

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MARINA LUMMERTZ MAGENIS

**EFEITOS DO CONSUMO DE FRUTOSE SOBRE A INSTABILIDADE
GENÔMICA E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS
SWISS FÊMEAS TRATADAS DURANTE A GRAVIDEZ E LACTAÇÃO
E NA SUA PROLE**

CRICIÚMA, 2018

MARINA LUMMERTZ MAGENIS

**EFEITOS DO CONSUMO DE FRUTOSE SOBRE A INSTABILIDADE
GENÔMICA E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS
SWISS FÊMEAS TRATADAS DURANTE A GRAVIDEZ E LACTAÇÃO
E NA SUA PROLE**

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-graduação em Ciências da
Saúde para a obtenção do título de mestre em
Ciências da Saúde.
Orientadora: Prof^a. Dr^a Vanessa Moraes de
Andrade


CRICIÚMA, 2018



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 314

Com início às 11h00 (onze horas) do dia vinte do mês de setembro de 2018 (dois mil e dezoito), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Marina Lummertz Magenis**, sob a orientação da Prof.^a Dra. Vanessa Moraes de Andrade, intitulada **"EFEITOS DO CONSUMO DE FRUTOSE SOBRE A INSTABILIDADE GENÔMICA E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS SWISS TRATADAS DURANTE A GRAVIDEZ E LACTAÇÃO E NA SUA PROLE"**. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada; Prof. Dr. Paulo César Lock Silveira (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Prof.^a Dra. Alessandra Peres (Centro Universitário Metodista – IPA) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 12h00 (doze horas), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavei a presente ata, que assino juntamente com a Prof.^a Dra. Maria Inês da Rosa, Coordenadora do Programa. Criciúma, 20 (vinte) de setembro de 2018 (dois mil e dezoito).


Prof.^a Dra. Maria Inês da Rosa
Coordenadora do PPGCS


Diana Ghisi Daniel
Secretária

Folha Informativa

A dissertação foi elaborada seguindo a Resolução 07/2015 do PPGCS e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Biomedicina Translacional do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPGCS da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Dedico esta, bem como todas as minhas conquistas, à minha família. Vocês são os melhores presentes que Deus poderia me dar.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder a vida e dar-me uma família maravilhosa, amigos e força para nunca desistir dos meus sonhos.

Aos meus pais, Vilmar e Vera, pela dedicação, amor, paciência e carinho. A vocês minha eterna gratidão.

A minha avó Zilda, pelo amor, carinho e palavras carinhosas durante todo o período de sua vida. Sei que você está me acompanhando durante a realização dessa etapa.

A família Ávila, Nadir, Nelzo, Germano, Eduardo, Sabrina e Neide, por proporcionarem um ambiente familiar em Criciúma, além de todo apoio, carinho e dedicação para que essa jornada fosse a melhor possível. Muita gratidão a vocês!

Ao meu namorado, Germano, meu grande incentivador e companheiro de vida. Obrigada pelo o companheirismo, apoio e amor durante todo esse caminho. Você foi essencial!

Aos meus primos, companheiros de apartamento e meus irmãos de coração, Pedro, Luiz Henrique, João e Raul, por esses anos divididos. Vocês sabem o quanto são importantes para mim.

As minhas amigas, Bruna, Wanessa, Alessandra e Kássia, pelas risadas e amizade durante todo esse período.

A minha orientadora Vanessa Moraes de Andrade, por compartilhar seus conhecimentos e pelo direcionamento em todas as etapas desta pesquisa, além da paciência, companheirismo e amizade. Muito obrigada por tudo!

A todos os integrantes de graduação e pós-graduação do GPGTOX, que compartilharam e trabalharam junto deste trabalho com muita dedicação. Em especial, a Pamela e o Anderson que sempre estiveram comigo. Muito obrigada!

A minha amiga Adriani, não tenho palavras para agradecer toda a sua ajuda e amizade. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos, me auxiliar em todos os processos do laboratório e estar sempre à disposição para ajudar a todos. O mestrado me proporcionou uma grande amiga. Obrigada por tudo!

A amigas da pós que eu conheci quando ainda estava na graduação e que sempre me incentivaram a fazer o mestrado, Tamires Pavei Macan e Thais Vilela. Muito obrigada pelo apoio e amizade! Em especial, gostaria de agradecer a Thaís Vilela que sempre esteve disponível e presente durante todas as etapas de

correções e contribuições desse trabalho. Muito obrigada por todas as contribuições, risadas e amizade!

Aos amigos que o laboratório me deu, Paula, Flávia, Ricardo, Daysi e Natália. Muito obrigada pelas risadas, a cada bom dia e conversas durante esse período. O carinho de vocês foi muito importante!

A todos os colegas e amigos do grupo do professor Ricardo Andrez, em especial a Rahissa, Natália e Helen por todo o carinho e ajuda nesse período. Muito obrigada!

Aos todos os colegas do grupo do professor Alexandre pelo convívio diário no laboratório.

Ao professor Ricardo Andrez, pela ajuda, ensinamentos e contribuições durante esse trabalho.

Ao professor Emanuel e ao curso de Biomedicina pela disponibilidade nas análises realizadas durante esse período.

Ao curso de Nutrição, em especial ao Marco, Rita, Martinha, Maria Cristina e Tamy Colonetti, pelo carinho e oportunidade de realizar o estágio da prática docente. Muito obrigada!

Ao pessoal do centro de Experimentação da Unesc, principalmente o Heron e o Deivid pela ajuda e companheirismo no decorrer deste trabalho e tantos outros.

Aos animais que involuntariamente cederam à vida em prol do conhecimento Científico.

A Unesc pela oportunidade de realizar minha graduação e mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro durante todo o meu doutorado.

Agradeço aos membros da banca examinadora, pelo interesse e disponibilidade.

Aos professores do Programa de Ciências da Saúde da UNESC, pelos ensinamentos durante esses anos.

Enfim, a todos que colaboraram direta ou indiretamente para minha formação.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível”.

São Francisco de Assis.

RESUMO

A frutose, também conhecida como levulose, é uma hexose que apresenta uma fórmula química expressa por $C_6H_{12}O_6$. O consumo de frutose durante a gestação pode provocar um estado de hiperglicemia na gestante, podendo estimular o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e alterações nas macromoléculas. Baseado nisso, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos genéticos e bioquímicos do consumo de frutose sobre a prole de camundongos Swiss tratados durante a gravidez e lactação. Para tanto, foram utilizados 15 casais de camundongos Swiss de 60 dias de idade que foram divididos em 3 grupos de 5 casais, sendo o controle negativo (G1 – bebeu apenas água) e os grupos frutose (G2 e G3 – bebeu doses 10%/L de frutose e 20%/L, respectivamente). Após o nascimento das proles os animais foram divididos em 6 grupos: Grupo P1 e P2: controle negativo, prole de machos e fêmeas, respectivamente, cujas mães receberam água durante gestação e lactação; Grupo P3 e P4: Frutose 10%/L, prole de machos e fêmeas, respectivamente, cujas mães receberam frutose 10%/L durante gestação e lactação; Grupo P5 e P6: Frutose 20%/L, prole de machos e fêmeas, respectivamente, cujas mães receberam frutose 20%/L durante gestação e lactação. A frutose foi disponibilizada nas garrafas de hidratação das fêmeas durante todo o período gestacional e de lactação. Estes animais foram submetidos à eutanásia aos 30 dias de vida para a realização das avaliações genéticas e bioquímicas. No período da gestação e lactação as duas doses de frutose testadas (10%/L e 20%/L) apresentaram atividade genotóxica e mutagênica, associada ao aumento do consumo alimentar, peso corporal, perfil lipídico e glicemia de jejum nas fêmeas. Em adição, na prole (tanto em machos quanto em fêmeas), ambas as doses também demonstraram atividade genotóxica, porém sem efeito mutagênico. Além disso, a prole apresentou alterações nutricionais e metabólicas em virtude do aumento do consumo alimentar. As proles das fêmeas que receberam frutose via gestação e lactação desenvolveram síndrome metabólica no início da vida (baixo HDL, aumento de triglicerídeos e glicemia de jejum). Com isso, pode-se sugerir que o alto consumo de frutose durante esses períodos é prejudicial tanto para as mães gestantes quanto para sua prole. Em conclusão, salienta-se a conscientização do consumo da frutose entre as gestantes e lactantes.

Palavras-chave: Frutose; Gestação; Lactação; Genotoxicidade; Bioquímica.

ABSTRACT

Fructose, also known as levulose, is a hexose which has a chemical formula expressed by $C_6H_{12}O_6$. The consumption of fructose during the pregnancy can cause hyperglycemia in the pregnant, and may stimulate a increased production of reactive oxygen species and changes in macromolecules. Based on these findings, the goal of this study was to evaluate the genetic and biochemical effects of fructose consumption on the offspring of Swiss mice treated during pregnancy and lactation. For this, 15 couples of 60-day-old Swiss mice were divided into 3 groups of 5 couples; the negative control (G1 - water only) and the fructose groups (G2 and G3 - doses 10%/L and 20%/L, respectively). After birth, the animals were divided into 6 groups: Group P1 and P2: negative control, male and female, respectively, whose mothers received water during pregnancy and lactation; Group P3 and P4: Fructose 10%/L, male and female, respectively, whose mothers received 10%/L of fructose during pregnancy and lactation; Group P5 and P6: Fructose 20%/L, male and female, respectively, whose mothers received 20%/L of fructose during pregnancy and lactation. Fructose was available in the hydration bottles of females throughout all the gestation and lactation periods. These animals were submitted to euthanasia at 30 days of age for genetic and biochemical evaluations. In the gestation and lactation period, the two doses of fructose tested (10%/L and 20%/L) showed genotoxic and mutagenic activity, associated to increase of dietary intake, body weight, lipid profile and fasting glycemia in females. In addition, in the offspring (both males and females), both doses also showed genotoxic activity, but without mutagenic effect. Furthermore, the young presented nutritional and metabolic changes due to the increase in food consumption. The offsprings of females that received fructose via gestation and lactation developed metabolic syndrome throughout life (low HDL, increased triglycerides and fasting glycemia). Thus, it can be suggested that the high consumption of fructose during these periods is harmful for both, pregnant and their children. In conclusion, there is an awareness of the consumption of fructose among pregnant and lactating women.

