

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
CURSO DE FARMÁCIA

ANDREZA ABBATTI MONTEIRO

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO EM SORO DE RATOS
JOVENS SUBMETIDOS A CONCENTRAÇÕES ELEVADAS DE FRUTOSE

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2011

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO EM SORO DE RATOS JOVENS
SUBMETIDOS A CONCENTRAÇÕES ELEVADAS DE FRUTOSE

Andreza Abbatti Monteiro¹, Patrícia Fernanda. Schuck¹, Gustavo da Costa Ferreira^{1*}

¹Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Universidade do Extremo Sul
Catarinense (UNESC), Criciúma, Brasil

*Autor correspondente: Gustavo da Costa Ferreira.

Endereço: UNESC- Universidade do Extremo Sul Catarinense, Av. Universitária, 1105- Bairro
Universitário, Criciúma - CEP: 88806-000

Bloco S- Sala 6

E-mail: ferreirag@unesc.net

RESUMO

A intolerância hereditária à frutose (IHF) é uma doença causada pela deficiência da enzima aldolase B e caracterizada bioquimicamente pelo acúmulo de frutose e frutose-1-fosfato nos tecidos e fluidos biológicos dos pacientes afetados. Os achados clínicos incluem vômitos, hepatomegalia, icterícia, hipoglicemia, hemorragia, síndrome tubular renal proximal e insuficiência hepática, que podem levar à morte e cuja fisiopatologia não está esclarecida. O objetivo do presente estudo é caracterizar um perfil bioquímico em soro 12 e 24 h após a administração de frutose em ratos jovens. Observamos que os níveis de glicose, albumina, proteínas totais, triglicerídeos e colesterol não foram alterados pela administração de frutose nos tempos de 12 ou 24 horas após a administração deste metabólito. Nossos resultados indicam que a administração de frutose em ratos não foi capaz de alterar os parâmetros bioquímicos avaliados na dose e tempos utilizados neste estudo.

Palavras-chave: Frutose. Parâmetros bioquímicos. Erros inato do metabolismo.

1. INTRODUÇÃO

A frutose ($C_6H_{12}O_6$) é um carboidrato simples (monossacarídeo) e importante fonte de energia na dieta. Sua obtenção se dá através da dieta alimentar, principalmente em frutas, mel e legumes. Também podemos obtê-la através da quebra do dissacarídeo sacarose no intestino delgado pela ação da enzima sacarase, originando dois monossacarídeos, glicose e frutose, sendo absorvida principalmente pelo transportador de glicose 5 (GLUT 5) independente de insulina (Smith et al., 2005). Após a absorção na mucosa do intestino delgado, a frutose é utilizada principalmente no fígado, rins e intestino delgado. O metabolismo da frutose se baseia na presença de três enzimas: frutoquinase, aldolase tipo B e tiokinase (Hers, 1952)

A intolerância hereditária à frutose (IHF) é um erro inato do metabolismo de herança autossômica recessiva, causada pela deficiência da enzima aldolase B (Steinmann et al., 2001). Em 1956, o primeiro caso de IHF foi descrito por Chambers e Pratt, inicialmente denominada de idiosincrasia à frutose, em uma jovem de 24 anos de idade. O principal sintoma relatado foi vômitos intensos após ingestão de frutas (Chambers e Pratt, 1956). Apenas em 1961 o defeito enzimático foi identificado (Hers e Joassin, 1961).

Crianças e adultos afetados por HIF são perfeitamente saudáveis e assintomáticos, contanto que não consumam fontes de frutose. Portanto, durante a amamentação, os lactentes não apresentam nenhuma descompensação metabólica. Os sintomas aparecem após o desmame, quando se acrescentam frutas e vegetais à alimentação. Quanto maior for o consumo de frutose, maiores os danos causados (Odièvre et al., 1978). Caso o consumo de fontes de frutose persista, episódios hipoglicêmicos e insuficiência renal e hepática ocorrem, podendo levar o paciente à morte (Mayatepek et al., 2010).

Os principais achados laboratoriais sugerem intoxicação por frutose, incluindo hipoglicemia, acidemia/acidúria láctica e hiperuricemia, além de altos níveis de frutose e frutose-1-fosfato nos tecidos e fluidos biológicos (Steinmann et al., 2001).

O diagnóstico de IHF é feito principalmente pela quantificação de frutose e frutose-1-fosfato no soro e na urina de pacientes afetados por esta doença, (Steinmann et al., 2001). A principal forma de tratamento da IHF se baseia na restrição total de fontes de frutose, incluindo sacarose e sorbitol (Marcason, 2010).

