidrolisa os triacilgliceróis, originando remanescentes de VLDL (R-VLDL) ou IDL (*intermediate density lipoproteins* ou lipoproteínas de densidade intermediária) (MAHLEY & INNERARITY, 1984). Essas partículas seguem dois caminhos: aproximadamente metade das IDL são captadas pelo fígado, via receptores B/E e catabolizados intracelularmente. O restante sofre ação da lipase hepática, principalmente no fígado, formando as LDL (*low-density lipoprotein* ou lipoproteínas de baixa densidade). Vale salientar que as LDL são as principais carreadoras de colesterol para os tecidos periféricos. A síntese de colesterol e dos receptores B/E pelas células variam na razão inversa da concentração de colesterol livre intracelular (BROWN & GOLDSTEIN, 1986).

Parte do material liberado pela ação da LLP sobre os QM e as VLDL é utilizada na síntese de outra lipoproteína: HDL (*high-density lipoproteins* ou lipoproteínas de alta densidade). As partículas de HDL (sintetizadas também no intestino e no fígado) têm como componentes principais a apo A-I e os fosfolípidos. Essas partículas, na sua forma inicial, apresentam formato de disco, sendo chamadas de HDL nascentes. As HDL têm grande importância no transporte de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado (transporte reverso de colesterol) (TALL, 1998). As HDL nascentes removem colesterol livre dos tecidos periféricos e, pela ação da enzima lecitina-colesterol-acil-transferase (LCAT), o colesterol livre é esterificado, originando assim as HDL maduras (APPLEBAUM-BOWDEN, 1995). Estas transportam o colesterol para o fígado por duas vias: 1) diretamente, através de um processo denominado captação seletiva de ésteres de colesterol, no qual está envolvido o receptor SR-B1 (Scavenger Receptor- classe B tipo I) (RIGOTTI et al., 1997) e 2) transferindo os ésteres de colesterol para outras lipoproteínas, pela ação da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP - *cholesterol ester transfer protein*) (TALL, 1995). Uma vez no fígado, o colesterol proveniente dos tecidos pode ser reaproveitado, participando de outras vias metabólicas, ou é excretado na bile (principal via de eliminação), com reabsorção de cerca de 50% através da circulação entero-hepática (GARCIA et al., 1992).

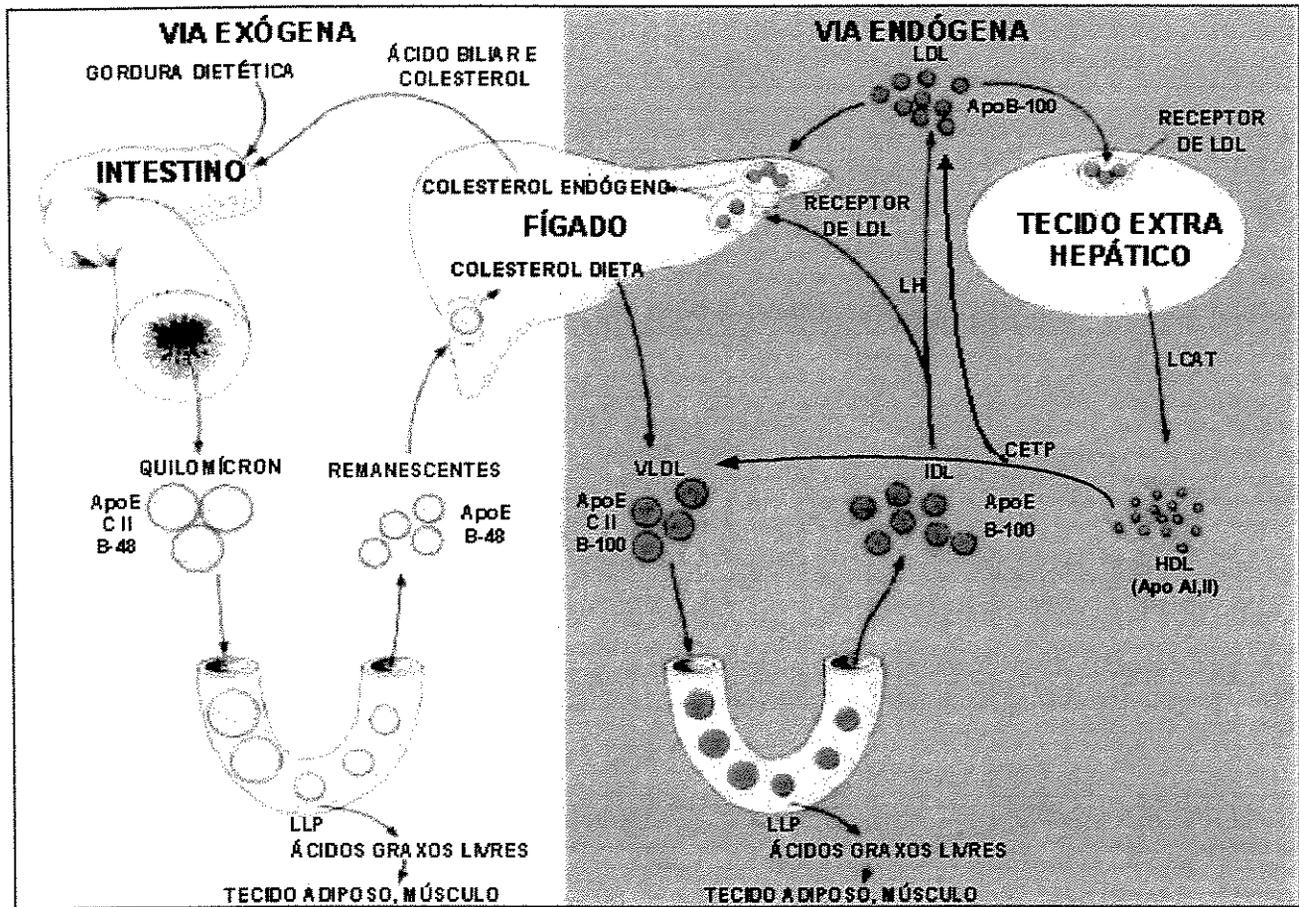


Figura I - Metabolismo de lipoproteínas plasmáticas. LLP- lipoproteína lipase, LH- lipase hepática, LCAT- lecitina colesterol acil transferase, CETP- proteína de transferência de ésteres de colesterol. Adaptada de: Lipoprotein Metabolism. Univ. South Florida, disponível no endereço hsc.usf.edu/2005/firstsemester.html. Acesso em: 26/06/2004.

1.3 - HIPERTRIACILGLICEROLEMIA E CONSUMO DE CARBOIDRATOS

A hipertriacilglicerolemia é definida, em seres humanos, por concentrações de triacilgliceróis (TG) no plasma acima de 150 mg/dL, segundo o NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM III (NCEP III, 2001). Pode ser de origem primária (genética) ou secundária a fatores ambientais, drogas ou doenças diversas. Como exemplo de hipertriacilglicerolemia primária temos a deficiência de lipoproteína lipase e/ou

de apo CII, monogénicas, e a síndrome metabólica X, poligênica. Como causas secundárias da hipertriacilglicerolemia podemos citar a obesidade, uso de álcool e dieta rica em carboidratos (STONE, 1994).

Na década de 50, a hipertriacilglicerolemia induzida por carboidratos foi observada em estudos de manipulação dietética que tinham por objetivo reduzir a concentração sérica de colesterol (WATKIN, 1950; HATCH, 1955). Para a obtenção deste efeito, a porcentagem de energia fornecida por gordura era substituída por carboidratos. Esta nova abordagem dietética mostrou que carboidratos, particularmente a sacarose e a frutose levavam ao desenvolvimento de hipertriacilglicerolemia e a uma diminuição do colesterol da HDL. Hoje sabe-se que estas condições estão associadas ao aumento do risco de doenças cardiovasculares. (KATAN et al, 1997; PARKS et al, 2000; PARKS, 2001; FRIED & RAO, 2003). Atualmente a proporção dos componentes dietéticos recomendada para indivíduos adultos saudáveis, segundo a AMERICAN SOCIETY FOR NUTRITION SCIENCES (2004) é: 60% das calorias totais fornecida por carboidratos, (30% mono e dissacarídeos e 30% de carboidratos complexos), 30% de lípidos e 20% de proteínas.

Em 1961, AHRENS et al descreveram dois tipos de hiperlipidemias no homem: hipertriacilglicerolemia endógena e hipertriacilglicerolemia associada à ingestão de carboidratos, que mais tarde foram relacionadas ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (FREDRICKSON et al, 1967), isquêmicas (CARLSON e BOTTINGER, 1972).

O efeito da dieta contendo carboidratos depende do tipo de carboidrato ingerido, da porcentagem total de energia fornecida por carboidrato, da espécie, sexo e idade em que o estudo é realizado, e do tempo de utilização da dieta (TRUSWELL et al, 1994). Exemplificando, recentemente BANTLE e colaboradores (2000) estudaram o efeito da frutose dietética na triacilglicerolemia pós-prandial em homens e mulheres em duas faixas etárias: abaixo e acima de 40 anos, demonstrando que um aumento precoce na concentração plasmática dos triacilgliceróis era verificado apenas em homens acima de 40 anos.

Também é descrito na literatura que, monossacarídeos administrados cronicamente a humanos e animais de experimentação podem induzir modificações metabólicas importantes que muitas vezes podem simular a síndrome X, caracterizada por hipertriacilglicerolemia, hiperglicemia e hiperinsulinemia, dependendo da dose, tempo de administração e tipo de açúcar (REAVEN et al., 2000). CHICCO et al (2000) descreveram três fases no desenvolvimento da síndrome X em ratos alimentados com dieta rica em sacarose: período de indução de 3 a 5 semanas, caracterizado pela presença de várias alterações metabólicas como hipertriacilglicerolemia, hiperinsulinemia e aumento de ácidos graxos livres; período de adaptação de 5 a 8 semanas, quando ocorre a normalização transitória dos parâmetros e, período de recorrência de 8 a 15 semanas. A hipertriacilglicerolemia pode ocorrer por diminuição do “clearance” de lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (como QM, VLDL e seus remanescentes) e/ou por aumento da síntese e secreção hepática de ácidos graxos, com aumento do número de partículas que contém apoB (HUDGINS, 2000). Estes mesmos mecanismos foram descritos em ratos tratados agudamente, por 16 horas (HIRANO, 1989) ou por período inferior, 2 horas e trinta minutos (HIRANO, 1990), com dieta contendo monossacarídeos.

Estudos mostram que dietas ricas em carboidratos levam ao desenvolvimento de hipertriacilglicerolemia em ratos (HALLFRISCH et al, 1990, PARK et al, 1992, CHICCO et al, 2000, KELLEY et al, 2004) e em camundongos (SHAFIR et al, 1972, SHAFIR et al, 1975). Seu efeito sobre a colesterolemia é discreto podendo levar a uma diminuição do colesterol sérico, principalmente se o carboidrato for utilizado em substituição à gordura saturada ou, a um pequeno aumento, se os carboidratos promoverem um aumento significativo na síntese de VLDL (PARKS et al, 1999).