Palavras-chave: Fructose; Gestation; Lactation; Genotoxicity; Biochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química da Frutose.	17
Figura 2. Metabolismo da frutose e glicose.	20
Figura 3. Consequências e metabolismo do alto consumo de frutose.	23
Figura 4. Grupos de casais (G1 a G3).	30
Figura 5. Grupos da prole (P1 a P6).	31
Figura 6. Desenho experimental	32
Figura 7. Teste oral de tolerância à glicose (OGTT) em camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L;20%/L).....	45
Figura 8. Área sob a curva (ASC) do Teste de tolerância a glicose em camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L;20%/L), realizada durante a gestação em função do tempo.	45
Figura 9. Índice de danos no DNA em células de sangue periférico de camundongos Swiss fêmeas, suplementados ou não com frutose (10%/L; 20%/L) durante o período de gestação e lactação..	46
Figura 10. Índice de danos no DNA em células de tecidos periféricos de camundongos Swiss fêmeas, suplementados ou não com frutose (10%/L; 20%/L) após o período da lactação.	48
Figura 11. Curva de peso corporal (g) de fêmeas da prole de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L) durante a gestação e lactação.	50
Figura 12. Curva de peso corporal (g) de machos da prole de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L) durante a gestação e lactação.	51
Figura 13. Índice de danos no DNA em células de sangue periférico de machos da prole de camundongos Swiss fêmeas, suplementados ou não com frutose (10%/L; 20%/L) durante o período de gestação e lactação..	55
Figura 14. Índice de danos no DNA através do ensaio cometa alcalino, em células de fígado e rim de machos da prole de camundongos Swiss fêmeas, suplementadas ou não com frutose (10%/L; 20%/L) durante o período de gestação e lactação..	56
Figura 15. Índice de danos no DNA em células de sangue periférico da prole fêmea de camundongos Swiss fêmeas, suplementados ou não com frutose (10%/L; 20%/L) durante o período de gestação e lactação..	57
Figura 16. Índice de danos no DNA em células de fígado e rim da prole fêmea de camundongos Swiss fêmeas, suplementados ou não com frutose (10%/L; 20%/L) durante o período de gestação e lactação..	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingestão de água ou frutose (10%/L; 20%/L) em mL, por camundongos Swiss fêmeas, medida a cada 2 dias durante a cópula, gestação e lactação.	38
Tabela 2. Ingestão de ração animal em g, por camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L;20%/L), medida a cada 7 dias durante a gestação e lactação.	39
Tabela 3. Peso corporal em g, por camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L;20%/L), medida no 14º dia de gestação e no 21º lactação.	40
Tabela 4. Eficiência energética (g/kcal) de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L;20%/L), medida no 14º dia de gestação e 21º lactação.	40
Tabela 5. Consumo total energético (g/kcal) de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L;20%/L), medida no 14º dia de gestação e 21º lactação.	41
Tabela 6. Colesterol total (mg/dL) de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L;20%/L), medidas durante a pré-cópula, gestação e lactação.	42
Tabela 7. HDL (mg/dL) de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L;20%/L), medidas durante a pré-cópula, gestação e lactação.	42
Tabela 8. Triglicerídeos (mg/dL) de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L;20%/L), medidas durante a pré-cópula, gestação e lactação.	43
Tabela 9. Razão de Triglicerídeos/HDL em mg/dL de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L;20%/L), medidas durante a pré-cópula, gestação e lactação.	44
Tabela 10. Glicemia de jejum (mg/dL) de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L;20%/L), medidas durante a pré-cópula, gestação e lactação.	44
Tabela 11. Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMn) observados nas amostras de medula óssea de camundongos Swiss fêmeas tratadas com frutose durante a gravidez e lactação.	48
Tabela 12. Ingestão de ração animal em g, pela prole de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L) durante a gestação e lactação. A ingesta foi avaliada a cada 7 dias.	49
Tabela 13. Eficiência energética (g/kcal) da prole de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L) durante a gestação e lactação.	52
Tabela 14. Consumo total energético (g/kcal) da prole de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L) durante a gestação e lactação.	52
Tabela 15. Perfil lipídico de fêmeas da prole de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L) durante a gestação e lactação.	53

Tabela 16. Perfil lipídico de machos da prole de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L) durante a gestação e lactação.....	54
Tabela 17. Glicemia de jejum da prole de camundongos Swiss fêmeas cujas mães receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L) durante a gestação e lactação.....	54
Tabela 18. Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMn) observados nas amostras de medula óssea de machos da prole de camundongos Swiss fêmeas tratadas com frutose durante a gravidez e lactação.	59
Tabela 19. Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMn) observados nas amostras de medula óssea de fêmeas da prole de camundongos Swiss fêmeas tratadas com frutose durante a gravidez e lactação	59

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AGL: Ácidos graxos livres

ANOVA: Análise de variância de uma via

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASC: Área sob a curva

ATP: Adenosina trifosfato

CO₂: Dióxido de carbono

ChREBP: Proteína de ligação a elementos de resposta a carboidratos (do inglês carbohydrate-responsive element-binding protein)

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DAG: Diacilglicerol;

DCNT: Doenças Crônicas Não Transmissíveis

DHAP: Dihidroxiacetona fosfato (DHAP)

DNA: Ácido desoxirribonucleico (do inglês deoxyribonucleic acid)

EC: Ensaio cometa

ENC: Eritrócitos normocromáticos

ENCMn: Eritrócitos normocromáticos micronucleados

EO: Estresse oxidativo

EPC: Eritrócitos policromáticos

EPCMn: Eritrócitos policromáticos micronucleados

ERO: Espécies reativas de oxigênio

FPG: Formamidopirimidina DNA-glicosilase

GPx: Glutathione peroxidase (do inglês glutathione peroxidase)

GSH: Glutathione reduzida (do inglês reduced glutathione)

GTT: Teste de tolerância à glicose

ID: Índice de danos

IMP: Monofosfato inosina

Kcal: Quilocaloria

MDA: Malondialdeído

MG: Metilglioxal

MN: Micronúcleos

NCEP-ATP: National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III

NF-κB: Fator de transcrição nuclear kappa B (do inglês factor nuclear kappa B)

Nrf2: Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (do inglês *nuclear factor erythroid 2-related factor-2*)

POF: Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF)

SOD: Superóxido desmutase

TG: Triglicerídeos

TBA-RS: Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

UNESC: Universidade do Extremo Sul Catarinense

USDA: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

UV: Radiação ultravioleta (do inglês ultraviolet radiation)

VLDL: Lipoproteínas de muita baixa densidade

SUMÁRIO

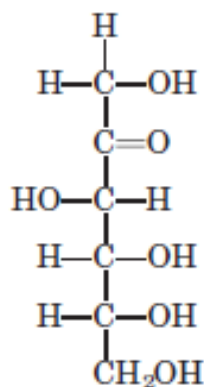
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 FRUTOSE	17
1.1.1 METABOLISMO DA FRUTOSE	19
1.2 FRUTOSE E DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS (DCNT)	21
1.3 FRUTOSE E INSTABILIDADE GENÔMICA.....	23
1.4 FRUTOSE E GRAVIDEZ.....	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo Geral:	28
2.2 Objetivos Específicos:	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 ANIMAIS.....	29
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	29
3.3 TRATAMENTOS	31
3.3.1 Preparo da solução de frutose	31
3.4 DESENHO EXPERIMENTAL.....	31
3.5 CONSUMO ALIMENTAR, EFICIÊNCIA ENERGÉTICA E GANHO DE PESO CORPORAL DOS ANIMAIS.....	32
3.6 AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE NAS FÊMEAS GESTANTES	32
3.7 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE	33
3.7.1 Ensaio Cometa.....	33
3.7.2 Teste de Micronúcleos (MN)	35
3.8 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	35
3.8.1 Teste de tolerância à glicose (GTT)	35
3.8.2 Perfil lipídico.....	36
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4 RESULTADOS	38
4.1 FÊMEAS GESTANTES E LACTANTES.....	38
4.1.1 Avaliação do consumo alimentar, peso corporal, eficiência energética e consumo total energético nas fêmeas gestantes e lactantes	38
4.1.1.1 Ingestão de líquidos, ração animal e peso corporal	38
4.1.1.2 Eficiência energética e consumo total energético	40
4.1.3 Avaliação do perfil lipídico nas fêmeas gestantes e lactantes.....	41