Apesar de a doença ser conhecida há mais de 50 anos, muitas questões permanecem desconhecidas quanto à toxicidade da frutose e seus metabólitos. Poucos estudos foram realizados com o intuito de demonstrar efeitos tóxicos da frutose e da frutose-1-fosfato. Um dos efeitos principais parece ser a diminuição da disponibilidade de fosfatos pelo acúmulo de frutose-1-fosfato, inibindo a ação da enzima glicogênio fosforilase hepática e, conseqüentemente, a glicogenólise (Oberhaensli et al., 1987). Tal fato levaria ao sintoma mais proeminente da IHF, a hipoglicemia (Mayatepek et al., 2010). Além disso, a inibição retroativa da frutoquinase pela frutose-1-fosfato resulta em diminuição da captação de frutose pelo fígado, levando ao aumento de frutose no plasma dos pacientes (Mayatepek et al., 2010).

Outro fato interessante é a ocorrência de uma diminuição da dissociação da glicoquinase, importante enzima do metabolismo hepático da glicose, de sua proteína regulatória pela frutose-1-fosfato, levando a uma menor disponibilidade desta enzima (Van Schaftingen, 1989; Veiga-Da-Cunha e Van Schaftingen, 2002). Considerando que, até o presente momento, o efeito da frutose sobre diferentes parâmetros bioquímicos ainda não está descrito, e que estes parâmetros podem indicar alterações em diferentes sistemas e órgãos centrais e periféricos. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da frutose sobre diversos parâmetros bioquímicos no soro de animais que receberam administração aguda de frutose, na tentativa de procurar tratamentos mais adequados para melhorar a qualidade de vida dos pacientes afetados por IHF.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados 24 ratos Wistar machos de 30 dias de vida fornecidos pelo Biotério da Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram mantidos em ciclos de claro-escuro de ± 12 horas a uma temperatura de 24 ± 1 °C. Os animais tiveram livre acesso à água e ao alimento. Foram excluídos do estudo todos os animais que morreram. A utilização dos animais seguiu Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (Principles of Laboratory Animal Care, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 85-23, revisada em 1996).

2.2 Cálculos do tamanho da amostra

Com base em estudos prévios em modelos animais *in vivo* e *in vitro*, para uma diferença de até 20% nos parâmetros a serem analisados entre os grupos, com uma variância de no máximo 10% entre as médias calculou-se um tamanho de amostra de 6 animais por grupo, para um erro alfa de 0,05 e um poder de 80%. Também se considerou o número de animais geralmente utilizados na literatura para determinação de perfil bioquímico.

2.3 Experimentos in vivo

Para os experimentos bioquímicos, foram utilizados 24 animais (12 animais para o grupo controle e 12 animais para o grupo frutosemia). Os animais receberam uma injeção única de frutose (5 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal). Metade dos animais (6 do grupo controle e 6 do grupo frutosemia) foram mortos 12 hora após a administração de frutose. O restante dos animais (6 do grupo controle e 6 do grupo frutosemia) foram mortos 24 horas após a administração do carboidrato. Os níveis séricos de frutose

foram determinados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e foram realizadas as determinações de parâmetros bioquímicos em soro dos animais.

2.4 Preparo da Amostra

Os animais sofreram eutanásia por decapitação com guilhotina e sem anestesia, o sangue foi coletado e destinado à obtenção de soro através de centrifugação (4000 rpm por 10 minutos). O soro foi armazenado em freezer a -70°C até o momento das determinações bioquímicas.

2.5 Determinação de Parâmetros Bioquímicos

Os níveis de glicose, albumina, proteínas totais, triglicerídeos, e colesterol foram avaliados por kits comerciais produzidos pelas empresas Labtest[®] e Analisa[®].

2.6 Análise estatística

A análise estatística utilizada foi selecionada de acordo com o desenho experimental utilizado e com o tipo de distribuição apresentado pelo conjunto dos dados. Na comparação entre duas médias, foi utilizado o teste *t* de *Student* para amostras independentes. As análises estatísticas foram feitas pelo programa SPSS versão 17.0. Foram consideradas diferenças significativas quando o valor de $P \leq 0,05$.

2.7 Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram incluídos no estudo animais saudáveis, do sexo masculino, com 30 dias de vida e que não haviam sido utilizados em estudos anteriores. Foram excluídos do estudo todos os animais que morreram durante o tratamento, antecedendo o tempo determinado para a eutanásia dos animais.

2.8 Medidas para minimizar o sofrimento dos animais

Os animais foram mantidos em local fresco e arejados, com água e alimentação padrão à disposição. Os animais foram mantidos longe do local da eutanásia, para que não sentissem cheiro de sangue, assim não “pressentindo” sua morte.

A utilização dos animais seguiu os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (*Principles of Laboratory Animal Care*, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 85-23, revisada em 1996) e os Princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea).

2.9 Biossegurança

O manuseio de reagentes e os cuidados para a proteção do pesquisador seguiram as normas de biossegurança estabelecidas pela Fundação Oswaldo Cruz (<http://www.fiocruz.br/biosseguranca/bis/bismanua.htm>).