PARK et al (1997) demonstraram que uma dieta rica em frutose foi responsável por modificações mais evidentes na taxa fracional sintética de triacilgliceróis da VLDL do que a glicose quando ratos eram submetidos à suplementação dietética com estes carboidratos. BOIVIN e DESHAIES (1995) demonstraram que ratos tratados a longo prazo com dietas ricas em carboidratos ou em gordura apresentaram ganho de peso similar embora a hipertriacilglicerolemia tenha aparecido somente nos animais tratados com carboidratos. Já a resistência à insulina, sem hipertriacilglicerolemia, foi encontrada nos animais tratados com dieta rica em gordura.

BELL et al (2003) avaliaram o efeito em longo prazo de dietas ricas em frutose, em ratos no período neonatal até a fase adulta, para avaliar o efeito da manipulação dietética precoce no desenvolvimento da dislipidemia e na homeostase da glicemia no adulto. Os resultados mostraram que quanto mais cedo a dieta rica em carboidratos simples e/ou baixa em fibras fosse introduzida, uma maior predisposição à elevação nas concentrações plasmáticas de triacilgliceróis e um aumento na atividade da enzima ácido graxo sintase era observada nos adultos.

As respostas metabólicas (ganho de peso, concentração de triacilgliceróis plasmáticos e resistência ao estresse) ao tratamento com dieta rica em sacarose foram avaliadas em ratos induzidos à obesidade por lesão bilateral do núcleo ventromedial e em ratos *sham*-operados (KANAZAWA et al 2003). A dieta rica em sacarose melhorou a resistência ao estresse (aumento das *heat shock proteins*), não alterou o peso dos animais, porém foi responsável pelo desenvolvimento da hipertriacilglicerolemia nos 2 grupos estudados.

Estudos recentes mostram que dietas ricas em frutose levam não só ao aumento da triacilglicerolemia mas também são responsáveis por uma diminuição importante de substâncias antioxidantes (BUSSEROLLES et al, 2002; FAURE et al, 1997). A substituição da frutose por mel (rico em substâncias antioxidantes) na dieta de ratos Wistar, diminuiu a triglicilglicerolemia e aumentou a concentração sérica de vitamina E (BUSSEROLLES et al, 2002).

São poucos os trabalhos na literatura que avaliam a influência da dieta rica em carboidratos no perfil lipídico de camundongos. SHAFIR et al (1975) descreveram a presença de hipertriacilglicerolemia quando camundongos (“spiny mice”) eram submetidos a tratamento por longos períodos (3 meses) com sacarose. Recentemente OSTOS et al (2002) estudaram o efeito do consumo de frutose por 9 meses em camundongos transgênicos que superexpressam o conjunto de genes da apoAI-CIII-AIV humana e em camundongos não transgênicos C57BL/6. Nos animais transgênicos que já apresentam hipertriacilglicerolemia basal, a frutose potencializou o distúrbio lipídico e nos animais controles um discreto aumento foi encontrado nos níveis séricos de triacilglicerol.

BERTI et al (2003) mostraram que camundongos transgênicos para CETP (*background* C57BL/6) quando alimentados com dieta rica em glicose e sacarose durante 2 semanas, apresentaram redução significativa da triacilglicerolemia e modesta, porém significativa, elevação da glicemia.

Camundongos homozigotos deficientes para o receptor de LDL (*LDL receptor knockout mice*) alimentados com dieta rica em frutose desenvolveram mais aterosclerose do que quando alimentados com dieta rica em gordura. (MERAT et al, 1999)

A dieta, portanto é um dos fatores externos mais importantes que atua sobre os lipídios plasmáticos e que pode ser mais facilmente modificada. Como o consumo de frutose tem aumentado ao longo das duas últimas décadas devido a sua introdução em adoçantes, refrigerantes, sucos de frutas em lata, gelatinas e produtos lácteos ocorreu um maior interesse em estudar dietas ricas nesse nutriente.

Baseados na escassa literatura sobre o efeito da suplementação dietética com carboidratos no metabolismo lipídico de camundongos e no fato de ratos e camundongos serem amplamente utilizados como modelos experimentais para estudos de distúrbios metabólicos originados por manipulação dietética, o presente trabalho avaliou as alterações no perfil lipídico desses animais utilizando dois tipos de monossacarídeos: glicose e frutose.



2 - OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi comparar o efeito da suplementação dietética crônica com glicose e frutose sobre o perfil lipídico, a glicemia, a insulinemia e a resistência à insulina de ratos e camundongos. Também foram avaliadas a eficiência destes carboidratos em promover alterações nos parâmetros bioquímicos séricos, assim como a comparação das respostas metabólicas de animais que pertencem a mesma família (*Muridae*), porém a diferentes gêneros (*Ratus e Mus*).



3 - MATERIAIS E MÉTODOS

a) Desenho experimental

Fizeram parte do estudo 40 ratos Wistar e 30 camundongos C57BL/6, machos com idade aproximada de 5 semanas e peso médio de 240 ± 46 g para ratos e $21 \pm 2,5$ g para camundongos. Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP) e protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (Processo nº 473-1 IB/UNICAMP).

Os ratos Wistar foram distribuídos em 4 animais/gaiola, mantidos em sala com temperatura controlada (22°C), em ciclos de claro-escuro de 12 horas, recebendo dieta padrão (NUVITAL, PR, Brasil, proteína bruta - 22%, gordura - 5%, amido - 55%, matéria mineral - 10%, fibras - 9%), e água “ad libitum”. Após jejum de doze horas, uma coleta de sangue foi executada pela cauda para a determinação dos parâmetros bioquímicos séricos que compõem o perfil lipídico: colesterol, colesterol nas lipoproteínas de alta densidade (HDL-col), triacilglicerol e ácidos graxos livres. Também foram quantificadas a insulina e glicose de jejum.

Após a coleta basal, os animais receberam durante 21 dias, por gavagem, uma solução de glicose 50% (VETEC, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) ou frutose 50% (SYNTH, Diadema, SP, Brasil), constituindo-se assim, respectivamente, nos grupos GLIC e FRUT.

A concentração da solução infundida nos animais foi de 0,8 g de glicose ou frutose /100g peso animal/dia, dividida em duas doses diárias. O peso dos animais assim como os consumos de água e ração foram medidos semanalmente durante o período experimental.

Ao final de 21 dias, os ratos foram mantidos em jejum de 12 horas, anestesiados levemente sob éter e submetidos à coleta de sangue pela cauda, para a determinação dos mesmos parâmetros acima descritos (período pós tratamento).

Os camundongos foram mantidos em 6 animais/gaiola, em sala com temperatura controlada (22°C) e ciclos de 12 horas de claro-escuro, alimentados “ad libitum” com ração comercial (NUVITAL) e água, durante todo o experimento. Amostras

de sangue foram coletadas (após jejum de 12 horas), pela cauda (período basal, pré tratamento) para determinação dos mesmos parâmetros bioquímicos séricos efetuados nos ratos. Após esta coleta, os camundongos receberam, durante 21 dias, por gavagem, soluções de glicose 50% ou frutose 50%, (grupos GLIC e FRUT, respectivamente). No 22º dia, após jejum de 12 horas, nova coleta de sangue foi efetuada para quantificação de colesterol total, HDL-col, triacilglicerol, ácidos graxos livres, glicose e insulina. O sangue foi colhido, após anestesia intraperitoneal com uma mistura de (2:3) cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H1,3-tiazina (Rompun®, BAYER, São Paulo, SP, Brasil), 0,05 mg/kg, e cloridrato de cetamina (Ketamin® CRISTÁLIA, Itapira, SP, Brasil), 6 mg/kg, pelo plexo retrorbital.

Para a avaliação do perfil lipoprotéico e da composição lipídica das lipoproteínas plasmáticas, foram preparados “pools” de soros de ratos (3 animais) e camundongos (6 animais) que foram submetidos às mesmas condições experimentais descritas anteriormente.

b) Métodos

As análises bioquímicas dos parâmetros que compõem o perfil lipídico e a glicemia, tanto dos camundongos quanto dos ratos, foram executadas por métodos enzimáticos colorimétricos em sistema automatizado Roche-Hitachi 917 (Roche Diagnostic Systems Inc., USA). Os ácidos graxos livres foram quantificados por método enzimático colorimétrico (Wako, Neuss, Germany) com adaptação para microtécnica.

Para a dosagem de insulina, foi utilizado o Kit Ultra Sensitive Rat Insulin ELISA (Downers Grove, IL, USA). Também foi calculado o índice de resistência à insulina, através da determinação do HOMA (Homeostasis Model Assessment), utilizando a fórmula (LEE et al, 2002):

$$\text{HOMA} = \text{insulina (mU/L)} \times \text{glicemia (mMol/L)} / 22,5$$

O isolamento das lipoproteínas plasmáticas dos ratos e camundongos foi feito através de cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC, Fast Protein Liquid Chromatography, Pharmacia), utilizando coluna Superose 6 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppasala, Suécia) e tampão Tris pH 7,4. A identificação dos picos correspondentes às lipoproteínas VLDL, LDL e HDL foi feita pela leitura da absorbância do colesterol total (Anexos 1e 2). As concentrações do colesterol total e triacilglicerol nas lipoproteínas isoladas foi executada por métodos enzimáticos-colorimétricos (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), em sistema de automação (Cobas - Mira, Roche).

c) Análise estatística

Para analisar a evolução dos valores entre os tempos (pré e pós tratamento) e entre os grupos (glicose ou frutose) foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida de teste post-hoc de Tukey para comparação múltipla entre os grupos e teste de perfil por contrastes para comparação entre os tempos. Algumas variáveis foram transformadas em logaritmo devido à ausência de distribuição normal dos dados. Para correlacionar o consumo de ração, água e o peso dos animais e a variação percentual dos parâmetros bioquímicos ao longo do tempo foi usada a Área sob a Curva (AUC) que resume a evolução dos consumos e do peso nas 3 semanas de acompanhamento. Foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson, nas variáveis transformadas em logaritmo. Também foi avaliada a correlação desses parâmetros séricos bioquímicos com a AIUC (Area Under the Incremental Curve) que avalia a evolução dos consumos de ração e água e do peso, em relação ao período basal. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$).



4 - RESULTADOS

TITLE

Wistar rats and C57BL/6 mice present distinct lipemic responses to an oral carbohydrate supplementation.

Claudia Regina Barbosa*, Eliana Cotta de Faria*, Lucia Nassi Castilho*

*Clinical Pathology Department, Medical Sciences School, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

RUNNING TITLE

Oral carbohydrate supplementation in rats and mice

Corresponding author: Dr. Lucia Nassi Castilho, Clinical Pathology Department CP 6111, 13084-971, Campinas, SP, Brazil

Tel. 55 19 37889452 Fax. 55 19 37889434

Email: nassi@fcm.unicamp.br

Artigo submetido à revista: **BRITISH JOURNAL OF NUTRITION**

Check Status # BJN-2004-009791

ABSTRACT

Glucose-induced hypertriacylglycerolemia is produced in rat. Fructose has been show to be particularly potent in this regard. However, in mice, the effects of carbohydrate supplementation on the lipid profile are not well defined yet. In this study we investigated the effects of dietary supplementation with carbohydrates on the lipids, glucose and insulin serum concentrations in rats and mice.