4.1.4 Avaliação da resposta glicêmica nas fêmeas gestantes e lactantes	44
4.1.5 Ensaio Cometa das fêmeas gestantes e lactantes.....	46
4.1.6 Teste de Micronúcleos nas fêmeas após o desmame	48
4.2 AVALIAÇÃO DA PROLE (MACHOS E FÊMEAS).....	49
4.2.1 Avaliação do consumo alimentar, curva de peso corporal, eficiência energética e consumo total energético da prole cujas mães receberam frutose durante a gestação e lactação	49
4.2.1.2 Consumo alimentar	49
4.2.1.3 Curva de peso corporal	50
4.2.1.4 Eficiência energética	51
4.2.1.5 Consumo total energético.....	52
4.2.2 Avaliação do perfil lipídico da prole (machos e fêmeas) cujas mães receberam frutose durante a gestação e lactação	53
4.2.3 Avaliação da glicemia de jejum da prole (machos e fêmeas) que recebeu frutose durante a gestação e lactação	54
4.2.4 Ensaio Cometa da prole cujas mães receberam frutose durante a gestação e lactação.....	55
4.2.5 Teste de Micronúcleos na prole (machos e fêmeas) de camundongos fêmeas que receberam água ou frutose durante a gestação e lactação.....	58
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÃO	69
7 REFERÊNCIAS.....	70
ANEXO	80
ANEXO A	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 FRUTOSE

A frutose é uma hexose que apresenta fórmula química expressa por $C_6H_{12}O_6$, sendo que sua diferença, em relação à glicose, está na presença de um grupo cetona na posição 2 de sua cadeia de carbono, enquanto a glicose apresenta um grupo aldeído na posição 1 da mesma cadeia. Ela é considerada um monossacarídeo, composto por seis átomos de carbono unidos em ligações covalentes simples, apresentando grupamentos hidroxila e um grupamento carbonila. A posição desse grupamento é que determinará, após a hidrólise da frutose, se ele dará origem à cetona ou aldeído (Figura 1) (Lehninger et al., 2013).



D-Frutose

Figura 1. Estrutura química da Frutose.
 Fonte: Adaptado Lehninger et al. (2013).

A frutose é encontrada em várias frutas e vegetais presentes na sua forma livre, sob a forma de sacarose, rafinose e estaquiase. A sacarose é um dissacarídeo que quando hidrolisado forma uma molécula de frutose e outra de glicose. A rafinose é um trissacarídeo e a estaquiase é um tetrassacarídeo, ambas estão presentes em leguminosas (feijão, grão de bico, soja e ervilha) (Gaino e Silva, 2011). Entretanto, além de suas formas naturais (frutas, vegetais e leguminosas), a frutose pode ser encontrada no xarope de frutose (hidrólise do melado da cana-de-açúcar) e no xarope de milho, um produto de grande utilidade na indústria mundial por possuir alta concentração de frutose e alto poder adoçante, sendo muito utilizado em geleias, sucos, biscoitos, entre outros (Barreiros et al., 2005).

Além disso, a frutose pode ser produzida através de um poliól chamado sorbitol muito utilizado pela indústria. O sorbitol produz frutose através da reação de oxidação mediada pela enzima sorbitol desidrogenase. O sorbitol é encontrado em algumas plantas, frutas e em produtos dietéticos (Gaino e Silva, 2011).

Na década de 70, iniciaram os estudos de separação da frutose e da glicose para sua utilização na indústria através da cromatografia de troca iônica, observando que o isolamento de isomerases é capaz de transformar a D-glicose em D-frutose, levando a introdução comercial de xaropes derivados de monossacarídeos, que são ricos em frutose e de baixo custo para uso comercial (Wang e Van Eys, 1981). Desde o início do século 20, a partir dessa evolução industrial, a ingestão de frutose aumentou, principalmente decorrente ao uso do açúcar, adoçantes industrializados adicionados aos alimentos, sobretudo da introdução do xarope de milho em produtos alimentícios e não do consumo de frutas (Dekker et al., 2010).

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), o consumo de xarope de milho em 1970 era próximo de zero enquanto o de sacarose era de 90g/dia. Entretanto, mudanças industriais ocorreram entre 1970 e 1985, diminuindo o consumo de sacarose progressivamente em quase 50%. Em 2007, observou-se um aumento no consumo do xarope de milho em 41% pela indústria e 14% de derivados do xarope de glicose, glicose pura e mel. Em geral, a média mundial do consumo de frutose aumentou 16% nos últimos 20 anos, sendo de 56g/dia em 1986 para 65 g/dia em 2007 (Tappy e Lê, 2010).

Segundo Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009, o aumento no consumo desses monossacarídeos está relacionado ao crescente consumo de salgados industrializados (56,5%), chocolates (36,6%), refrigerantes (39,9%), pizzas (42,6%) e sanduíches prontos (41,4%) onde a grande maioria possui xarope de milho nos ingredientes (POF, 2011).

Ao correlacionar a faixa etária, é possível mensurar um consumo 20% maior em adolescentes e adultos jovens se comparados aos idosos (Tappy e Lê, 2010). De acordo com a POF (2008-2009), o consumo de açúcar total vem crescendo principalmente na adolescência, sofrendo uma grande variação entre as faixas etárias. Neste contexto, o consumo médio de açúcar total entre os adolescentes é cerca de 30% mais elevado em relação aos idosos, e 15 a 18% maior entre os adultos. O consumo no grupo dos adolescentes de ambos os sexos,

varia de 105,4g/dia a 113,1g/dia no sexo masculino e de 106,8g a 110,7g no sexo feminino, enquanto o grupo dos idosos com 60 anos ou mais de idade apresentam menores médias no consumo de açúcar total (POF, 2011).

1.1.1 METABOLISMO DA FRUTOSE

A frutose é absorvida no intestino, resultante da hidrólise da sacarose e/ou da própria frutose decorrente de frutas e de produtos industrializados. Os enterócitos que revestem as vilosidades do intestino delgado contêm enzimas que são capazes de separar os dissacarídeos lactose, sacarose e maltose, entre outros pequenos polímeros de glicose, nos seus monossacarídeos constituintes (Tappy e Lê, 2010). O dissacarídeo sacarose, por exemplo, divide-se em uma molécula de glicose e outra de frutose. Assim, os produtos finais da digestão de carboidratos são todos monossacarídeos hidrossolúveis que são absorvidos imediatamente pelo sangue (Guyton e Hall, 2008).

A absorção da frutose no intestino e o transporte do sangue para as células envolve transportadores de membrana, sendo que a expressão destes transportadores vai aumentando após o nascimento, principalmente após o desmame, o que pode contribuir para um aumento nos casos de má absorção nos primeiros anos de vida. A frutose é transportada para dentro do enterócito através de um transportador específico para a frutose, GLUT 5, localizado no pólo apical do enterócito. Dentro do enterócito a frutose expande-se para a circulação e vasos sanguíneos através do transporte mediado pelo GLUT 2 no pólo basolateral do enterócito (Guyton e Hall, 2008).

Após isso, a frutose presente na circulação é rapidamente capturada pelo fígado (GLUT 2), uma vez que, grande parte de seu metabolismo acontece no fígado (50-75%) e o restante é metabolizado nos rins e adipócitos (Tappy e Lê, 2010). Dessa forma, a frutose é metabolizada em frutose-1-fosfato pela enzima frutoquinase, através da fosforilação por adenosina trifosfato (ATP). A frutose-1-fosfato é clivada pela aldolase B e forma dihidroxiacetona fosfato (DHAP) e gliceraldeído, que é fosforilado pelo ATP para formar gliceraldeído-3-fosfato. Sendo que o DHAP e o gliceraldeído-3-fosfato são intermediários da glicólise, podendo ser convertidas em piruvato e oxidados em CO₂ e H₂O no ciclo de Krebs e também em lactato, atingindo a corrente sanguínea (Lieberman e Ricer, 2014).

O consumo de frutose pode provocar alterações na produção de glicose, embora em alguns seres humanos e roedores ela parece estar inalterada. Entretanto, as concentrações de glicose em jejum ou pós-prandial podem ser aumentadas após um alto consumo de frutose em ensaios clínicos e animais, estimulando um aumento na demanda de insulina e desencadeamento na liberação desse hormônio (Zhang et al., 2017). No entanto, a via metabólica da frutose apresenta-se diferente do metabolismo da glicose (Figura 2), resultando em efeitos como resistência à insulina, obesidade e hiperuricemia (Tappy e Lê, 2010).

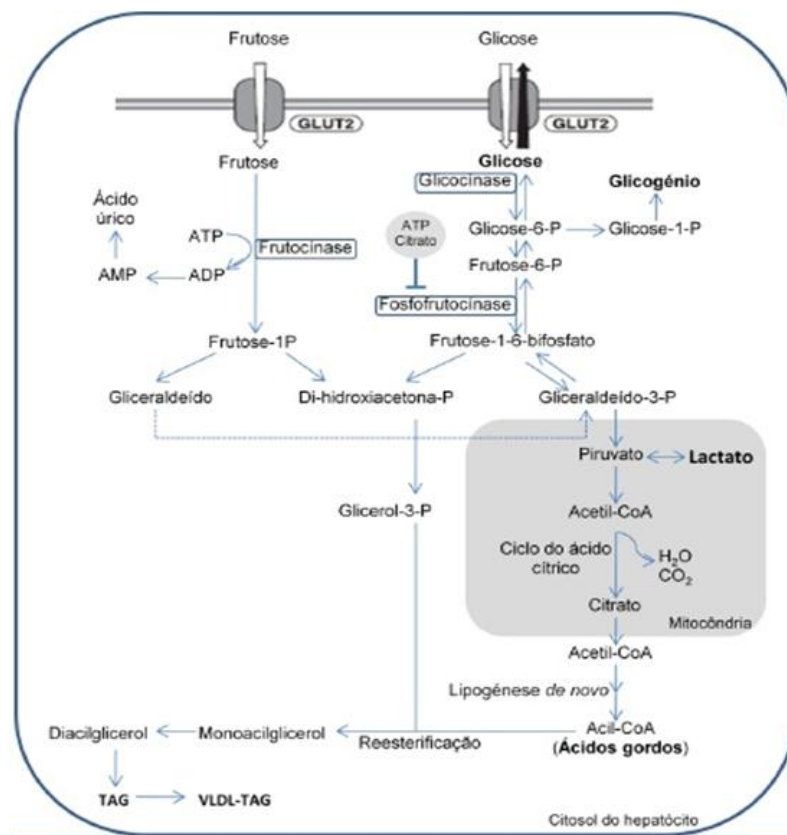


Figura 2. Via metabólica da frutose e glicose.