2.10 Destino dos animais pós-experimentação

O descarte dos resíduos biológicos se deu pelo acondicionamento em saco branco que foi encaminhado e armazenado em freezer nas dependências da universidade. Posteriormente, foram coletados e transportados por uma empresa terceirizada. Os resíduos foram tratados fisicamente e encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Todos os procedimentos estão de acordo com a RDC 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

3. RESULTADOS

Inicialmente, observamos que os níveis de glicose não foram alterados nos animais que recebem a administração de frutose, nos tempos de 12 horas e 24 horas, quando comparados aos animais que receberam solução salina (grupo controle) (Figuras 1 e 2).

Em seguida, avaliamos a quantidade de albumina no soro dos animais, e observamos que os níveis de albumina no soro após 12 horas e 24 horas não foram significativamente diferentes quando comparados com os valores do grupo controle (Figuras 3 e 4).

Nosso próximo passo foi avaliar o conteúdo de proteínas totais no soro dos animais após 12 horas e 24 horas da administração de frutose. Não foi observada diferença significativa neste parâmetro bioquímico, quando comparados com o grupo que recebeu solução salina (Figura 5 e 6).

As figuras 7 e 8 mostram que os níveis séricos de triglicerídeos nos animais após 12 horas e 24 horas da administração de frutose, não foram significativamente diferentes dos níveis observados nos animais do grupo controle.

Por último, observamos que os níveis séricos de colesterol medidos 12 horas e 24 horas após a administração de frutose aos animais não apresentaram diferença significativa, quando comparados aos níveis séricos de colesterol medidos em animais que receberam solução salina (grupo controle) (Figuras 9 e 10).

4. DISCUSSÃO

Existem vários erros inatos do metabolismo da frutose, sendo a intolerância hereditária à frutose (IHF), o mais grave e prevalente deles. A IHF (Omim # 229600) é uma doença de herança autossômica recessiva, causada pela deficiência da enzima aldolase B (Steinmann et al., 2001).

Crianças e adultos afetados por HIF são perfeitamente saudáveis e assintomáticos, contanto que não consumam fontes de frutose na dieta. Portanto, durante a amamentação, os lactentes não apresentam nenhuma descompensação metabólica. Os sintomas aparecem após o desmame, quando se acrescentam frutas e vegetais à alimentação. Quanto maior for o consumo de frutose, maiores os danos causados (Odièvre et al., 1978).

Os principais sintomas apresentados por pacientes afetados pela IHF incluem recusa alimentar, vômitos e irresponsividade (falta de resposta aos estímulos) (Steinmann et al, 2001). Por se tratarem de sintomas altamente inespecíficos, o diagnóstico se torna difícil. Caso o consumo de fontes de frutose persista, episódios hipoglicêmicos e insuficiência renal e hepática ocorrem, podendo levar o paciente à morte (Mayatepek et al., 2010). Apesar de a doença ser conhecida há mais de 50 anos, muitas questões permanecem desconhecidas. Neste sentido, a toxicidade da frutose e de seus metabólitos ainda não está completamente esclarecida. Até o momento poucos estudos foram realizados com o intuito de demonstrar efeitos tóxicos da frutose (Oberhaensli et al., 1987). Dessa forma, no presente trabalho avaliamos os efeitos provocados pela administração aguda de frutose sobre diferentes marcadores bioquímicos no soro de ratos.

Inicialmente avaliamos os níveis séricos de glicose nos ratos que receberam frutose agudamente em diferentes tempos após a administração deste carboidrato (12 e 24 horas). Não foi observada diferença nos níveis de glicose nos animais que

receberam a administração de frutose, quando comparados aos animais que receberam solução salina (grupo controle).

Após, analisamos a quantidade de albumina e proteínas totais, no soro após 12 horas e 24 horas da administração de frutose. Concentrações elevadas de albumina estão presentes somente em desidratação aguda. Por outro lado, concentrações reduzidas de albumina podem ser vista em inúmeras patologias como inflamação, doença hepática, perda urinária entre outras (Tietz, et al.,2008). Observamos que os níveis de albumina e proteínas totais não apresentaram diferença significativa comparados com o grupo controle.

Finalmente avaliamos os níveis de triglicerídeos e colesterol no soro após 12 horas e 24 horas da injeção de frutose em ratos jovens. Os lipídios têm importantes funções em praticamente todos os aspectos da vida, servindo como hormônio e fontes de energia, ajudando na digestão e atuando como componentes estruturais nas membranas celulares. Além disso, os lipídios estão intimamente envolvidos no desenvolvimento de aterosclerose, um processo patogênico que é a causa subjacente de distúrbio cardiovascular comuns de infarto do miocárdio, doença cerebrovascular e doença vascular periférica (Tietz, et al.,2008). Os parâmetros bioquímicos avaliados não apresentaram aumento significativo, quando comparados com o grupo controle. Nossos resultados diferiram de um trabalho anterior que demonstrou que o uso excessivo de frutose não é isento de efeitos adversos, representados pelo aumento de triglicerídeos e de colesterol no sangue (Barreiros et al., 2005). Acreditamos que a discrepância entre os resultados apresentados possam ser justificadas pela diferença entre o tempo de administração de frutose, uma vez que diferentemente do presente trabalho, Barreiros e colaboradores (2005) utilizaram um modelo de administração crônica de frutose.