Adult male Wistar rats and C57BL/6 mice were fed a commercial diet and dietary supplementation with 500 g/L glucose or fructose solutions (0,8 g /100 g body weight/day) by gavage, during 21 days. Blood samples were collected in the fasting state before and after the period of dietary supplementation for sera biochemical analyses. Triacylglycerol and cholesterol percent distribution in FPLC isolated lipoproteins were determined. Glycemia, as expected, was significantly higher in rats and mice after carbohydrate treatments. Triacylglycerolemia increased significantly in rats, in average 1.5 times, after glucose or fructose supplementations, but free fatty acids did not change. Similar increases were found in triacylglycerol -VLDL particles. Total cholesterol was not changed by glucose treatment and it was decreased after fructose supplementation (by 6.7%, $p < 0.05$). Glucose and fructose treated rats developed insulin resistance (insulin increased by 40%, in average). On the other hand, mice showed a significantly decrease (average 1.3 times, $p < 0.01$) in triacylglycerol, total cholesterol, HDL-cholesterol, free fatty acids and insulin levels after carbohydrate supplementation. Triacylglycerol content in VLDL particles was also lower in carbohydrate-fed mice. Concluding, rats and mice, in spite of belonging to the same *Muridae* family, presented opposite responses to monossacharide chronic treatments regarding to triacylglycerol, free fatty acids, HDL-cholesterol and insulin concentrations.

INTRODUCTION

In the 1950's carbohydrate induced hypertriacylglycerolemia was observed in human studies in which dietary manipulations were primarily aimed at reducing blood cholesterol (Watkin *et al.* 1950; Ahrens *et al.* 1961). To reduce serum cholesterol

concentrations, the percentage of energy from dietary fat was replaced by carbohydrate. This approach showed that high carbohydrate diets, particularly sucrose and fructose, increases triacylglycerol serum and decreases HDL-cholesterol serum contributing to increase the risk of cardiovascular diseases (Katan *et al.* 1997; Parks & Hellerstein, 2000; Parks, 2001; Fried & Rao, 2003).

Dietary glucose is metabolized via glucokinase and isomerized to fructose-6-phosphate, and its progression in the glycolysis pathway depends on the phosphofructokinase activity, a highly regulated enzyme. On the other hand, dietary fructose is mainly taken up by the liver, phosphorylated to fructose-1-phosphate, a substrate for triacylglycerol synthesis (Frayn & Kingman, 1995). Because fructose bypasses the majority of rate-limiting enzymes in glycolysis, it is rapidly taken up by the liver, converted into glycerol-3-phosphate, favoring esterification of free fatty acids to form triacylglycerol.

Before industrialization, when starch was largely consumed as a principal component of diets, fructose was a carbohydrate with a minor role on the diet. Nowadays, fructose intake has increased steadily during the past two decades due to its introduction as a sweetener in pharmaceuticals products and in food applications such as carbonated beverages, canned fruits, jams, jellies and dairy products.

Large doses of fructose or glucose consumptions by humans (Parks, 2001; Fried & Rao, 2003; Frayn & Kingman, 1995; Hallfusch, 1990) and laboratory animals (Hallfusch, 1990; Kelley *et al.* 2004; Chicco *et al.* 2000; Boivin & Deshaies, 1995) may affect carbohydrate and lipid metabolism. Rats that were fed with high sucrose and fructose diet showed metabolic changes observed in the X syndrome, a disorder characterized by insulin resistance, hypertension, dyslipidemia and high incidence of cardiovascular diseases (Boivin & Deshaies, 1995; Galipeau *et al.* 2002; Reaven, 1988; Oron – Herman *et al.* 2003; Busseroles *et al.* 2002; Bell *et al.* 2003). However, in mice, the effect of the carbohydrate diet over lipid and carbohydrate metabolism is not evident. Shafir *et al.* (1972) showed a significant increase in triacylglycerol levels in spiny mice (*Acomys cahirinus*) on a high carbohydrate supplementation for long-term periods. Also, Ostos *et al.* (2002) showed that long-term fructose consumption has a significant increase effect in hypertriacylglycerolemic- atherosclerosis- protected transgenic mice

overexpressing the apolipoprotein AI-CIII-AIV human gene cluster. On the other hand, BERTI et al (2003) showed that hyperinsulinemic CETP transgenic mice supplemented with glucose and sucrose presented a significantly decrease in triacylglycerol levels but a mild increase in glycemia.

Merat *et al* (1999) showed that LDL receptor-deficient mice (LDL^{-/-}) fed a fructose-enriched diet developed greater extent of atherosclerosis in the aortic tree than Western-fed LDL^{-/-} mice.

Based on the fact that rats and mice were greatly utilized as models for several metabolic disturbances by diet manipulations, the aim of this study was to compare the effect of two simple carbohydrate dietary supplementations (fructose and glucose) on the lipid profile of *Muridae* family: Wistar rat (*Rattus norvegicus*) and C57BL/6 mice (*Mus musculus*).

MATERIALS AND METHODS

a) Animals and experimental design

Forty Wistar rats and thirty C57BL/6 male mice obtained from the CEMIB/UNICAMP (Multidisciplinary Center of Biological Investigation/ State University of Campinas, SP, Brazil), 3-5 weeks old, weighing in average 240±32 g and 21±2.5 g respectively, were used in this study. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation (Biology Institute, State University of Campinas, Brazil).

The Wistar rats (4 animals/cage) were housed in a temperature controlled room (22°C) with twelve-hour light-dark cycles and received the standard diet (Nuvital, Paraná, Brazil) and water “ad libitum”. After twelve hours of fasting, blood tail collection was performed to measure the lipidic profile (cholesterol, HDL-cholesterol, triacylglycerol and free fatty acids), glucose and insulin levels (before treatment). After this blood sample collection, the animals received through oral gavage, a 500 g/L glucose or

fructose solution (GLUC or FRUC groups, respectively) during 21 days. The 500 g/L glucose or fructose solutions were administered in doses of 0.8 g/100 g body weight/day. Water and diet consumptions as well as animal weights were measured weekly. After 21 days, the rats were maintained in fasting for 12 hs and were slightly anesthetized under ether for blood tail collection to measure the same biochemical parameters (after treatment).

The C57BL/6 mice (6 animals/cage) were kept in the same conditions described above and submitted to the same protocol. However, at the end of the experiment, they were anesthetized intraperitoneally with Ronpum® (Bayer, São Paulo, SP, Brazil) and Ketamin® (Cristália, Itapira, SP, Brazil) and the blood collection was performed by the retroorbital plexus.

Rat and mice sera pools were made to evaluate the triacylglycerol and cholesterol distribution in FPLC isolated lipoproteins.

b) Methods

The quantification of cholesterol, HDL-chol, triacylglycerol and glucose levels were made by enzymatic colorimetric methods in automatized Roche-Hitachi 917 systems (Roche Diagnostic Systems Inc., USA). Free fatty acids were quantified by enzymatic colorimetric micromethod (Wako Chemicals, Richmond, VA) and insulin by Elisa (Ultra Sensitive Rat Insulin ELISA, Dowers Grove, IL, USA).

The lipoprotein isolation was performed by the FPLC method (Pharmacia, Sweden), using a Superose 6 column and the determination of cholesterol and triacylglycerol in the fractions were performed in automatic Cobas (Roche) system.

The insulin resistance was determined by Homa (Homeostasis Model Assessment) as follows: fasting insulin (mU/L) X fasting glucose (mmol/L)/22.5 (Lee *et al.* 2002).

c) Statistical analyses

Paired “t” test and post - hoc Tukey test were utilized to compare the effect of different monosaccharides administered to rats and mice, when statistical differences were demonstrated by ANOVA. Some variables were transformed into the logarithm form due to the absence of normal distribution. The Pearson coefficient was used to correlate the diet, water consumption and animal weight area under the curves (AUC) with the percent variation of biochemical parameters. Comparison between animal genres (*Rattus x Mus*) was made by Student t test (Montgomery, 1991). All statistical analyses were made by the SAS Software for Windows (Statistical Analyses System) version 8.01 SAS Institute Inc, 1999 – 2000, Cary, NC, USA. Statistical significances was defined as $P < 0.05$.

RESULTS

a) *Body weigh, food and water consumption in Wistar rat and C57BL/6 mice*

In rats, the area under curve (AUC) of body weigh, food and water consumption during glucose supplementation was significantly higher than during fructose supplementation (Figure 1A). Interestingly, glucose supplemented rats dranked approximately twice as much than fructose supplemented rats. The incremental area under curve (AIUC) of body weigh was similar between the two groups (41 ± 11 and 48 ± 19 g \times weeks for glucose and fructose treated rats) in spite of the AIUC (Figure 1B) of food intake in fructose group being significantly smaller when compared with the glucose group. In mice, the AUC and AIUC of body weigh and food intake was similar between the two carbohydrate treated groups. The AUC and AIUC of water consumption was significantly smaller in glucose supplemented mice than in fructose treated animals (Figure 1 C and D).

c) Statistical analyses

Paired “t” test and post - hoc Tukey test were utilized to compare the effect of different monosaccharides administered to rats and mice, when statistical differences were demonstrated by ANOVA. Some variables were transformed into the logarithm form due to the absence of normal distribution. The Pearson coefficient was used to correlate the diet, water consumption and animal weight area under the curves (AUC) with the percent variation of biochemical parameters. Comparison between animal genres (*Rattus x Mus*) was made by Student t test (Montgomery, 1991). All statistical analyses were made by the SAS Software for Windows (Statistical Analyses System) version 8.01 SAS Institute Inc, 1999 – 2000, Cary, NC, USA. Statistical significances was defined as $P < 0.05$.

RESULTS

a) Body weigh, food and water consumption in Wistar rat and C57BL/6 mice

In rats, the area under curve (AUC) of body weigh, food and water consumption during glucose supplementation was significantly higher than during fructose supplementation (Figure 1A). Interestingly, glucose supplemented rats drank approximately twice as much than fructose supplemented rats. The incremental area under curve (AIUC) of body weigh was similar between the two groups (41 ± 11 and 48 ± 19 g \times weeks for glucose and fructose treated rats) in spite of the AIUC (Figure 1B) of food intake in fructose group being significantly smaller when compared with the glucose group. In mice, the AUC and AIUC of body weigh and food intake was similar between the two carbohydrate treated groups. The AUC and AIUC of water consumption was significantly smaller in glucose supplemented mice than in fructose treated animals (Figure 1 C and D).

b) Wistar rat biochemical parameters before and after carbohydrate supplementation

Comparison of carbohydrate supplementation in fasting (12 hours) lipid profile, insulin and glucose levels before and after 3 weeks of treatment with glucose or fructose in Wistar rats is presented in Table 1.

Rat glycemia and cholesterolemia were not modified by glucose supplementation but the glucose levels were significantly higher when the carbohydrate administered was fructose. The increase in insulin levels was verified after glucose (26%) or fructose (54%) treated rats in spite of lacking of statistical differences due probably to the small sample number ($n= 5$ and 7 , respectively in glucose and fructose treated rats). Also the $HOMA_{IR}$ (Homeostasis Model Assessment insulin resistance index) was increased approximately 1.2 fold after the two carbohydrate treatments (9.5 ± 3.4 vs 12.7 ± 5.3 ; and 7.8 ± 2.2 vs 8.9 ± 1.4 , before and after glucose and fructose supplementation, respectively), but no statistical differences were found.