Fonte: Adaptado de Rutledge e Adeli (2007); Tappy e Lê (2010).

Parte da metabolização da frutose pode ainda ser usada para a síntese de ácidos graxos e glicerol nos hepatócitos através da lipogênese, inibindo a oxidação lipídica hepática, favorecendo a reesterificação de ácidos graxos e glicerol para formar triglicerídeos e a síntese de lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL), ricas em triglicerídeos (TG) que em seguida são liberadas pela corrente sanguínea (Topping et al., 1972; Tappy e Lê, 2010). Dessa forma, o consumo excessivo de frutose pode induzir uma hiperlipidemia, pelo aumento de triglicerídeos

e VLDL-TG circulantes, bem como acúmulo de TG em tecidos e órgãos extra-hepáticos. A lipotoxicidade induzida por frutose pode levar à autofagia no músculo esquelético, disfunção cardíaca, inflamação adiposa, disfunção nas ilhotas pancreáticas, estresse oxidativo e inflamação (Stanhope et al., 2009).

A frutose pode também induzir a produção de ácido úrico através do aumento da degradação da adenosina trifosfato (ATP) para adenosina monofosfato (AMP), um grande precursor do ácido úrico formado através da fosforilação de frutose a frutose-1-fosfato. Dessa forma, a frutose-1-fosfato degrada um fosfato inorgânico e seus níveis intracelulares diminuem, levando à diminuição de ATP e aumentando AMP, formando o aumento da monofosfato inosina (IMP). O aumento de AMP e IMP ativam vias metabólicas e levam ao aumento na produção de ácido úrico (Cho et al., 2010). Além disso, o aumento do consumo desse monossacarídeo pode formar um metabólito chamado de metilglioxal (MG). Esse metabólito é gerado através de uma reação entre o DHAP e o gliceraldeído pela MG sintetase, podendo induzir uma ativação do fator nuclear kappa β (NF- κ B) e estresse oxidativo em células musculares lisas e vasculares (Dhar et al., 2008).

No entanto, o destino metabólico da frutose em mamíferos permanece incompreendido. Jang et al. (2018) a fim de estudar o seu metabolismo, traçaram isótopos e usaram espectrometria de massa para rastrear o destino dos carbonos de glicose e frutose *in vivo*. Foi observado que a ingestão de baixa doses de frutose é eliminada no intestino e que altas doses de frutose sobrecarregam a absorção e a depuração da frutose intestinal, atingindo tanto o fígado quanto a microbiota colônica. Assim, observou-se que a depuração de frutose intestinal é aumentada tanto por exposição prévia à frutose quanto pela alimentação e que seu alto consumo está associado a problemas hepáticos e a síndrome metabólica.

1.2 FRUTOSE E DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS (DCNT)

Há uma crescente preocupação com o consumo de frutose no aparecimento de Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT). A frutose é um nutriente que quando consumido em excesso pode possuir efeitos metabólicos adversos, principalmente no fígado (Tappy, 2018). O consumo crônico deste monossacarídeo pode estar associado ao aumento da concentração de gordura intra-hepática e no desenvolvimento de resistência à insulina, além do aumento na

prevalência de doença hepática gordurosa não alcoólica e hiperlipidemia, sendo que a frutose é um substrato potente e estimulador da lipogênese (Oishi et al., 2018).

Estudos epidemiológicos sugerem que o crescente consumo de bebidas adoçadas (contendo sacarose ou uma mistura de glicose e frutose) está associado a uma alta ingestão de energia, aumento do peso corporal e a ocorrência de distúrbios metabólicos e cardiovasculares (Gaino e Silva, 2011), como o aparecimento dos fatores de risco para o desenvolvimento de DCNT e repercussões no estresse oxidativo, dano ao ácido dextrorribonucleico (DNA), lesão renal e hipertensão arterial na infância, adolescência e na fase adulta (Tappy e Lê, 2010; Zhang et al., 2017).

Acredita-se que uma dieta rica em frutose possa alterar o conteúdo do receptor de angiotensina II no núcleo e uma fração de membrana plasmática do tecido adiposo visceral, contribuindo para uma pressão sanguínea elevada e diminuição da capacidade antioxidante visceral (Bundalo et al., 2017).

Segundo Huang et al. (2018) uma dieta rica em frutose (66%) pode aumentar os níveis de triglicerídeos e glicemia. Altos níveis desses metabólitos da frutose (glicose, triglicerídeos, ácidos graxos livres, ácido úrico e metilglioxal) podem prejudicar as funções locais de cada órgão ou tecido, provocando alteração na produção de citocinas inflamatórias, glicose, insulina, adiponectina, leptina e endotoxina. Além de provocar também, alterações vasculares, estresse oxidativo, inflamação crônica, disfunção endotelial, autofagia, aumento da permeabilidade intestinal e uma futura síndrome metabólica (Figura 3) (Zhang et al., 2017).

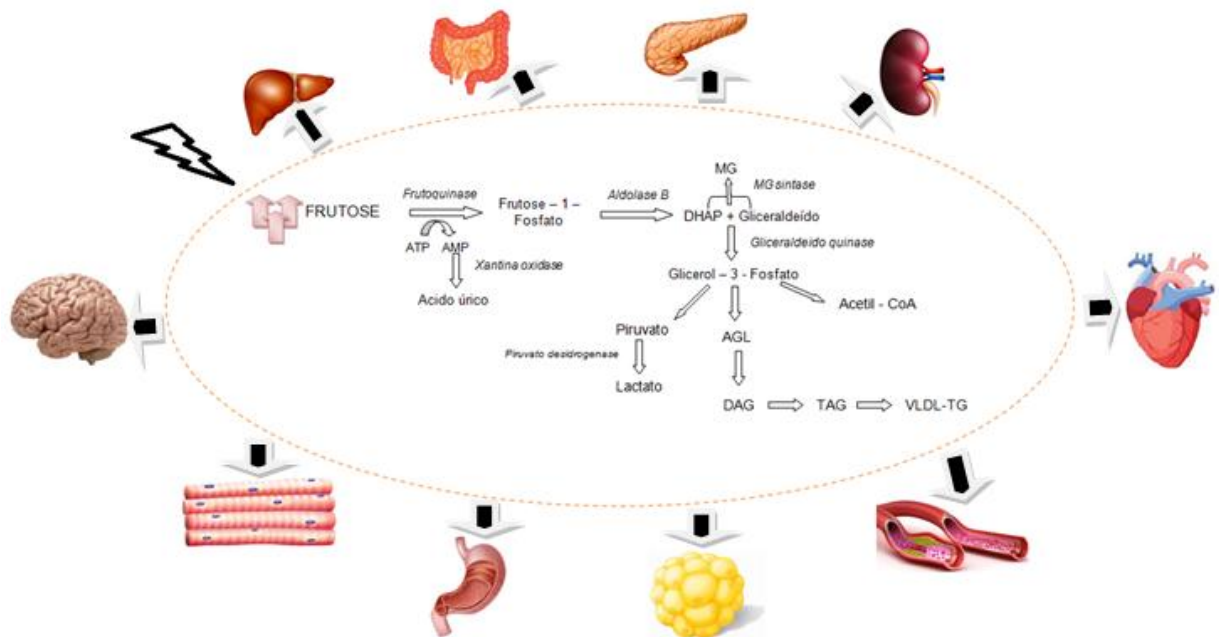


Figura 3. Consequências e metabolismo do alto consumo de frutose. MG: metilglicoxal; ATP: Adenosina trifosfato; AMP: Adenosina monofosfato; AGL: ácido graxo livre; DAG: Diacilglicerol; TAG: Triacilglicerol; VLDL-TG: lipoproteínas de muito baixa densidade; DHAP: dihidroxiacetona fosfato. Fonte: Adaptado Zhang et al. (2017).

Em uma revisão sistemática e metanálise (Kelishadi et al., 2014), foi observado os efeitos adversos da frutose sobre a maioria dos componentes que caracterizam uma síndrome metabólica (glicemia de jejum, triglicerídeos, lipoproteína de alta densidade - HDL e pressão arterial). O alto consumo de frutose foi positivamente associado com o aumento de glicemia de jejum, triglicerídeos, pressão arterial e inversamente aos níveis de HDL. Assim, este estudo sugeriu que o consumo de frutose, a partir de alimentos industrializados, tem efeitos significativos sobre a maioria dos componentes da síndrome metabólica.