Tomados em seu conjunto, nossos resultados indicam que a administração aguda de frutose não foi capaz de alterar diversos importantes parâmetros bioquímicos em soro de ratos. No entanto, a toxicidade da frutose sobre estes

parâmetros não está descartada, especialmente no caso de os níveis de frutose se manter elevados por um longo período durante o desenvolvimento dos animais, similarmente ao que ocorre nos pacientes afetados pela IHF. Dessa forma, mais estudos devem ser realizados para clarificar esta questão e auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas visando a prevenção e até mesmo a reversão dos sintomas clínicos apresentados pelos pacientes afetados pela IHF.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve apoio financeiro de projetos aprovados PIBIC/UNESC e Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barreiros, R.C., Bossolan, G.C., Trindade, E.P., 2005. Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. *Rev. Nutr.*, 18:377-389.
- Chambers, P., Idiosyncrasy to fructose. *Lancet* 2, 1956. 340p.
- Hers, H., La fructokinase du foie. *Biochim Biophys Acta*. 1952 Apr;**8**(4):416–423.
- Hers, H., Joassin, G., Anomalie de l'aldolase hépatique dans l'intolérance au fructose, *Enzymol. biol. Clin.* 1, 1961, p. 4.
- Marcason W., Is medical nutrition therapy (MNT) the same for hereditary vs dietary fructose intolerance? *J Am Diet Assoc*. 2010 Jul;**110**(7):1128.
- Mayatepek E, H.M., 2010. Inborn errors of carbohydrate metabolism. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. Oct;**24** (5):607-18.
- Oberhaensli, R., Rajagopalan, B., Taylor, Dj et al., Studies of hereditary fructose intolerance by use of 31 P magnetic resonance spectroscopy. *Lancet* II 1987, pp. 931–34.
- Odièvre M, G.G.A., Hereditary fructose intolerance in childhood. Diagnosis, management, and course in 55 patients. *Am J Dis Child*. 1978. Jun;**132**(6):605–608.

Steinmann b, G.V., Disorders of Fructose Metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (Eds). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8^a edition. New York, McGraw-Hill, pp. 3-45, 2001.

Smith cm, M.L., 2005. Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach, 2^a ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.

Tietz, N., Burtis, C., Ashwood, E., Bruns, D. 2008 . Tietz fundamentos de química clínica. 6. ed Rio de Janeiro: Elsevier, p 306-413.

Van schaftingen E. A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate. Eur J Biochem, 1989. 179:179–184

Veiga-Da-Cunha M, Van Schaftingen E.,2001. Identification of fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate-binding residues in the regulatory protein of glucokinase. J Biol Chem. 2002. Mar 8;277(10):8466-73. Dec 27.

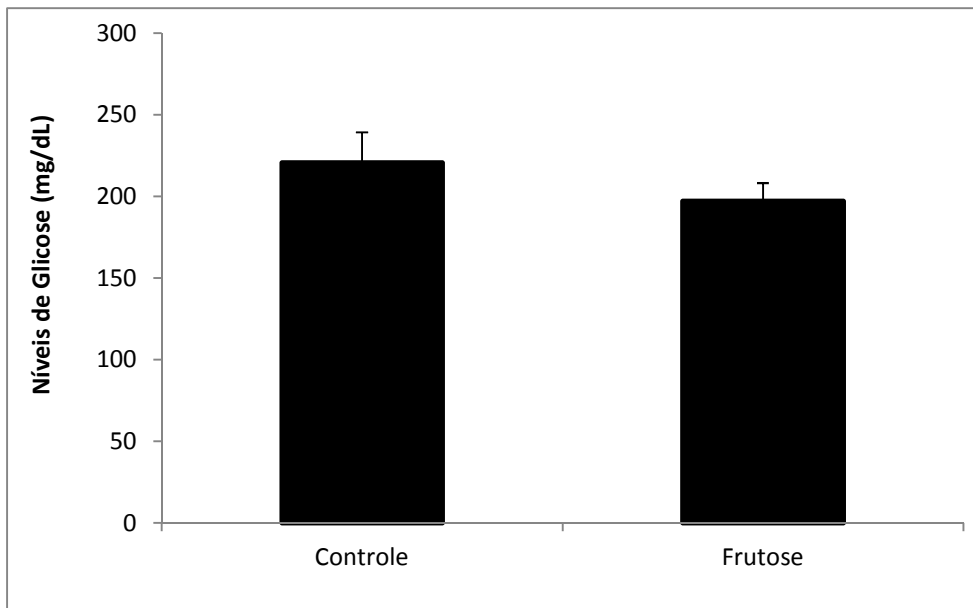


Figura 1. Níveis de glicose 12 horas após a administração aguda de frutose em soro de ratos jovens. Os dados representam média \pm erro padrão de experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em miligramas por decilitro (mg/dL). Não houve diferença significativa sobre o Teste t independente.