The triacylglycerolemia was significantly increased by 1.5 times after carbohydrate (glucose or fructose) supplementations and these phenomenon was also demonstrated in VLDL-triacylglycerol content (Figure 2, panels A and B, respectively for glucose and fructose treatment). On the other hand, the free fatty acid levels did not change after the carbohydrate treatments (Table 1).

Total serum cholesterol was not modified by glucose supplementation due probably to the equivalent distribution of cholesterol between the particles (HDL-*chol* increased 13% and non HDL-*chol* decreased 15%). The serum cholesterol level in rats after fructose supplementation was decreased in 7% ($p<0.05$). Percentage of cholesterol in LDL particles also decreased (Figure 2, panels C and D, respectively for glucose and fructose supplementation), which was also showed by the significantly decrease in cholesterol in non HDL particles in glucose treated rats (Table 1).

When we compare the effect of both monosaccharides (glucose or fructose) in promote serum biochemical variations, (expressed as percent difference after treatment), it was demonstrated that fructose supplementation promotes higher alterations in fasting glycemia (16.7% x 4.7% , $p=0.004$, respectively for fructose or glucose treated rats), and

smaller variation in triacylglycerolemia (41% x 62%, $p=0.08$) and cholesterolemia (-6.7% x 0%, $p=0.01$, respectively fructose and glucose treatments) when compared with glucose supplementation.

c) *C57BL/6 mice biochemical parameters before and after carbohydrate supplementation*

Comparison of carbohydrate supplementation effects on fasting (12 hours) sera lipid profile, insulin and glucose levels before and after 3 weeks of treatment with glucose or fructose in C57BL/6 mice is presented in Table 2.

Mice presented a significantly increase in fasting glycemia, in average 45%, after carbohydrate supplementations. The glucose treatment was responsible for a significantly decrease in insulin levels but the $HOMA_{IR}$ was not modified by the carbohydrate intake (1.83 ± 0.51 ; 1.85 ± 0.46 and 1.19 ± 0.31 ; 1.35 ± 0.21 before and after glucose and fructose treatments, respectively).

The lipid profile was altered by carbohydrate supplementations and a significantly decrease in cholesterol, triacylglycerol, HDL-cholesterol, non HDL-cholesterol and free fatty acid levels were observed (Table 2). A significant decrease in triacylglycerolemia (24%) was also demonstrated by diminution in triacylglycerol present in VLDL particles (Figure 3, panels A and B). The decrease in cholesterol in non HDL particles was caused by a decrease in VLDL and LDL cholesterol content (Figure 3, panels C and D).

The comparison between the effect of the two monosaccharides (difference before and after treatments) in percentage variations of serum biochemical parameters demonstrated that fructose supplementation significantly lower the free fatty acid levels when compare with glucose administration ($p<0.01$).

A significant positive correlation was found between the variation of glycemia and AUC of body weigh in rats treated with carbohydrates ($r=0.36$, $P=0.014$). The variation in sera HDL-cholesterol ($r=-0.42$, $P=0.0033$) and Tg ($r=-0.49$, $P=0.0006$) was negatively correlated with body weight AUC in glucose treated rats.

In glucose treated mice a significant negative correlation was found between the glycemia ($r=-0.39$, $P=0.03$), HDL-cholesterol ($r=-0.40$, $P=0.02$) and diet consumption AUC.

d) Comparison between the genres (Rattus x Mus) on carbohydrate supplementation

Wistar Rats and C57BL/6 mice presented different metabolic responses when submitted to a short period of dietary supplementation with monosaccharides. They responded with inverse variation in triacylglycerolemia, HDL-chol and insulinemia after monosaccharides treatments. Mice presented greater variations (decrease) in cholesterol, nHDL-chol levels ($p=0.04$; $p=0.03$, respectively) and glycemia (51% x 13.5%, $p=0.0$) when compared with monossacharides supplemented rats.

DISCUSSION

Genetic and environmental factors are generally considered to be responsible for metabolic disturbances such as diabetes mellitus and dyslipidemia. Among environmental factors, the refined carbohydrates, largely utilized in industrialized countries are one of the most important causes of these disturbances.

Several authors have demonstrated that high glucose or fructose diets are responsible for the development of insulin resistance, increased triacylglycerol and insulin sera levels (Watkin, 1950; Ahrens, 1961; Blakely, 1981; Zavaroni, 1980 and 1982; Parks and Hellerstein, 2000; Reaven, 1991; Mittendorfer and Sidossis, 2001; Fried and Rao, 2003, Kelley et al, 2004; Huang et al, 2004).

Our results have shown that carbohydrate supplementations were responsible for the increase in fasting glycemia in rats (Table 1) and mice (Table 2) although this increase was not significant in glucose supplemented rats. In rats, the increase in insulin levels after carbohydrate treatments was 26 and 54%, respectively for glucose and fructose-treated rats, according to Huang et al (2004) and Kelly et al (2004). The glucose or fructose-treated rats probably developed insulin resistance, which was demonstrated by higher insulin and triacylglycerol levels, although the HOMA indices were not statistically different after the carbohydrate administration, due to a reduced number of samples used for insulin determination.

Surprisingly, the carbohydrate supplemented mice (Table 2) showed a significant reduction in fasting insulin levels. Similar results were obtained by Ostos et al (2002) that found a decrease in insulin levels after fructose supplementation in control C57BL/6 mice.

High-carbohydrate diets are recommended, in humans, for lowering the risk of coronary heart diseases because it decreases the LDL-cholesterol concentration (Dreon et al, 1994; Jacob et al, 1998; Marckmann et al, 1994). In the present work we found a significant decrease in total cholesterol in animals of Rodent Order, after carbohydrate supplementation. Although glucose treated rats do not show a significant decrease in total cholesterol (only a different distribution of cholesterol in lipoproteins), in fructose-treated rats and mice and glucose-treated mice, low total cholesterol was found, probably due to a decreased hepatic synthesis.

The increase in triacylglycerolemia found in glucose supplemented rats was more effective than that produced by fructose (62% x 41%, for rats treated with glucose and fructose, respectively), although the absorbed fructose from the diet is preferably taking up by the liver and bypasses a major rate-determining steps in glycolysis (Frayn & Kingman, 1995). The increase in the content of triacylglycerol on VLDL particles (Figure 2) and the decrease in the sera concentrations of free fatty acids on glucose treated rats suggest a hepatic secretion of VLDL richer in triacylglycerol and not an increase in the rate of the secretion, once the total concentration of cholesterol did not increase or even decrease. Furthermore, the decrease in serum concentration of free fatty acids observed on rats after the treatment with carbohydrates may suggest an increase in the *de novo* hepatic synthesis of triacylglycerol and not a reesterification of fatty acids.

On the other hand, in mice a significant decrease of approximately 1.2 times in the triacylglycerol was observed after supplementation with monosaccharides, due to the percent decrease in triacylglycerol present in VLDL (Figure 3). Our results differ from the study of Shafir et al (1972) that used spiny mice treated with a rich sucrose diet for a long time (seven months) and found a significant increase in triacylglycerol when compared to controls treated with commercial diet. However, Ostos and collaborators (2002) found no differences when they submitted C57BL/6 control mice to a diet supplementation with

fructose during nine months. On the other hand, hypertriacylglycerolemic C57BL/6 transgenic mice overexpressing the apolipoprotein AI-CIII-AIV human gene cluster presented a higher increase on triacylglycerol levels, when submitted to fructose supplementation.

Rats and mice belonging the same family (*Muridae*) are normally used as experimental models for diverse metabolic studies. However, they present different response intensities in some particular biochemical parameters when submitted to a chronic carbohydrate diet supplementation: mice present an increase in glycemia significantly more evident than that of rats (variation of 51% x 13% before and after treatment with carbohydrates); a decrease significantly greater in total cholesterol (-7% x -2%) and in the cholesterol present in non HDL lipoproteins. The responses of triacylglycerol, free fatty acids, insulin and HDL-cholesterol levels were opposite: in mice, the variations of these parameters are negative whereas in rats the variations are positive.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We are grateful to Helymar C. Machado for statistical analyses, to Edilma Maria de Albuquerque, Alessandro G. Salerno and Lila M. Harada for helpful technical support.

REFERENCES

- Ahrens EJ, Hirsch J, Oehe K, Farguhar JW, Stein Y (1961) Carbohydrate-induced and fat induced lipemia. **Trans Assoc Physicians**, 74:34-46.
- Bell RC, Hoedl A, Turchinsky J (2003) Fructose feeding in the suckling-weaning transition in rats: effects on hyperlipidemia in adulthood. **Arch Physiol Bioch**, 111: 17-22.
- Berti JA, Casquero AC, Patricio PR, Bighetti EJ, Carneiro EM, Boschero AC, Oliveira HC (2003) Cholesteryl ester transfer protein expression is down-regulated in hyperinsulinemic transgenic mice. **J Lipid Res**, 44 (10):1870-1876.
- Blakely SR, Hallfrisch J, Reiser S, Prather ES (1981) Long-term effects of moderate fructose feeding on glucose tolerance parameters in rats. **J Nutr**, 111(2): 307-14.
- Boivin A, Deshaies Y (1995) Dietary rat models in which the development of hypertriglyceridemia and that of insulin resistance are dissociated. **Metabolism**, 44(12): 1540-46.
- Busseroles J, Mazur A, Gueux E, Rock E, Rayssiguier Y (2002) Substituting honey for refined carbohydrates protects rats from hypertriglyceridemic and prooxidative effects of fructose. **J Nutr**, 132: 3379-82.
- Chicco A, Basabe JC, Karabatas L, Ferraris N, Fortino A, Lombardo YB (2000) Troglitazone (CS-045) normalizes hypertriglyceridemia and restores the altered patterns of glucose-stimulated insulin secretion in dyslipidemic rats. **Metabolism**, 49:1346-51.
- Dreon DM, Fernstrom HA, Miller B, Krauss RM (1994) Low-density lipoprotein subclass patterns and lipoprotein response to a reduced-fat diet in men. **FASEB J**, 8: 121 - 126.
- Frayn KN, Kingman SM (1995) Dietary sugars and lipid metabolism in humans. **Am J Clin Nutr**, 62(Suppl): 250S-261S.
- Fried SK, Rao SP (2003) Sugars, hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. **Am J Clin Nutr**, 78(Suppl): 873S-880S.
- Galipeau D, Verena S, Mcneill JH (2002) Female rats are protected against fructose-induced changes in metabolism and blood pressure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 283: H2478-H2484.