1.3 FRUTOSE E INSTABILIDADE GENÔMICA

Os estados crônicos de hiperglicemia, hiperlipidemia e hiperinsulinemia ocasionados pelo consumo excessivo de frutose possuem associação com o desenvolvimento de síndrome metabólica, estresse oxidativo (EO) e a oxidação do ácido desoxirribonucleico (DNA) (Azqueta et al., 2009; Ajiboye et al., 2017). Assim, acredita-se que a qualidade do controle glicêmico seja fundamental para prevenir a oxidação do DNA (Nishikawa et al., 2003; Broedbaek et al., 2011).

Todas as células do corpo estão constantemente expostas a agentes genotóxicos que podem provocar danos à molécula de DNA, através de fatores endógenos, como o metabolismo celular e/ou fatores exógenos, incluindo luzes ultravioleta (UV), alimentação, poluição, entre outros (Weeden e Asselin-Labat, 2017). O DNA por ser o principal alvo desses fatores, pode sofrer vários tipos de lesões, sendo as mais comuns, quebras de fita simples e dupla, sítios álcali-lábeis, ligações cruzadas entre DNA-DNA e DNA-proteína. No entanto, os organismos evoluíram de forma eficiente um sistema de reparo contra essas lesões a fim de garantir a integridade genética através de complexos mecanismos que evitam alterações na sequência de bases do DNA (Belli et al., 2002; Fairbairn et al., 1995; Li et al., 2001; Singh, 1988).

De acordo com Setayesh et al. (2018), em uma revisão bibliográfica, demonstraram que há uma relação entre o excesso de gordura corporal e danos ao DNA em múltiplos órgãos, incluindo cérebro, fígado, cólon e testículos em animais. Diferentes mecanismos moleculares podem causar instabilidade genômica em indivíduos com sobrepeso e obesidade, seja por estresse oxidativo e/ou inflamação. A formação de espécies reativas de oxigênio e de peroxidação lipídica foram encontradas em diversos estudos com associação no aumento dos níveis de insulina, ácidos graxos e glicose (Karbownik-Lewinska et al., 2012; Othaman et al., 2014).

Os açúcares como sacarose, glicose e frutose podem apresentar danos similares à molécula de DNA no colón e fígado de ratos. Acredita-se que esses efeitos genotóxicos possam estar associados a alterações ocasionadas por esses açúcares no ambiente microbiológico no colón e no metabolismo hepático mediado pela possível resistência à insulina e estresse oxidativo (Hansen et al. 2007).

Segundo Ajiboye et al. (2015) o alto consumo de frutose pode aumentar níveis séricos de glicose, insulina, colesterol total e triglicérides. Acredita-se que o excesso de frutose pode causar dano proteico e lipídico, mediados por carbonil e malondialdeído (MDA) e logo, dano à molécula de DNA, avaliados através do ensaio cometa (Ajiboye et al. 2017).

A fim de verificar associações provocadas pelo consumo de frutose e dano ao DNA, Castro et al. (2012) avaliaram o consumo de uma dieta com 60% de frutose em ratos Wistar associado ao tratamento com 10% de ômega 3. Neste sentido, observaram que o consumo de frutose provoca danos ao DNA no fígado e

que o tratamento adjunto com ômega 3 apresentou maior lesão hepática e danos ao DNA quando comparados ao grupo que só recebeu frutose, demonstrando que o tratamento com ômega 3 não foi capaz de auxiliar na reversão de danos ocasionados pelo consumo excessivo de frutose, entretanto, o consumo de ômega 3 apresentou melhora na resposta glicêmica dos animais que consumiram frutose.

Hininger-Favier et al. (2009) avaliaram os efeitos de uma dieta rica em frutose (200g/kg) como modelo de resistência à insulina associado ao tratamento com extrato de chá verde (1 a 2g/kg), analisando parâmetros de estresse oxidativo, dano ao DNA e de resistência à insulina. Os pesquisadores observaram diminuição da glicemia, insulinemia e trigliceridemia nos animais que receberam chá verde quando comparados ao grupo que recebeu somente a dieta rica em frutose. Além disso, o grupo que recebeu a dieta rica em frutose apresentou maior peroxidação lipídica e dano oxidativo ao DNA, enquanto que no grupo tratado com chá verde foi observado efeito protetor ao estresse oxidativo ocasionado pela dieta.

Ao relacionar os efeitos dos açúcares na reprodução, os pesquisadores Sariözkan et al. (2012) avaliaram os efeitos protetores da suplementação de rafinose, trealose e frutose na morfologia e integridade do DNA no esperma de ratos que foram refrigerados e armazenados a 4°C. O dano no DNA foi avaliado em 0h e 12h após o resfriamento, sendo que no tempo 0h nenhuma diferença foi encontrada e após 12 horas de armazenamento, todos os três tipos de açúcar levaram a maior motilidade, morfologia normal e sem alterações no DNA em comparação ao grupo controle. Dessa forma, acredita-se que a rafinose, trealose e frutose possam proteger parâmetros funcionais do esperma contra lesões de refrigeração em comparação ao grupo controle, entretanto não se sabe qual o efeito desses açúcares no processo da gestação.

1.4 FRUTOSE E GRAVIDEZ

A ingestão de frutose por mulheres grávidas tem aumentado significativamente. O consumo de frutose durante a gestação pode provocar um estado de hiperglicemia na gestante, podendo estimular o aumento de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente o estresse oxidativo durante a gravidez (Tran et al., 2017). Estudos epidemiológicos, clínicos e pré-clínicos em animais relacionam a ingestão excessiva de açúcares refinados, como frutose, sacarose e

xarope de milho (alta concentração de frutose) durante a gravidez com o aumento do risco de desenvolver obesidade, resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2 na prole durante a vida adulta (Lineker et al., 2016).

O consumo de xarope de milho, alimento rico em frutose, pode provocar alterações nos órgãos reprodutivos. Através de uma análise em ratos pode-se observar alterações histológicas no ovário e útero de fêmeas tratadas com alta concentração de frutose, sendo associado com maior risco de prematuridade e abortos, além de alterações no ciclo estral. Esses achados ainda revelam efeitos adversos do alto consumo de frutose no metabolismo lipídico de ratos fêmeas, observando uma acumulação lipídica corporal e renal nesses animais (Ko et al., 2017).

Os efeitos metabólicos adversos associados à ingestão excessiva de frutose durante a gestação também são observados através de estudos anteriores em ovelhas, onde observou-se que a ingestão de glicose por estes animais provocou uma elevação rápida de glicose, seguida de um aumento prolongado de frutose no feto. Os autores desse trabalho destacam também que a placenta é um dos locais de conversão de glicose em frutose e que a produção de frutose pela placenta pode ser independente da concentração da glicose sanguínea materna ou fetal (Wang et al., 2016).

A ingestão materna de carboidratos pode ser um fator importante na composição corporal fetal, entretanto, a exposição a açúcares individuais durante a gestação e seu efeito na prole não está bem estabelecida. Lineker et al. (2016) avaliaram o efeito de uma alimentação rica em frutose (10%) sobre a fêmea, placenta e o feto até os 6 meses de vida e observaram que os fetos que receberam frutose através da mãe possuíam mais peso, aumento de insulina plasmática e triglicerídeos, sugerindo que o consumo de frutose durante a gestação pode resultar em alterações metabólicas na prole até a idade adulta. De fato, essas alterações podem ser encontradas em diversas faixas etárias e etapas da vida. A gestação é um período que possui diversas alterações metabólicas e fisiológicas necessitando de uma atenção especial, principalmente quando se trata da relação entre alimentação e desenvolvimento fetal (Amoako et al., 2017).

Segundo Cardoso et al. (2016) a exposição de adoçantes como o sorbitol, um poliálcool muito utilizado pela indústria brasileira, durante a gravidez e lactação pode provocar alterações metabólicas e genotóxicas na prole. Os pesquisadores

avaliaram os efeitos da ingestão materna de sorbitol na prole de ratos Wistar, e observaram que este induz alterações na composição corporal de ratos durante a lactação e efeitos genotóxicos no fígado e medula óssea da prole.

Um estudo de coorte prospectivo (Durga et al., 2017), realizado em um hospital no sul da Índia, avaliou parâmetros de estresse oxidativo e genotóxicos em recém-nascidos de mães com hiperglicemia. Eles observaram um aumento no dano lipídico através da dosagem de MDA e dano ao DNA através do ensaio cometa em comparação com as mães normoglicêmicas.

A alta ingestão de frutose tem sido associada ao aumento do risco de síndrome metabólica no adulto, entretanto, um número limitado de estudos exploram os efeitos do consumo de frutose no início da vida. Ao contrário da glicose, que é metabolizada amplamente no corpo, a frutose é convertida em glicose, glicogênio, lactato e gordura principalmente no fígado (Tappy e Lê, 2010). Segundo White et al. (1982) altas concentrações de frutose endógena no útero em porcos está envolvida na síntese de ácidos nucleicos, fornecendo substrato para o crescimento e desenvolvimento fetal, entretanto, ainda são inconclusivos os efeitos de altas concentrações de frutose durante a gestação e o possível desfecho na prole.