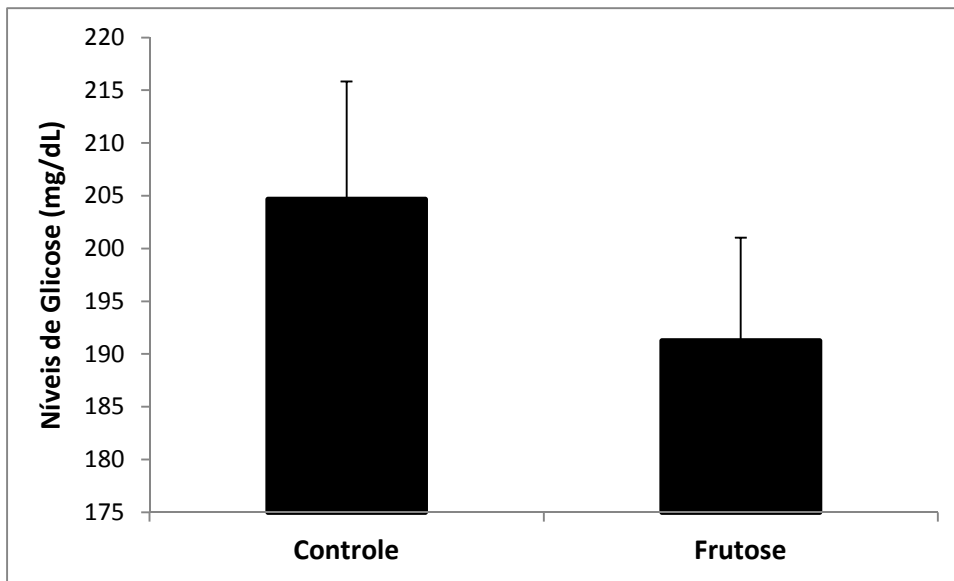


Figura 2. Níveis de glicose 24 horas após a administração aguda de frutose em soro de ratos jovens. Os dados representam média \pm erro padrão de experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em miligramas por decilitro (mg/dL). Não houve diferença significativa sobre o Teste t independente.

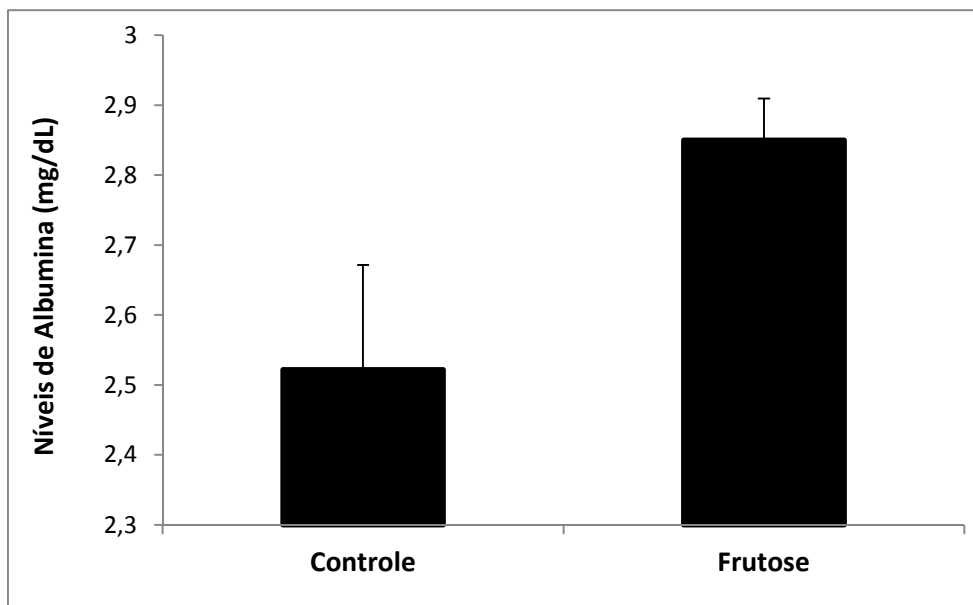


Figura 3. Níveis de albumina 12 horas após a administração aguda de frutose em soro de ratos jovens. Os dados representam média \pm erro padrão de experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em miligramas por decilitro (mg/dL). Não houve diferença significativa sobre o Teste t independente.