- Hallfusch J (1990) Metabolic effects of dietary fructose. *Faseb J*, 4: 2652-2660.
- Huang BW, Chiang MT, Yao HT, Chiang (2004) The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. *Diabetes Obes Metab*, 6(2): 120-6.
- Jacobs DR, Meyer KA Jr, Kushi LH, Folsom AR (1998) Whole-grain intake may reduce the risk of ischemic heart disease death in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. *Am J Clinical Nutrition*, 68: 248 - 257.
- Katan MB, Grundy SM, Willet WC (1997) Beyond low-fat diets. *N Engl J Med*, 337: 563-566.
- Kelley GL, Allan G, Azhar S (2004) High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation. *Endocrinology*, 145: 548-555.
- Lee HJ, Choi SS, Park MK, Na YJ, Seo SY, Kim MC, Hong SH, Hwang TH, Kang DY, Garber AJ, Kim DK (2002) Fenofibrate lowers abdominal and skeletal adiposity and improves insulin sensitivity in OLETF rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 296: 293-299.
- Marckmann P, Sandstrom B, Jespersen J (1994) Low-fat, high-fiber diet favorably affects several independent risk markers of ischemic heart disease: observations on blood lipids, coagulation, and fibrinolysis from a trial of middle-aged Danes. *Am J Clinical Nutrition*, 59: 935 - 939.
- Merat S, Casanada F, Sutphin M, Palinski W, Reaven PD (1999) Western-type diets induce insulin resistance and hyperinsulinemia in LDL receptor-deficient mice but do not increase aortic atherosclerosis compared with normoinsulinemic mice in which similar plasma cholesterol levels are achieved by a fructose-rich diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19 (5):1223-1230.
- Mittendorfer B, Sidossis LS (2001) Mechanism for the increase in plasma triacylglycerol concentrations after consumption of short-term, high-carbohydrate diets. *Am J Clin Nutr*, 73 (5):892-9.

Montgomery, DC. (1991) Design and Analysis of Experiments. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons

Oron-Herman M, Rosenthal T, Sela BA (2003) Hyperhomocysteinemia as a component of syndrome X. **Metabolism**, 52: 1491-1495.

Ostos MA, Recalde D, Baroukh N, Callejo A, Rouis M, Castro G et al. (2002) Fructose intake increases hyperlipidemia and modifies apolipoprotein expression in apolipoprotein AI-CIII-AIV transgenic mice. **J Nutr**, 132:918-923.

Parks EJ, Hellerstein M (2000) Carbohydrate-induced hypertriacylglycerolemia: historical perspective and review of biological mechanism. **Am J Clin Nutr**, 71: 412-33.

Parks EJ (2001) Effect of dietary carbohydrate on triglyceride metabolism in humans. **J Nutr**, 131: 2772S-2774S.

Reaven GM (1988) Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, 37: 1595-1607.

Reaven GM (1991) Insulin resistance, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia and hypertension parallels between human disease and rodent models. **Diabetes Care**, 14:195-202.

Shafir E, Teitelbaum A, Cohen AM (1972) Hyperlipidemia and impaired glucose tolerance in *Acomys Cahirinus* maintained on synthetic carbohydrate diets. **Isr J Med Sci**, 8:990-992

Shafir E, Benchimol A, Orevi M (1975) Hyperlipidemia and hepatic hyperlipogenesis on spniy mice (*Acomys Cahirinus*) on carbohydrate diets: Relationship to peripheral under responsiveness and low insulin release. **Isr J Med Sci**, 11:738-752.

Zavaroni I, Sander S, Scott S, Reaven GM (1980) Effect of fructose feeding on insulin secretion and insulin action in the rats. **Metabolism**, 10: 970-973.

Zavaroni I, Chen YD, Reaven GM (1982) Studies of the mechanism of fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. **Metabolism**, 31(11): 1077-83.

Watkin DM, Froeb HF, Hatch FT, Gutman AB (1950) Effects of diet in essential hypertension II. Results with unmodified Kempner rice diet in fifty hospitalized patients. **Am J Med**, 9: 441-43.

Table 1 - Wistar rats fasting biochemical parameters before and after supplementation during 21 days with glucose or fructose.

BIOCHEMICAL PARAMETERS*								
Carbohydrate ^a supplemented	Glu (mmol/L)	Ins ^b (mU/L)	Chol (mmol/L)	Tg (mmol/L)	HDLchol (mmol/L)	nHDLchol (mmol/L)	FFA (mEq/L)	
GLUC	before	8.89±0.21	26.96±12.88	1.56±0.03	0.94±0.06	0.79±0.06	0.77±0.06	0.65±0.06
(n=46)	after	9.30±0.25	34.14±12.37	1.56±0.03	1.53±0.08*	0.90±0.04*	0.66±0.05**	0.53±0.05
FRUC	before	7.92±0.23	23.99±6.66	1.52±0.03	1.45±0.10	1.15±0.02	0.37±0.02	0.45±0.03
(n=38)	after	9.26±0.15**	37.10±15.93	1.42±0.04**	2.06±0.12*	1.04±0.03*	0.38±0.03	0.45±0.01

^aGLUC-rats treated with glucose; FRUC- rats treated with fructose; ^bn=5 and n=7 respectively for glucose and fructose treated rats; # Glu- glucose; Ins-Insulin; Chol- cholesterol; Tg- triacylglycerol; HDLchol- cholesterol in high density lipoproteins; nHDLchol- cholesterol in non HDL particles; FFA- free fatty acids; *P<0.01 and **P<0.05 before versus after treatment. Data expressed as mean±standard error.

Table 2 - C57BL/6 mice fasting biochemical parameters before and after supplementation during 21 days with glucose or fructose.

BIOCHEMICAL PARAMETERS ^a							
Carbohydrate ^a supplemented	Glu (mmol/L)	Ins ^b (mU/L)	Chol (mmol/L)	Tg (mmol/L)	HDLchol (mmol/L)	nHDLchol (mmol/L)	FFA (mEq/L)
GLUC							
before	6.47±0.24	6.68±2.24	2.74±0.08	1.78±0.11	2.00±0.03	0.74±0.08	2.43±0.34
after (n=30)	10.03±0.53*	4.45±0.90**	2.52±0.03*	1.40±0.05**	1.95±0.04	0.56±0.04*	1.77±0.14
FRUC							
before	6.64±0.25	5.44±1.04	2.70±0.05	1.87±0.12	2.07±0.03	0.62±0.04	2.23±0.22
after (n=30)	8.97±0.47*	3.46±0.60	2.48±0.03*	1.38±0.05*	1.95±0.04*	0.53±0.03*	1.91±0.22*

^aGLUC-mice treated with glucose; FRUC-mice treated with fructose; ^bn=11 for glucose and fructose treated mice #Glu-glucose; Ins-Insulin; Chol-cholesterol; Tg- triacylglycerol; HDLchol- cholesterol in high density lipoproteins; nHDLchol- cholesterol in non HDL particles; FFA- free fatty acids; * p<0.01 and **p<0.05 before versus after treatment. Data expressed as mean±standard error.

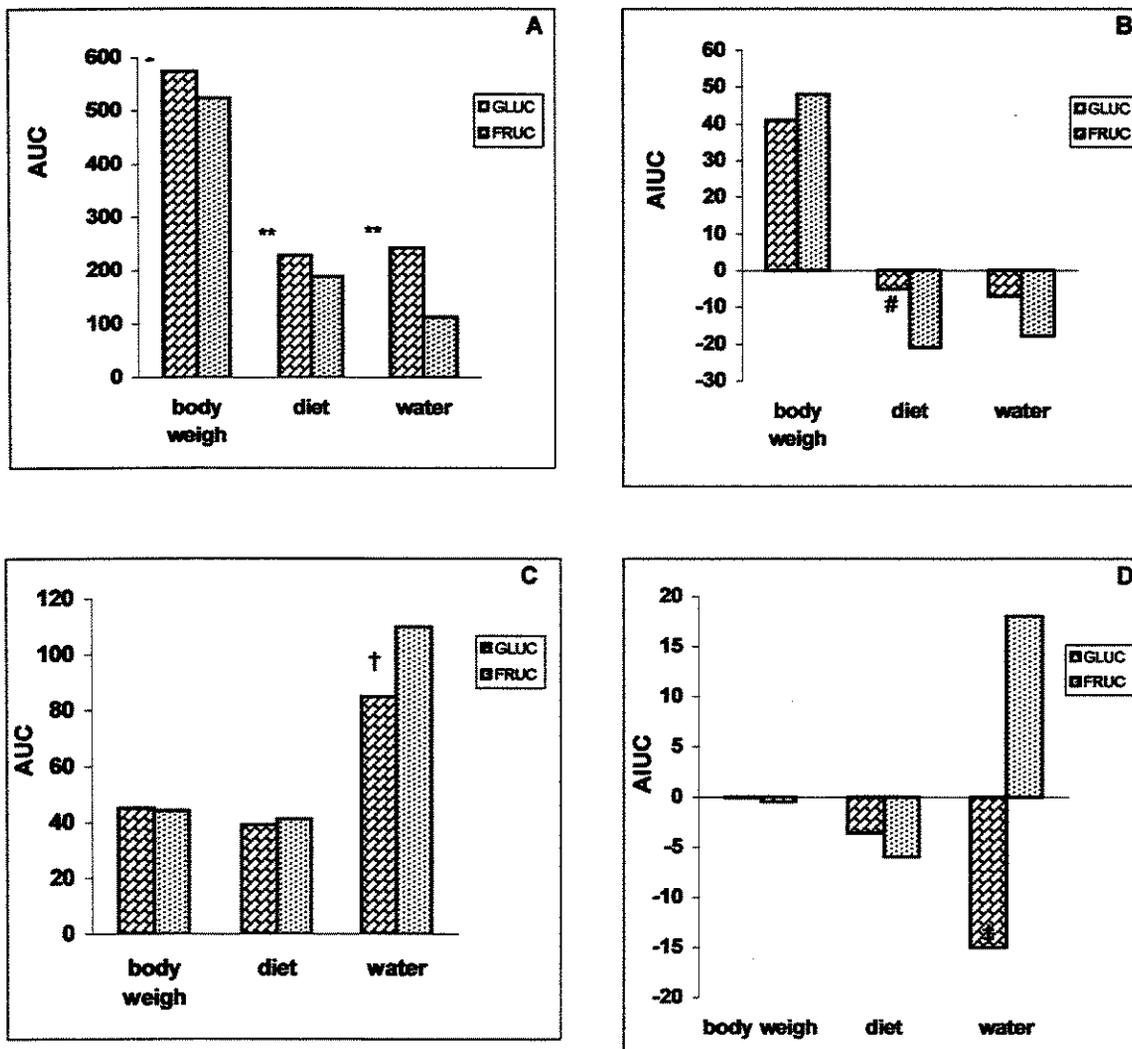


Figure 1 - Area under the curve (AUC) and area incremental under the curve (AIUC) of body weigh, diet and water consumptions of Wistar rats (A, B) and mice (C, D) treated during 21 days with glucose or fructose. *P=0.0027; **P<0.001; #P=0.0041; †P=0.0016; ‡P=0.0003.