Infelizmente, ainda são escassos os trabalhos que relatam se o consumo de frutose durante a gravidez causa danos no DNA da prole. Dessa forma, apesar dos vários estudos em relação ao consumo de frutose na gestação, muitos dos efeitos que ela pode causar sobre o feto ainda não estão bem estabelecidos. Assim, se vê necessário avaliar os efeitos genéticos e bioquímicos do consumo de frutose durante a gravidez e lactação e seu efeito sobre a prole.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar os efeitos genéticos e bioquímicos do consumo de frutose em camundongos Swiss fêmeas tratadas durante a gravidez e lactação e na sua prole.

2.2 Objetivos Específicos:

1. Avaliar parâmetros de genotoxicidade e mutagenicidade nas fêmeas grávidas e puérperas tratadas com frutose durante a gestação e lactação;
2. Quantificar o consumo alimentar, eficiência energética e ganho de peso corporal nas fêmeas grávidas e puérperas tratadas com frutose durante a gestação e lactação;
3. Avaliar a resposta glicêmica nas fêmeas grávidas e puérperas em relação ao consumo de frutose durante a gestação e lactação;
4. Avaliar o perfil lipídico nas fêmeas grávidas e puérperas em relação ao consumo de frutose durante a gestação e lactação;
5. Avaliar parâmetros de genotoxicidade e mutagenicidade na prole de camundongos fêmeas tratadas com frutose durante a gravidez e lactação;
6. Quantificar o consumo alimentar, eficiência energética e ganho de peso corporal na prole de camundongos fêmeas tratadas com frutose durante a gravidez e lactação.
7. Avaliar a glicemia de jejum na prole de camundongos fêmeas tratadas com frutose durante a gestação e lactação;
8. Avaliar o perfil lipídico na prole de camundongos fêmeas tratadas com frutose durante a gravidez e lactação;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), lei Arouca nº 11.794/2008. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense, seguido do protocolo 028/2017-2 (Anexo A). Foram utilizados inicialmente 15 casais de camundongos Swiss de 60 dias de idade, obtidos do Centro de Experimentação Animal da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram alojados em caixas de polietileno, com comida (Dieta padrão; 2,93 kcal/g, 20%, 10% e 70% de calorias fornecidas por proteína, gordura e carboidratos, respectivamente) e água controlada e mantidos em um ciclo de 12 horas claro - escuro (a luz é ligada às 7h da manhã), com temperatura controlada de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Estes animais foram utilizados para se atingir o número amostral total de 60 animais, sendo 30 machos e 30 fêmeas que foram distribuídos em grupos de tratamento conforme segue abaixo.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados inicialmente 15 casais de camundongos Swiss de 60 dias de idade (machos foram mantidos com as fêmeas por 7 dias para procriação). Os casais foram divididos em 3 grupos conforme esquema abaixo e Figura 4:

-Grupo G1- Controle negativo: 5 casais para garantir a prole de 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) que receberam apenas água durante gestação e lactação;

-Grupo G2 – 10% de frutose: 5 casais para garantir a prole de 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) que receberam frutose (10%) durante gestação e lactação;

-Grupo G3 - 20% de frutose: 5 casais para garantir a prole de 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) que receberam frutose (20%) durante gestação e lactação;

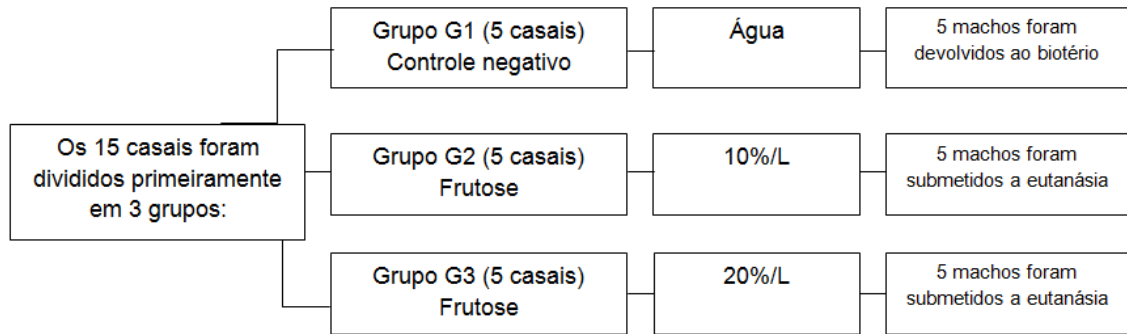


Figura 4. Grupos de casais (G1 a G3).
Fonte: Do Autor.

Após os 7 dias de procriação os machos dos grupos que receberam frutose foram descartados (submetidos a eutanásia), pois a mesma altera parâmetros bioquímicos e não puderam ser utilizados em outros experimentos. Os 6 machos do grupo controle não foram submetidos a eutanásia após a procriação, pois puderam ser usados em outros experimentos.

Estes casais foram utilizados para se atingir o número amostral total de prole de 60 animais necessários (20 animais, sendo 10 machos e 10 fêmeas em cada grupo). Assim, após o desmame das proles os animais foram divididos em 6 grupos com 10 animais cada, como descrito a seguir e demonstrado na Figura 5:

-Grupo P1: Controle negativo, prole de machos cujas mães receberam água durante gestação e lactação;

-Grupo P2: Controle negativo, prole de fêmeas cujas mães receberam água durante gestação e lactação;

-Grupo P3: 10% de frutose, prole de machos cujas mães receberam frutose (10%) durante gestação e lactação;

-Grupo P4: 10% de frutose, prole de fêmeas cujas mães receberam frutose (10%) gestação e lactação;

-Grupo P5: 20% de frutose, prole de machos cujas mães receberam frutose (20%) durante gestação e lactação;

-Grupo P6: 20% de frutose, prole de fêmeas cujas mães receberam frutose (20%) durante gestação e lactação;

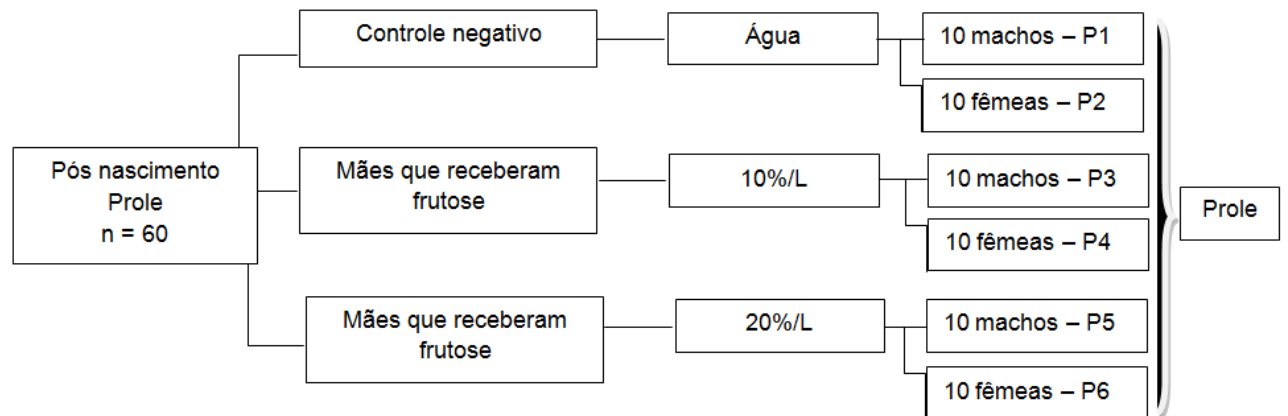


Figura 5. Grupos da prole (P1 a P6).
Fonte: Do Autor.

3.3 TRATAMENTOS

Foram oferecidos água potável ou frutose nas concentrações de 10%/L e 20%/L à vontade às fêmeas (Grupos G1 a G3) nas garrafas de hidratação, durante o período da gestação, que em camundongos dura em média 21 dias, e o período de lactação que tem o mesmo tempo de duração. Estas dosagens foram escolhidas de acordo com dados descritos previamente na literatura (Lineker et al., 2016; Mizuno et al., 2017). A via de administração e o período de tratamento foram escolhidos de modo a manter a relevância da aplicabilidade de estudos em humanos.

3.3.1 Preparo da solução de frutose

A frutose (Sigma Aldrich) foi dissolvida em água potável e foi preparada e trocada três vezes na semana nas concentrações de 10%/L e 20%/L.

3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Após o desmame (21 dias após o nascimento), a prole foi então separada nos 6 grupos experimentais denominados P1 a P6, conforme descrito anteriormente (Figura 5). Estes animais receberam água até os 30 dias de vida, quando então

onde foram submetidos a eutanásia para a realização das avaliações genéticas e bioquímicas (Figura 6).

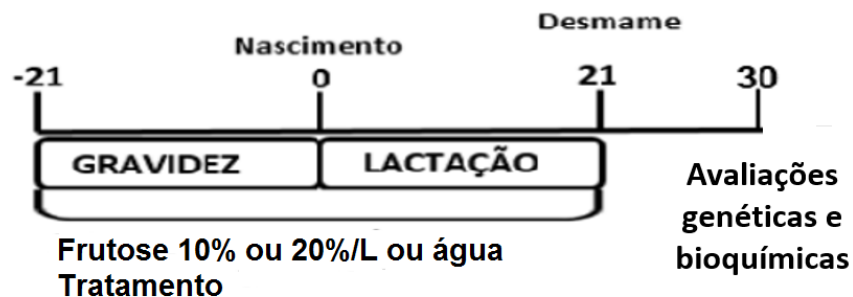


Figura 6. Desenho experimental.
Fonte: Do Autor.