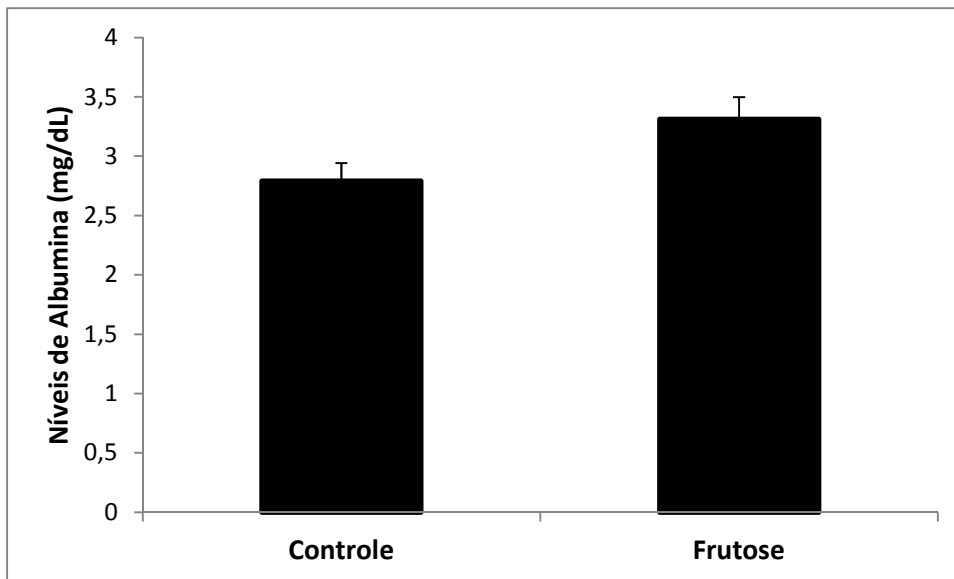


Figura 4. Níveis de albumina 24 horas após a administração aguda de frutose em soro de ratos jovens. Os dados representam média \pm erro padrão de experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em miligramas por decilitro (mg/dL). Não houve diferença significativa sobre o Teste t independente.

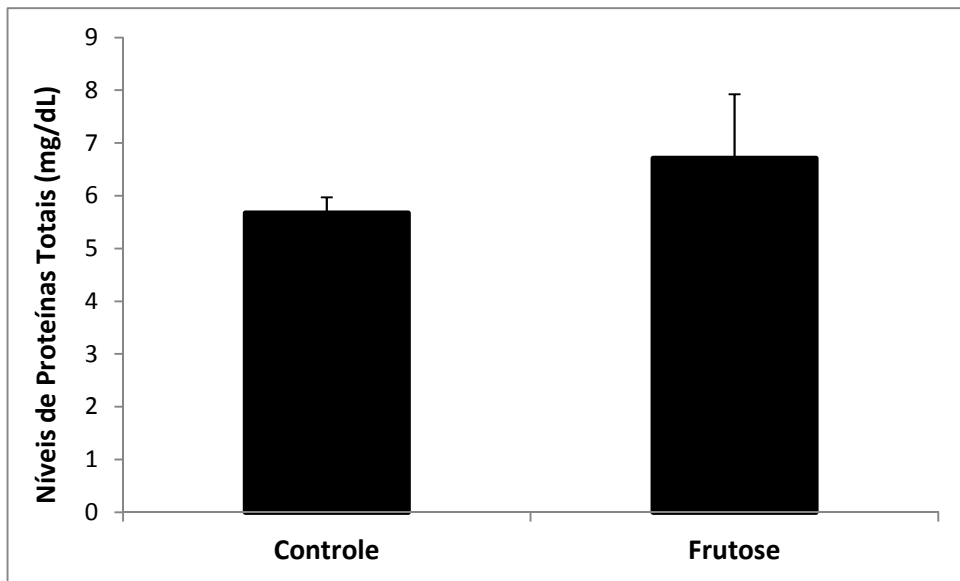


Figura 5. Níveis de proteínas totais 12 horas após a administração aguda de frutose em soro de ratos jovens. Os dados representam média \pm erro padrão de experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em miligramas por decilitro (mg/dL). Não houve diferença significativa sobre o Teste t independente.