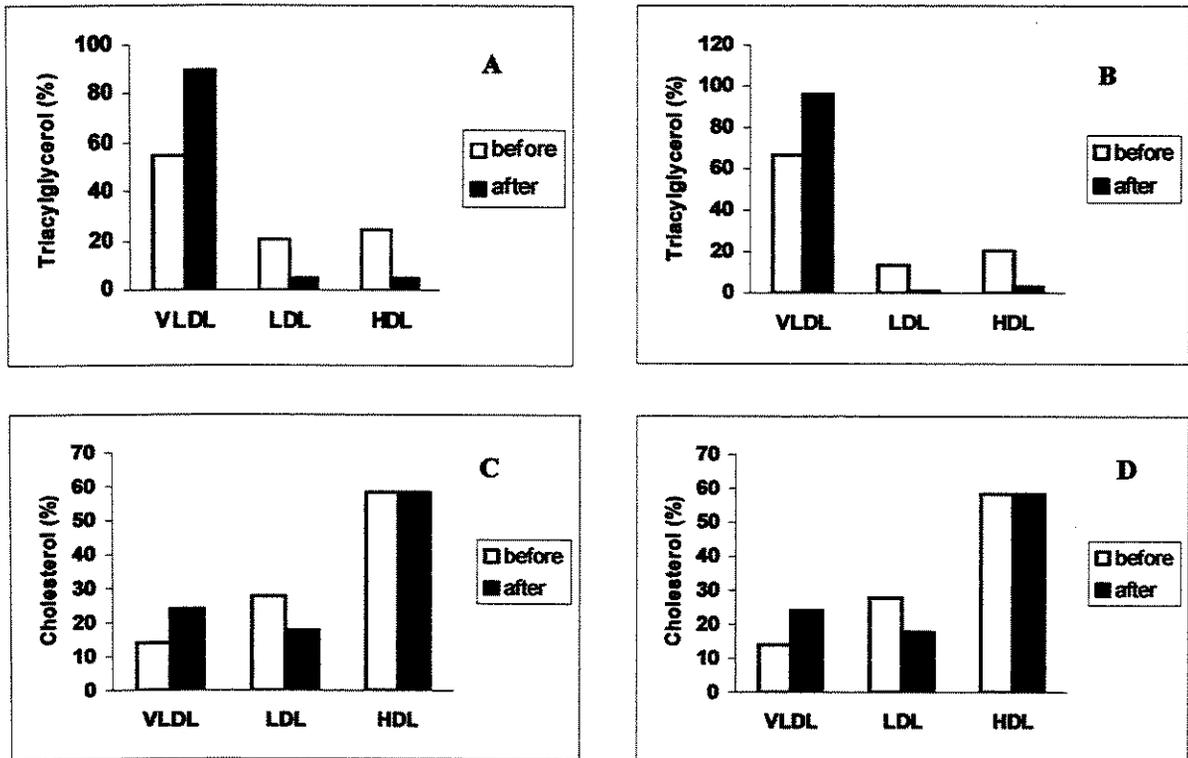


Figure 2 - Lipid percentual composition of Wistar rats serum lipoproteins isolated by FPLC before and after dietary supplementation (21 days) with glucose (panel A, C) or fructose (panel B, D).

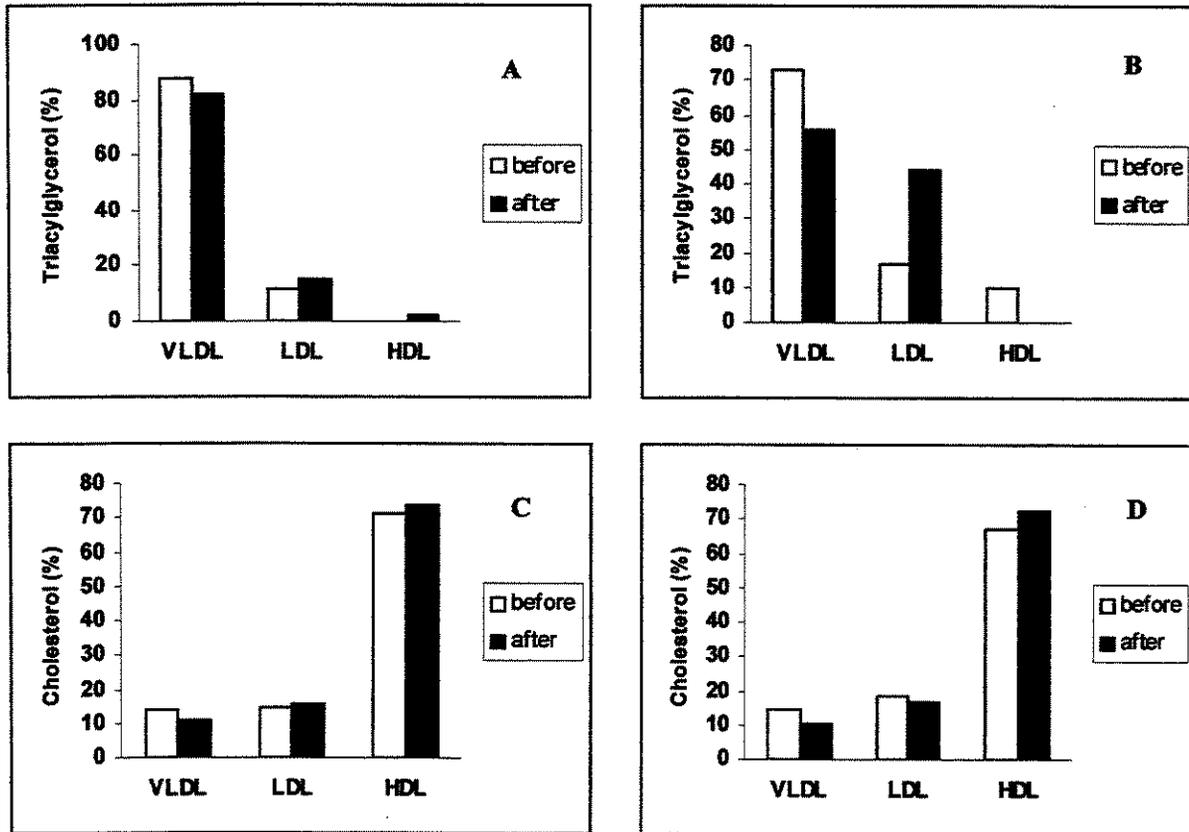


Figure 3 - Lipid percentual composition of C57BL/6 mice serum lipoproteins isolated by FPLC before and after (21 days) dietary supplementation with glucose (panel A, C) or fructose (panel B, D).



5 - DISCUSSÃO GERAL

Alterações genéticas e ambientais são consideradas importantes fatores responsáveis por distúrbios metabólicos como, por exemplo, no diabetes e na dislipidemia. Entre os fatores ambientais, as dietas ricas em carboidratos refinados, amplamente utilizadas nos países industrializados, são uma das mais importantes causas desses distúrbios.

Vários autores demonstraram que dietas ricas em glicose ou frutose são responsáveis pelo desenvolvimento da resistência à insulina, aumentos séricos de triacilglicerol e da insulina (WATKIN, 1950; AHRENS, 1961; BLAKELY, 1981; ZAVARONI, 1980 e 1982; PARKS e HELLERSTEIN, 2000; REAVEN, 1991; MITTENDORFER e SIDOSSIS, 2001; FRIED e RAO, 2003; KELLEY et al, 2004; HUANG et al, 2004).

Nossos resultados mostraram que a suplementação com carboidratos foi responsável por aumento da glicemia de jejum em ratos (Tabela 1) e camundongos (Tabela 2), apesar deste aumento não ter sido significativo nos ratos suplementados com glicose. Nos ratos, o aumento das concentrações séricas de insulina após a suplementação com glicose (26%) e frutose (54%) estão de acordo com os resultados encontrados por Huang et al (2004) e Kelly et al (2004). Os animais tratados com glicose e frutose desenvolveram resistência à insulina demonstrada pelo aumento sérico de insulina e triacilglicerol. Por outro lado, o índice que avalia a resistência à insulina (HOMA) não foi estatisticamente diferente entre os períodos pré e pós tratamento devido, provavelmente, ao reduzido número de amostras em que a insulina foi quantificada.

Surpreendentemente, em relação aos camundongos, uma redução significativa da insulina sérica foi verificada após a suplementação com glicose. Resultados semelhantes foram obtidos por Ostos e col (2002) ao utilizarem camundongos controles C57BL/6 submetidos a suplementação dietética com frutose durante nove meses.

A recomendação da utilização de dieta rica em carboidratos para humanos com o objetivo de diminuir o risco de desenvolvimento de doença coronariana está baseada no seu efeito sobre a redução dos níveis de colesterol nas lipoproteínas de baixa densidade (DREON et al, 1994; JACOB et al, 1998; MARCKMANN et al, 1994). No presente trabalho foi encontrada uma redução significativa na colesterolemia dos roedores após a

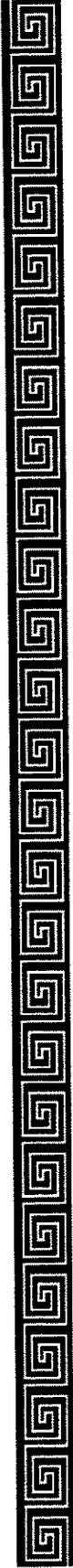
suplementação com carboidratos. Apesar de ratos tratados com glicose não apresentarem alteração na concentração sérica de colesterol total (somente uma redistribuição diferente do colesterol nas lipoproteínas), ratos e camundongos tratados com frutose e camundongos tratados com glicose apresentaram diminuição significativa de colesterolemia, provavelmente devido a uma diminuição de síntese hepática.

Ratos suplementados com glicose apresentaram um aumento mais efetivo da triacilglicerolemia (Anexo 2) quando comparado a ratos tratados com frutose (62% x 41%, respectivamente para tratamento com glicose e frutose) apesar da frutose dietética ser preferencialmente captada pelo fígado e ser independente das enzimas limitantes da glicólise (FRAYN & KINGMAN, 1995). O aumento percentual de triacilglicerol nas VLDL e a diminuição da concentração sérica de ácidos graxos livres nos ratos tratados com glicose sugerem uma secreção hepática de VLDL rica em triacilglicerol e não um aumento na taxa de secreção de VLDL, uma vez que a concentração de colesterol total não aumentou ou até mesmo diminuiu.

Nos camundongos, por outro lado, uma diminuição significativa da triacilglicerolemia de aproximadamente 1,2 vezes foi observada após a suplementação com monossacarídeos devido à diminuição percentual do triacilglicerol presente nas VLDL (Figura 3). Nossos resultados são diferentes dos encontrados na literatura: SHAFIR et al (1972) ao utilizarem spiny mice tratados com dieta rica em sacarose por período longo (sete meses) encontraram aumento significativo na concentração sérica de triacilglicerol quando comparados a controles tratados com dieta comercial. Por outro lado, OSTOS e colaboradores (2002) não encontraram diferença estatisticamente significativa ao submeterem camundongos C57BL/6 controles à suplementação dietética com frutose por nove meses. No entanto, ao utilizarem o mesmo tipo de tratamento em camundongos C57BL/6 transgênicos superexpressando o conjunto de genes humanos AI-CIII-AIV (que já apresentam hipertriacilglicerolemia basal), detectaram um aumento ainda maior da triacilglicerolemia.