3.5 CONSUMO ALIMENTAR, EFICIÊNCIA ENERGÉTICA E GANHO DE PESO CORPORAL DOS ANIMAIS

Os animais, fêmeas e prole, foram pesados semanalmente ao longo de todo o experimento. O consumo alimentar (comida e solução de frutose) foi calculado semanalmente, pela pesagem da quantidade total de alimentos (g) e líquidos (mL) fornecida aos animais e subtraindo a comida (g) e líquidos (mL) do remanescente na gaiola e garrafa de hidratação durante todo o experimento. Com base na ingestão de alimentos e na quantidade correspondente de energia os seguintes parâmetros foram calculados: Consumo total energético (kcal/dia) = média do consumo alimentar/calorias da dieta por dia e Eficiência energética (g/kcal) = média do ganho de peso corporal/média do consumo energético (Diniz et al., 2004; Diniz et al., 2005).

3.6 AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE NAS FÊMEAS GESTANTES

Com o intuito de avaliar se o consumo de frutose afeta a estabilidade genômica das fêmeas durante a gestação foram feitas análises de genotoxicidade nestes animais nos seguintes momentos:

- antes das mesmas serem unidas aos machos para a procriação;
- no 15º dia após a concepção (antes do nascimento dos filhotes);

- 21 dias após o nascimento da prole (data do desmame).

Nos dois primeiros momentos houve somente a coleta de sangue por uma pequena incisão na ponta da cauda destes animais, sem necessidade de eutanásia. Após a incisão, as mesmas receberam antisséptico local para a cicatrização do corte. Este material foi utilizado para a realização do Ensaio Cometa e análises bioquímicas. Na data do desmame, quando a prole foi dividida nos grupos P1 a P6, as fêmeas passaram por nova coleta de sangue para a realização do Ensaio Cometa. Após essa coleta as mesmas foram mortas por decapitação e a medula óssea retirada para a realização do teste de Micronúcleos.

Após o término dos experimentos a carcaça foi conservada no freezer da UNESC, armazenadas no saco leitoso que foram coletadas e transportadas por empresa terceirizada. Os resíduos foram tratados fisicamente e posteriormente encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Todos os procedimentos são conforme RDC nº 306/2004 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da UNESC, protocolo 028/2017-2 (Anexo A).

3.7 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE

Os ensaios de genotoxicidade foram realizados nas fêmeas conforme descrito anteriormente e na prole após atingir os 30 dias de vida. Os animais foram submetidos a eutanásia por decapitação para a realização dos ensaios genéticos e bioquímicos. Para realização dos testes de genotoxicidade, foram utilizadas as seguintes estruturas biológicas: sangue periférico, fígado e rim para o Ensaio Cometa e medula óssea para o Teste do Micronúcleo.

3.7.1 Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi realizado sob condições alcalinas, conforme descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações sugeridas por Tice et al. (2000). O sangue foi coletado e colocado em microtubos heparinizados e refrigerados, e as amostras de fígado e rim, foram dissecadas e imersas em tampão fosfato (PBS) refrigerado. Em seguida elas foram individualmente homogeneizadas com o auxílio de uma seringa, através do movimento de vai e vem, a fim de obter uma suspensão celular.

As células do sangue (alíquotas de 5 µL) e as células obtidas da dissociação de tecidos (alíquotas de 25 µL) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0.75%, w/v, 95 µL ou 75 µL, respectivamente) e a mistura foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), cobrindo posteriormente com uma lamínula e levando, então, à geladeira por aproximadamente 5 minutos a 4°C para solidificação. Logo após, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 1 semana.

Para avaliação de dano oxidativo, foi realizado o método alcalino (Sigh et al., 1988; Tice et al., 2000), com alguns ajustes (Collins, 2014). Após o período de incubação na lise, as lâminas foram incubadas, e colocadas em contato com 60 µL da solução da enzima Formamidopirimidina DNA-glicosilase (FPG) e/ou tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1mM, pH>13) por 20 min para que ocorra o desenovelamento do DNA. Após este procedimento as lâminas foram submetidas à corrente elétrica seguindo os procedimentos normais do ensaio cometa versão alcalina.

As lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos para o desenovelamento do DNA, a corrida eletroforética, foi realizada no mesmo tampão nas seguintes condições: a 25v e 300mA por 15 minutos. Todas estas etapas foram realizadas sob luz indireta fraca amarela. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA será corado Syber Gold (Invitrogen, EUA) para posterior análise.

Foi realizada avaliação de 100 células por indivíduo e por tecido (50 células em cada lâmina duplicada). Tais células foram avaliadas visualmente, sendo classificadas em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda, sendo a classificação para ausência de cauda considerada 0, até 4 para o comprimento máximo de cauda (Collins et al., 1997). Desta forma, tem-se um Índice de Danos (ID) para cada animal variando de zero ($100 \times 0 = 0$; 100 células observadas completamente sem danos) a 400 ($100 \times 4 = 400$; 100 células observadas com dano máximo).

As diretrizes internacionais e recomendações para o ensaio do cometa consideram que o escore visual de 100 cometas é um método de avaliação bem

validado. Ele tem uma alta correlação com a análise de imagem por computador (Collins et al., 1997).

Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas.

3.7.2 Teste de Micronúcleos (MN)

O teste de micronúcleos foi realizado de acordo com o programa Gene-Tox da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (Mavournin et al., 1990; Krishna e Hayashi, 2000).

Após a extração da medula óssea, um esfregaço foi preparado diretamente na lâmina com uma gota de soro bovino fetal. As lâminas foram coradas com Giemsa 5%, secas e codificadas para análises às cegas.

Como uma medida de toxicidade na medula óssea, a relação entre eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC) foi analisada em 200 eritrócitos/animal.

A incidência de micronúcleos (MN) foi observada em 2000 EPCs e ENCs para cada animal (ou seja, 1000 a partir de cada uma das duas lâminas preparadas em duplicata), usando microscópio óptico de luz branca com ampliação de 1000x. O número médio de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMn) individual foi utilizado como unidade experimental.

3.8 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

3.8.1 Teste de tolerância à glicose (GTT)

O alimento foi retirado seis horas antes do teste e a primeira coleta de sangue equivaleram ao tempo zero do teste, utilizado para glicemia de jejum. Em seguida, foi administrado uma solução 20% de glicose (1,0 mg/g de peso corpóreo) via intraperitonealmente e amostras do sangue foram coletadas pela cauda nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos, para a determinação da glicose sérica através de glicosímetro. A velocidade constante do decaimento da glicose (Kitt) foi calculada

usando a fórmula $0,693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado a partir da curva da análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose sérica durante a fase de decaimento linear. Esse teste foi realizado para comprovação da instalação da tolerância a glicose em camundongos (Wajchenberg et al., 1999).

3.8.2 Perfil lipídico

As concentrações séricas de colesterol total, lipoproteína de alta intensidade (HDL) e triglicerídeos foram avaliadas no período de pré-cópula, gestação e lactação e na prole após atingir os 30 dias de vida. Os testes foram realizados através de Kits (Dialab). Para realização da técnica utiliza-se soro ou plasma com EDTA. A partir dos valores obtidos pelas absorvâncias pelo espectrofotômetro foi calculado o perfil lipídico através do cálculo: absorvância do teste/absorvância padrão x 200.

Utilizando-se dos valores de TG e HDL, calculou-se também a razão TG/HDL, pela fórmula: TG, mg/dL / HDL, mg/dL, também denominada Índice de Castelli I.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média e desvio padrão da média (média \pm DP). Analisou-se as variáveis quanto à normalidade da distribuição utilizando o teste de Bartlett's. Para amostras não paramétricas foram utilizadas Kruskal-Wallis seguido do *post hoc* de Dunn's e para amostras paramétricas foi utilizado a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido de *post hoc* de Tukey.

Na avaliação das fêmeas que receberam frutose na gestação e lactação, o controle de líquidos, perfil lipídico e glicêmico foi realizado por ANOVA, seguido de *post hoc* de Tukey e para o controle alimentar, peso corporal, eficiência energética e consumo total energético foi utilizado o Teste *t*-student devido a comparação gestação e lactação. Para o Ensaio Cometa em sangue total utilizou-se ANOVA de duas vias devido aos diferentes tratamentos e períodos comparados (pré-cópula, gestação e lactação), seguido de *post hoc* de Bonferroni e para os tecidos periféricos foram utilizados ANOVA de uma via, com *post hoc* de Tukey.

Na avaliação da prole, o controle alimentar e perfil lipídico foram realizados através do teste de Kruskal-Wallis, seguido do *post hoc* de Dunn's. Para a curva de peso corporal, eficiência energética, glicemia de jejum e Ensaio Cometa foram utilizados ANOVA de uma vida, com *post hoc* de Tukey.

Considerou-se para significância estatística os valores de $p < 0,05$. O pacote estatístico utilizado foi o programa Graph Pad Prism versão 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 FÊMEAS GESTANTES E LACTANTES

4.1.1 Avaliação do consumo alimentar, peso corporal, eficiência energética e consumo total energético nas fêmeas gestantes e lactantes

4.1.1.1 Ingestão de líquidos, ração animal e peso corporal

Durante a cópula, gestação e lactação foram medidas as quantidades de líquidos ingeridas pelas fêmeas. A tabela 1 mostra a ingestão média de água ou frutose por grupo durante os três períodos.

Tabela 1. Ingestão de água ou frutose (10%/L; 20%/L) em mL, por camundongos Swiss fêmeas, medida a cada 2 dias durante a cópula, gestação e lactação.