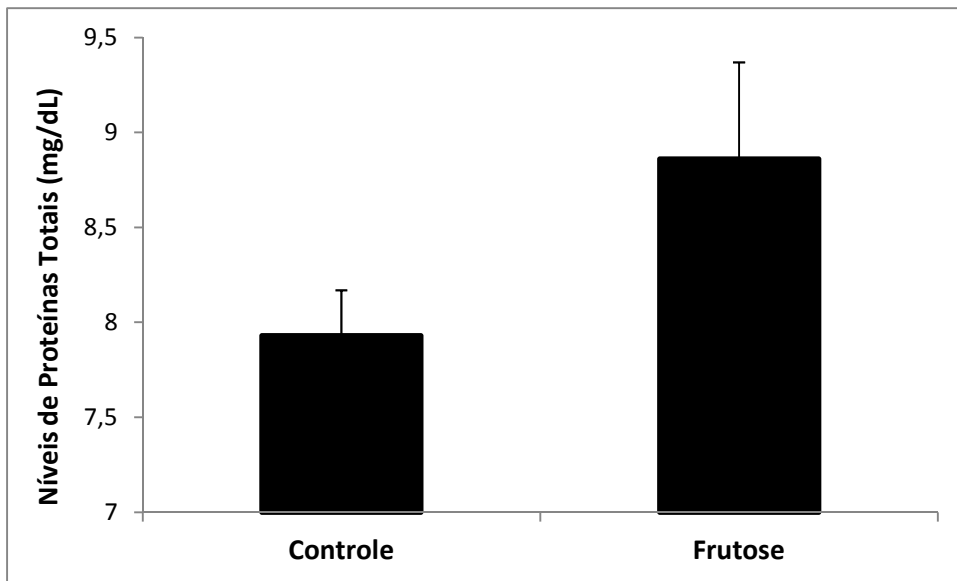


Figura 6. Níveis de proteínas totais 24 horas após a administração aguda de frutose em soro de ratos jovens. Os dados representam média \pm erro padrão de experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em miligramas por decilitro (mg/dL). Não houve diferença significativa sobre o Teste t independente.

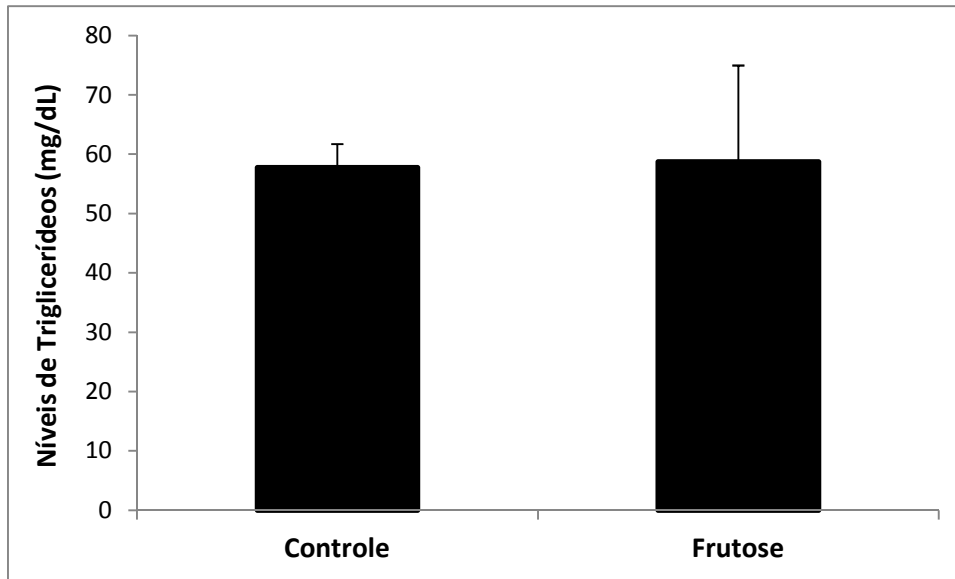


Figura 7. Níveis de triglicerídeos 12 horas após a administração aguda de frutose em soro de ratos jovens. Os dados representam média \pm erro padrão de experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em miligramas por decilitro (mg/dL). Não houve diferença significativa sobre o Teste t independente.

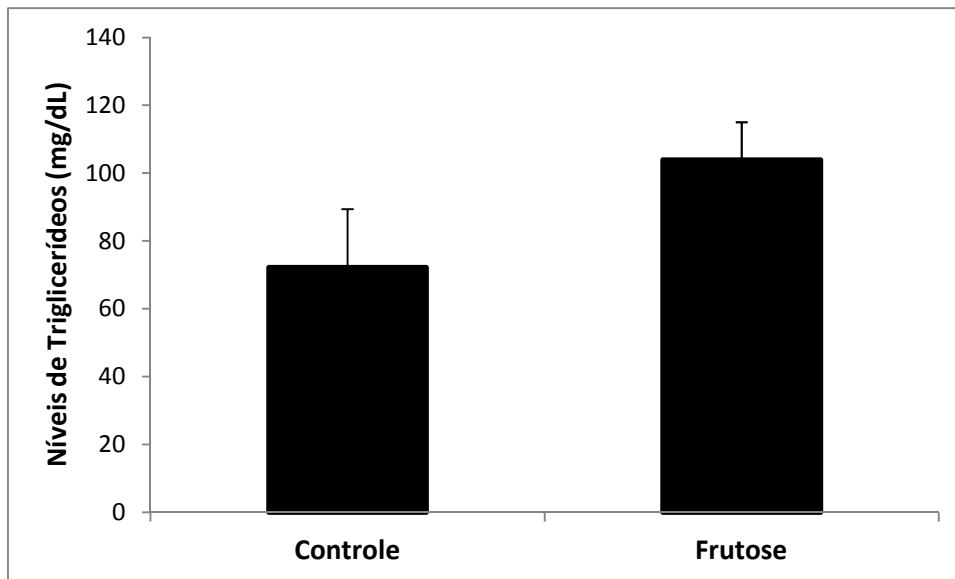


Figura 8. Níveis de triglicerídeos 24 horas após a administração aguda de frutose em soro de ratos jovens. Os dados representam média \pm erro padrão de experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em miligramas por decilitro (mg/dL). Não houve diferença significativa sobre o Teste t independente.