Ratos e camundongos pertencem a mesma família (*Muridae*) e são normalmente utilizados como modelos experimentais em diversos estudos metabólicos porém, apresentam diferentes intensidades de resposta em alguns parâmetros bioquímicos,

quando submetidos à suplementação dietética com carboidratos: camundongos apresentam aumento da glicemia significativamente mais evidente do que ratos (55% x 13% da variação entre pré e pós tratamento com carboidratos); diminuição significativamente maior do colesterol total (-7% x -2%) e do colesterol presente nas lipoproteínas que contém apoB (“*non HDL*”). Já em relação a triacilglicerolemia, ácidos graxos livres e insulina séricas e colesterol de HDL, as respostas são opostas em relação ao tratamento com carboidratos: nos camundongos as variações destes parâmetros são negativas (ou seja, ocorre diminuição) enquanto que nos ratos estas variações são positivas (Anexo 3).



6 - CONCLUSÕES GERAIS

O efeito da suplementação dietética com monossacarídeos (glicose e frutose) sobre o perfil lipídico, a glicemia, a insulinemia e a resistência à insulina de ratos Wistar e camundongos C57BL/6 adultos, machos submetidos a suplementação dietética por um curto período de tempo mostrou que:

em ratos,

- a área sob a curva do ganho de peso, do consumo de ração e de água foi significativamente maior quando o carboidrato utilizado era a glicose, sendo o consumo de água neste grupo o dobro do que o consumo do grupo tratado com frutose
- a glicemia e a colesterolemia não foram alteradas pela suplementação com glicose, porém a concentração de glicose sérica foi significativamente maior quando o carboidrato administrado era a frutose
- ocorreu aumento nas concentrações séricas de insulina no grupo tratado com glicose (26%) e frutose (54%).
- a triacilglicerolemia foi aumentada em 1,5 vezes após a suplementação com carboidratos (glicose e frutose).
- não ocorreram alterações significativas nas concentrações de ácidos graxos livres após a suplementação com a glicose e frutose
- o tratamento com frutose foi responsável por modificações mais evidentes que o tratamento com glicose, em relação aos seguintes parâmetros séricos: glicose (aumento de 16% x 4,7% para ratos tratados com frutose e glicose, respectivamente, $p < 0,01$) e colesterol (diminuição de 6,7% x 0%, respectivamente para grupo tratado com frutose e glicose)

em camundongos,

- o consumo de ração e peso corpóreo não foram modificados pelo tratamento com carboidratos (glicose e frutose) porém o consumo de água no grupo suplementado com frutose foi significativamente maior que no grupo tratado com glicose

- ocorreu um aumento na glicemia de jejum em média de 45% após a suplementação dietética com os carboidratos
- o perfil lipídico foi alterado pela suplementação com os monossacarídeos ocorrendo uma diminuição significativa do colesterol, do triacilglicerol, do HDL-col, do nHDL-col e dos ácidos graxos livres. Vale ressaltar que o grupo tratado com frutose apresentou níveis mais baixos de ácidos graxos que o grupo tratado com glicose

ratos e camundongos,

- apresentam comportamentos diferentes frente à suplementação dietética com carboidratos: ratos desenvolvem resistência à insulina, hipertriacilglicerolemia e hiperinsulinemia, enquanto camundongos apesar de apresentarem hiperglicemia não desenvolvem, neste período de tratamento, resistência à insulina.



7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHRENS, E. H.; HIRSCH, J; OETTE, K. Carbohydrate-induced and fat-induced lipemia. **Trans Ass Amer Physicians**, 74:134-146, 1961.
- AMERICAN SOCIETY FOR NUTRITION SCIENCES. <http://www.nutrition.org>. Acesso em: 16 /07/2004.
- APPLELABAUM – BOWDEN, D. Lipases and lecithin: Cholesterol acyltransferase in the control of lipoprotein metabolism. **Curr Opin Lipidol**, 6:130-135, 1995.
- BANTLE, J. P.; RAATZ, S. K.; THOMAS, W.; GEORGOPOULOS, A. Effects of dietary fructose on plasma lipids in healthy subjects. **Am J Clin Nutr**, 72:1128-1134, 2000.
- BELL, R. C.; HOEDL, A; TURCHINSKY, J. Fructose feeding in the suckling-weaning transition in rats: effects on hyperlipidemia in adulthood. **Arch Physiol Bioch**, 111: 17-22, 2003.
- BERTI, J. A.; CASQUERO, A. C.; PATRICIO, P. R.; BIGHETTI, E. J.; B CARNEIRO, A. C.; BOSCHERO, A. C.; OLIVEIRA, H. F. C. Cholesteryl ester transfer protein expression is down-regulated in hyperinsulinemic transgenic mice. **J Lipid Res**, 44 (10):1870-1876, 2003.
- BOOM, J. Função do trato gastrintestinal (GI) na digestão e absorção dos alimentos. In: BAYNES, J; DOMINICZAK, MH. **Bioquímica Médica**, Manole, 2000. p.100-103.
- BOIVIN, A.; DESHAIES, Y. Dietary rat models in which the development of hypertriglyceridemia and that of insulin resistance are dissociated. **Metabolism**, 44(12):1540-1546, 1995.
- BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, 232: 34-47, 1986.
- BUSSEROLES, J.; MAZUR, A.; GUEUX, E.; ROCK, E.; RAYSSIGUIER, Y. Substituting honey for refined carbohydrates protects rats from hypertriglyceridemic and prooxidative effects of fructose. **J Nutr**, 132:3379-3382, 2002.
- CARAWAY, W.T.; WATTS, N.B. - Carbohydrates In: Tietz, N.W. **Textbook of Clinical Chemistry**, 2ª edição, Canadá: W. B. Saunders Company, 1986, p 775-780.

CARLSON, L. A.; BOTTINGER, L. E. Ischaemic heart disease in relation to the fasting values of plasma triglycerides and cholesterol. *Lancet*, 1: 865-868, 1972.

CHICCO, A.; BASABE, J.C.; KARABATAS, L.; FERRARIS, N.; FORTINO A; LOMBARDO Y.B. Troglitazone (CS-045) normalizes hypertriglyceridemia and restores the altered patterns of glucose-stimulated insulin secretion in dyslipidemic rats. *Metabolism*, 49:1346-1351, 2000.

DREON, D. M.; FERNSTROM, H. A.; MILLER, B.; KRAUSS, R. M. Low-density lipoprotein subclass patterns and lipoprotein response to a reduced-fat diet in men. *Faseb J*, 8:121-126, 1994.

Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*, 285:2486-2497, 2001.

FAURE, P.; ROSSINI, E.; LAFOND, J. L.; RICHARD, M. J.; FAVIER, A.; HALIMI, S. Vitamine E improves the free radical defense system potencial and insulin sensivity of rats fed high fructose diets. *J Nutr*, 127: 103-107, 1997.

FRAYN, K. N.; KINGMAN, S. M. Dietary sugars and lipid metabolism in humans. *Am J Clin Nutr*, 62 (Suppl):250S-261S, 1995.

FREDRICKSON, D. S.; LEVY, R. I.; LEES R. S. Fat transport in lipoproteins integrated approach to mechanisms and disorders. *New Engl J Med*, 276:32-44, 1967.

FRIED, S.K.; RAO, S.P. Sugars, hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*, 8: 873S-880S, 2003.

GARCIA, R.C.; OLIVEIRA, H.C.F. Fisiologia das Lipoproteinas. In: QUINTÃO, E. *Colesterol e Aterosclerose*, 1ª edição, Rio de Janeiro: Qualitymark, 1992, p3-8.

HATCH, F.T.; ABELL, L.L.; KENDALL, F.E. Effects of restriction of dietary fat and cholesterol upon serum lipids and lipoproteins in patients with hipertension. *Am J Med*, 19(1): 48-60, 1955.

HIRANO, T.; MAMO, J.C.; FURUKAWA, S.; NAGANO, S.; TAKAHASHI, T. Effect of acute hyperglycemia on plasma triglyceride concentration and triglyceride secretion rate in non-fasted rats. **Diabetes Res Clin Pract**, 9 (3):231-238, 1990.

HIRANO, T.; MAMO, J.C.; POAPST, M.E.; KUKSIS, A. & STEINER, G. Impaired very low-density lipoprotein-triglyceride catabolism in acute and chronic fructose-fed rats. **Am J Physiol**, 256:559-565, 1989.

HUANG, B. W.; CHIANG, M. T.; YAO, H. T. The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. **Diabetes Obes Metab**, 6 (2):120-126, 2004.

HUDGINS, L.C. Effect of high-carbohydrate feeding on triglyceride and saturated fatty acid synthesis. **Proc Soc Exp Biol Med**, 225:178-183, 2000.

JACOBS, D. R.; MEYER, K. A Jr.; KUSHI, L. H.; FOLSOM, A. R. Whole-grain intake may reduce the risk of ischemic heart disease death in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. **Am J Clinical Nutrition**, 68:248-257, 1998.

KANAZAWA, M.; XUE, C. Y.; KAGEYAMA, H.; SUZUKI, E.; ITO, R.; NAMBA, Y. et al. Effects of a high-sucrose diet on body weight, plasma triglycerides, and stress tolerance. **Nutrition Reviews**, 61:S27-S33, 2003.

KATAN, M. B.; DESLYPERE, J. P.; VAN BIRGELEN, A. P.; PENDERS, M; ZEGWAARD, M. Kinetic of the incorporation of dietary fatty acid into serum cholesteryl esters, erythrocyte membranes, and adipose tissue: an 18-month controlled study. **J Lipid Res**, 38: 2012-2022, 1997.

KELLEY, GL; ALLAN, G; AZHAR, S. High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation. **Endocrinology**, 145:548-555, 2004.

KRIGER, M; HERZ, J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). **Ann Rev Biochem**, 63: 601-637, 1994.

LEE, H.J.; CHOI, S.S.; PARK, M.K.; NA, Y.J.; SEO, S.Y.; KIM, M.C.; HONG, S.H.; HWANG, T.H.; KANG, D.Y.; GARBER, A.J.; KIM, D.K. Fenofibrate lowers abdominal and skeletal adiposity and improves insulin sensitivity in OLETF rats. **Biochem Biophys Res Comm**, 296: 293-299, 2002.

LEHNINGER, A.L. Açúcares, polissacarídeos de reserva e paredes. In: MAGALHÃES, J.R. **Bioquímica**, 2ª edição, São Paulo: Blucher, 1976, p399.

MAHLEY, R.W. & HUSSAIN, M.M. Chylomicron and chylomicron remnant catabolism. **Curr Opin Lipidol**, 2:170-176, 1991.

MAHLEY, R.W.; INNERARITY, T.L.; RALL, S.C. Jr; WEISGRABER, K.H. Plasma lipoproteins: apolipoproteins structure and function. **J Lipid Res**, 25:1277-1294, 1984.

MARCKMANN, P; SANDSTROM, B; JESPERSEN, J. Low-fat, high-fiber diet favorably affects several independent risk markers of ischemic heart disease: observations on blood lipids, coagulation, and fibrinolysis from a trial of middle-aged Danes. **Am J Clinical Nutrition**, 59:935-939, 1994.

MERAT, S.; CASANADA, F.; SUTPHIN, M.; PALINSKI, W.; REAVEN, P. D. Western-type diets induce insulin resistance and hyperinsulinemia in LDL receptor-deficient mice but do not increase aortic atherosclerosis compared with normoinsulinemic mice in which similar plasma cholesterol levels are achieved by a fructose-rich diet. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 19 (5):1223-1230, 1999.

MITTENDORFER, B; SIDOSSIS, L. S. Mechanism for the increase in plasma triacylglycerol concentrations after consumption of short-term, high-carbohydrate diets. **Am J Clinical Nutrition**, 73(5):892-895, 2001.

MONTGOMERY, R.; CONWAY, T.W. Uma abordagem dirigida por casos In: SPECTOR, A.A. **Bioquímica**, 5ª edição, Rio de Janeiro, Artes Médicas, 1994, p 295.

OLIVEIRA, J. E. D.; MARCHINI, J. S. Carboidratos, **Ciências Nutricionais**, 4ª edição, São Paulo: Sarvie, 1998. p 71-85.

- OSTOS, M. .A.; RECALDE, D.; BAROUKH, N.; CALLEJO, A.; ROUIS, M.; CASTRO, G. et al. Fructose intake increases hyperlipidemia and modifies apolipoprotein expression in apolipoprotein AI-CIII-AIV transgenic mice. **J Nutr**, 132:918-923, 2002.
- PARKS, E. J.; KRAUSS, M; CHRISTIANSEN, M. P.; NEESE, R. A.; HELLERSTEIN, M. K. Effects of a low-fat, high-carbohydrate diet on VLDL-triglyceride assembly, production, and clearance. **J Clin Invest**, 104:1087-1096, 1999.
- PARK, J.; LEMIEUX, S.; LEWIS, G. F.; KUKSIS, A.; STEINER, G. Chronic exogenous insulin and chronic carbohydrate supplementation increase de novo VLDL triglyceride fatty acid production in rats. **J Lipid Res**, 38:2529-2536, 1997.
- PARK, O. J.; CESAR, D.; FAIX, D.; WU, K.; SHACKLETON, C. H.; HELLERSTEIN, M. K. Mechanisms of fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. Activation of hepatic pyruvate dehydrogenase through inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase. **Biochem J**, 282:753-757, 1992.
- PARKS, E. J.; HELLERSTEIN, M. K. Carbohydrate-induced hypertriacylglycerolemia: historical perspective and review of biological mechanisms. **Am J Clin Nutr**, 71: 412-433, 2000.
- PARKS, E. J. Effect of dietary carbohydrate on triglyceride metabolism in humans. **J Nutr**, 131: 2772S-2774S, 2001.
- REAVEN, G. M. Insulin resistance, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia and hypertension parallels between human disease and rodent models. **Diabetes Care**, 14:195-202, 1991.
- REAVEN, G. M.; ABBASI, F.; MCLAUGHLIN, T; LAMENDOLA, C.; KIM, H. S; TANAKA, A.; WANG, T. et al. High carbohydrate diets, triglyceride-rich lipoproteins, and coronary heart disease risk. **Am J Cardiol**, 85:45-48, 2000.
- RIGOTTI, A.; TRIGATTI, B. L.; PENMAN, M; RAYBURN, H; HERZ, J; KRIEGER, M. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in the HDL metabolism. **Proc Natl Acad Sci**, 94: 12610-12615, 1997.

SHAFIR, E.; TEITELBAUM, A.; COHEN, A. M. Hyperlipidemia and impaired glucose tolerance in *Acomys Cahirinus* maintained on synthetic carbohydrate diets. *Isr J Med Sci*, 8:990- 992, 1972.

SHAFIR, E.; BENCHIMOL, A.; OREVI, M. Hyperlipidemia and hepatic hyperlipogenesis on spiny mice (*Acomys Cahirinus*) on carbohydrate diets:relationship to peripheral under responsiveness and low insulin release. *Isr J Med Sci*, 11:738-752, 1975.

STONE, N. J. Secondary causes of hyperlipidemia. *Med Clin North Am*, 78: 117-141, 1994.

STRYER, L. Glicólise. In: STRYER, L. *Bioquímica*, 3ª edição, Guanabara Koogan, 1992. p 291 - 292.

TALL, A.R. Plasma lipid transfer protein. *Ann Rev Biochem*, 64: 235-257, 1995.

TALL, A.R. An overview of reverse cholesterol transport. *Eur Heart J*, 19 (Suppl A): A31-A35, 1998.

THREATTE, G.A.; HENRY, J.B. Carbohydrates In: HENRY, J.B. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 19ª edição, Estados Unidos da América: Saunders, 1996. p.194.

WATKIN, D.M.; FROEB, H.G.; HATCH, F.T.; GUTMAM, A.B. Effects of diet in essential hypertension II. Results with unmodified Kempner rice diet in 50 hospitalized patients. *Am J Med*, 9(4): 441-493, 1950.

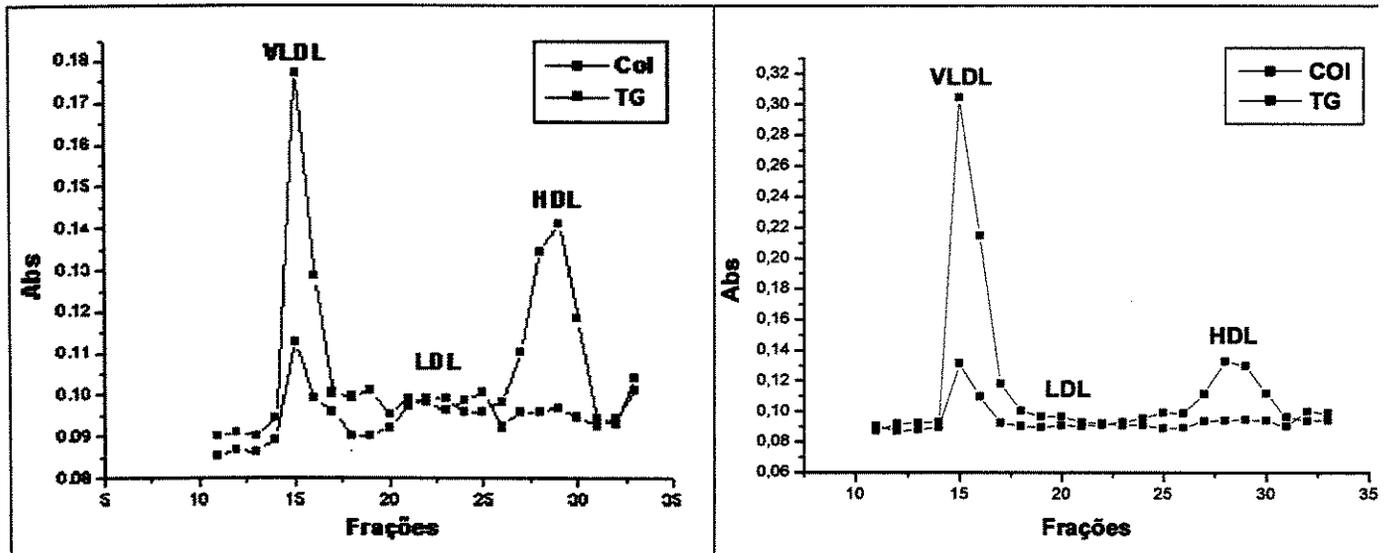
ZAVARONI, I.; SANDER, S.; SCOTT, S.; REAVEN, G. M. Effect of fructose feeding on insulin secretion and insulin action in the rats. *Metabolism*, 10:970-973, 1980.

ZAVARONI, I.; CHEN, Y. D, REAVEN, G. M. Studies of the mechanism of fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. *Metabolism*, 31 (11):1077-1083, 1982.

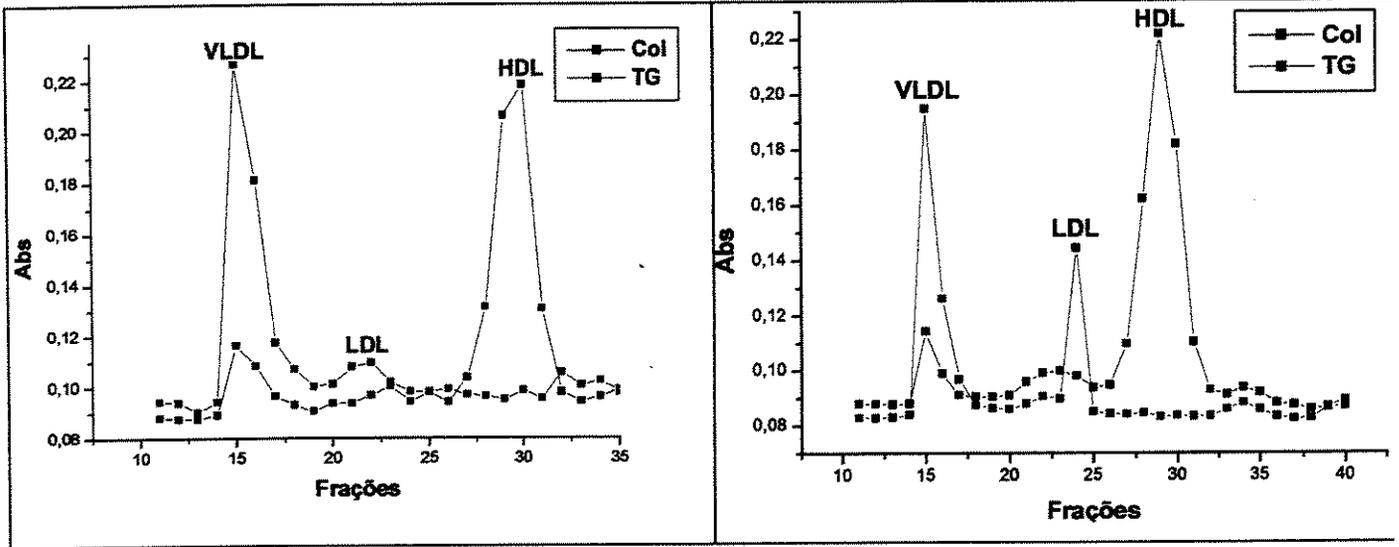


8 - ANEXOS

Distribuição de colesterol e triacilglicerol nas lipoproteínas séricas em "pool" de ratos antes e após tratamento dietético com frutose, obtida por FPLC.



Distribuição de colesterol e triacilglicerol nas lipoproteínas séricas em “pool” de camundongos antes e após tratamento dietético com frutose, obtida por FPLC.



Diferenças percentuais da suplementação dietética com glicose e frutose 50% para parâmetros bioquímicos em ratos e camundongos.

		Glicose	Insulina	Colesterol	Tg	HDL col	nHDL col	AGL
Ratos Wistar	Glic	+5 (ns)	+26 (ns)	0 (ns)	+62	+14	-14	-18 (ns)
	Frut	+17*	+54 (ns)	-6,5**	+42	-10*	+2,7***	0* (ns)
Camundongos C57BL/6	Glic	+55	-33	-8	-21	-2,5 (ns)	24	-27 (ns)
	Frut	+35	-36 (ns)	-8,1	-26	-6	14,5	-14*

Glic= tratamento com glicose; Frut= tratamento com frutose; ns= não significante em relação ao pré tratamento

* $p=0,004$; ** $p=0,01$; *** $p<0,01$