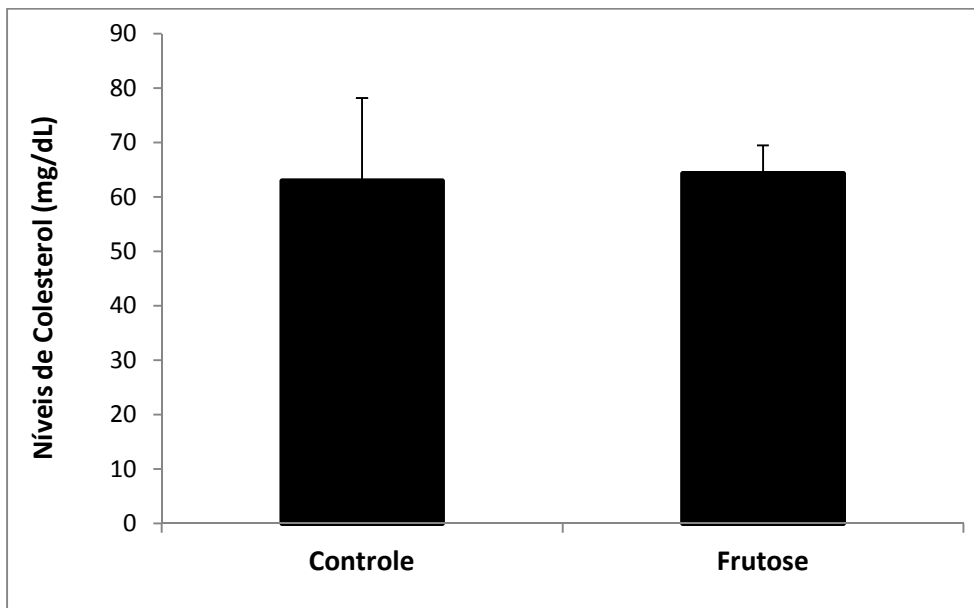


Figura 9. Níveis de colesterol 12 horas após a administração aguda de frutose em soro de ratos jovens. Os dados representam média \pm erro padrão de experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em miligramas por decilitro (mg/dL). Não houve diferença significativa sobre o Teste t independente.

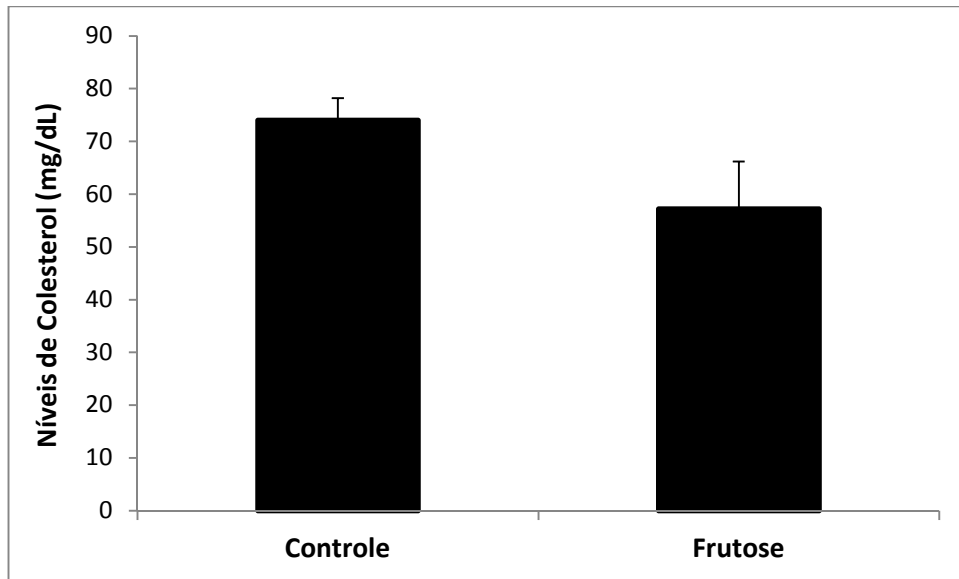


Figura 10. Níveis de colesterol 24 horas após a administração aguda de frutose em soro de ratos jovens. Os dados representam média \pm erro padrão de experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em miligramas por decilitro (mg/dL). Não houve diferença significativa sobre o Teste t independente.