	Controle (Água) (mL)	Frutose 10%/L (mL)	Frutose 20%/L (mL)
Cópula	6,9 ± 1,1	9,8 ± 2,4*	9,6 ± 1,6*
Gestação	13,5 ± 2,7 ^{a,c}	13,6 ± 3,4	13,8 ± 3,3 ^a
Lactação	18,8 ± 6,8	21,2 ± 8,0 ^a	23,8 ± 8,6 ^{*,a,b}

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média do volume de líquido ingerido por dia de troca (n=5 animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo controle (água) no mesmo período $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey). ^aDiferença significativa em relação ao período de cópula $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey). ^bDiferença significativa em relação ao período de gestação $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey). ^cDiferença significativa em relação ao período de lactação $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey).

Fonte: Do Autor

Os resultados demonstram que houve uma diferença significativa entre a ingestão de água em camundongos no período da cópula e gestação em comparação com estes no período da lactação, ou seja, no período de lactação o grupo controle ingeriu mais líquidos quando comparado aos outros períodos ($p < 0,05$). No grupo frutose 10%/L, o consumo de líquidos foi menor no período cópula quando comparado com o período de lactação no mesmo grupo e maior que o mesmo período do grupo controle ($p < 0,05$). Além disso, o grupo frutose 20%/L, apresentou comportamento semelhante ao frutose 10%/L, ou seja, um aumento

significativo entre a ingestão de frutose no período da gestação e lactação em comparação com o período da cópula ($p < 0,05$).

Em relação ao consumo de frutose, houve um aumento significativo na ingestão de líquidos no período de cópula em ambos os grupos (10%/L e 20%/L), quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). O grupo frutose 20%/L, apresentou um aumento significativo na ingestão de líquido no período da lactação quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Não houve diferença em relação aos grupos das duas doses de frutose.

Durante a gestação e lactação foram pesadas as quantidades de ração animal ingerida, a fim de verificar o consumo alimentar no período da gestação e lactação. Dessa forma, a tabela 2 mostra a ingestão média de comida do grupo que ingeriu somente água e dos grupos que ingeriram as duas doses de frutose.

Tabela 2. Ingestão de ração animal em g, por camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L), medida a cada 7 dias durante a gestação e lactação.

	Controle (água) (g)	Frutose 10%/L (g)	Frutose 20%/L (g)
Gestação	4,5 ± 1,1	9,3 ± 1,5*	8,3 ± 2,1*
Lactação	8,7 ± 4,0 [#]	14,2 ± 3,1*	14,0 ± 2,2*

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média do consumo de comida ingerido por dia de troca (n=5 animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo controle (água) no mesmo período $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey). [#]Diferença significativa em relação ao período de gestação $p < 0,05$ (Teste *t*-student).

Fonte: Do Autor

Os resultados demonstram que houve uma diferença significativa entre os grupos frutose 10% e 20% no período de gestação e lactação quando comparado com o grupo controle, mostrando que os animais consumiram mais alimentos quando recebiam frutose ($p < 0,05$). Podemos observar também, um aumento no consumo alimentar no grupo controle no período de lactação quando comparado ao período de gestação ($p < 0,05$).

Durante o período de gestação e lactação as fêmeas foram pesadas a fim de quantificar o peso corporal nesses períodos. A tabela 3, mostra a média do peso corporal do grupo que ingeriu somente água e dos grupos que ingeriram as duas doses de frutose.

Tabela 3. Peso corporal em g, por camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L), medida no 14º dia de gestação e no 21º lactação.

	Controle (água) (g)	Frutose 10%/L (g)	Frutose 20%/L (g)
Gestação	42,2 ± 3,7	51,0 ± 3,3*	50,8 ± 3,8*
Lactação	38,4 ± 4,0	40,0 ± 3,0 [#]	42,9 ± 3,3 [#]

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média do peso corporal nos diferentes períodos (n=5 animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo controle (água) no mesmo período p<0,05 (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey). [#]Diferença significativa em relação ao período de gestação p<0,05 (Teste *t*-student).

Fonte: Do Autor

Observou-se um aumento significativo no peso corporal nos grupos que receberam as duas doses de frutose quando comparadas ao grupo controle no período de gestação (p< 0,05). No período de lactação houve um aumento significativo no peso no grupo frutose 20% em relação ao grupo controle (p< 0,05).

Além disso, observamos diferença significativa em relação ao período da gestação nas duas doses de frutose, onde na lactação houve uma perda de peso comparadas a gestação (p< 0,05).

4.1.1.2 Eficiência energética e consumo total energético

Através da média do ganho de peso corporal (g) e do consumo energético (kcal), foi calculada a eficiência energética (g/kcal) no período de gestação e lactação. A tabela 4, mostra a média da eficiência energética no grupo que ingeriu somente água e nos grupos que ingeriram as duas doses de frutose.

Tabela 4. Eficiência energética (g/kcal) de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L), medida no 14º dia de gestação e 21º lactação.

	Controle (água) (g/kcal)	Frutose 10%/L (g/kcal)	Frutose 20%/L (g/kcal)
Gestação	1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,3	1,9 ± 0,2
Lactação	0,7 ± 0,3 [#]	1,1 ± 0,4*	1,0 ± 0,3 [#]

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média do consumo de comida ingerido por dia de troca (n=5 animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo controle (água) no mesmo período p<0,05 (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey). [#]Diferença significativa em relação ao período de gestação p<0,05 (Teste *t*-student).

Fonte: Do Autor

Os resultados demonstram uma diminuição da eficiência energética no grupo controle no período da lactação quando comparado ao período de gestação

($p < 0,05$). Na dose de frutose 10%, houve um aumento significativo na eficiência energética no período da lactação quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Enquanto que, na dose de 20%, observamos diferença significativa em relação ao período da gestação, mostrando uma diminuição da sua eficiência energética no período da lactação ($p < 0,05$).

Através da média do consumo alimentar e as calorias da dieta por dia, foi calculado o consumo total energético (kcal/dia) no período de gestação e lactação. A tabela 5, mostra a média do consumo total energético no grupo que ingeriu somente água e dos grupos que ingeriram as diferentes doses de frutose.

Tabela 5. Consumo total energético (g/kcal) de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L), medida no 14^o dia de gestação e 21^o lactação.

	Controle (água) (g/kcal)	Frutose 10%/L (g/kcal)	Frutose 20%/L (g/kcal)
Gestação	21,6 ± 5,6	34,7 ± 8,1*	32,2 ± 8,1
Lactação	40,5 ± 21,1	57,1 ± 12,6*#	54,0 ± 12,5#

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média do consumo de comida ingerido por dia de troca (n=5 animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo água no mesmo período $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey). #Diferença significativa em relação ao período de gestação $p < 0,05$ (Teste *t*-student).

Fonte: Do Autor

Observou-se um aumento significativo no consumo total energético no grupo frutose 10% quando comparado ao grupo controle no período da gestação e lactação ($p < 0,05$). No grupo frutose 20%, houve uma diferença significativa no período da lactação em relação ao período da gestação, sendo demonstrado pelo aumento da demanda energética ($p < 0,05$). O grupo controle não apresentou diferença significativa nos diferentes períodos.

4.1.3 Avaliação do perfil lipídico nas fêmeas gestantes e lactantes

Durante o período de gestação e lactação foram realizadas avaliações do perfil lipídico: colesterol total, triglicerídeos (TG), lipoproteína de alta intensidade (HDL) e a relação TG/HDL das fêmeas. A tabela 6, mostra a média do colesterol total de camundongos fêmeas que ingeriram somente água e dos grupos que ingeriram as duas doses de frutose.

Tabela 6. Colesterol total (mg/dL) de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L), medidas durante a pré-cópula, gestação e lactação.

	Controle (água) (mg/dL)	Frutose 10%/L (mg/dL)	Frutose 20%/L (mg/dL)
Pré-Cópula	99,4 ± 12,0	94,5 ± 5,7	99,0 ± 13,8
Gestação	70,5 ± 22,4	73,7 ± 20,9	99,0 ± 15,4
Lactação	229,0 ± 52,9 ^{a,b}	206,4 ± 33,2 ^{a,b}	199,2 ± 38,3 ^{a,b}

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média do colesterol total nos diferentes períodos (n=5 animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo controle (água) no mesmo período $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc de Tukey*). ^aDiferença significativa em relação ao período de pré-cópula $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc de Tukey*). ^bDiferença significativa em relação ao período de gestação $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc de Tukey*).

Fonte: Do Autor

Nossos resultados demonstram um aumento significativo nos níveis de colesterol total no período da lactação em ambos os grupos que ingeriram frutose e também água, em comparação ao período de pré-cópula e gestação ($p < 0,05$). No entanto, não houve diferença significativa entre o grupo controle e os grupos frutose.

A tabela 7 mostra a média do HDL de camundongos fêmeas que ingeriram somente água e dos grupos que ingeriram frutose.

Tabela 7. HDL (mg/dL) de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L;20%/L), medidas durante a pré-cópula, gestação e lactação.

	Controle (água) (mg/dL)	Frutose 10%/L (mg/dL)	Frutose 20%/L (mg/dL)
Pré-Cópula	54,6 ± 5,1	51,6 ± 4,2	53,0 ± 3,9
Gestação	46,0 ± 11,4	41,4 ± 11,4	51,6 ± 5,1
Lactação	94,0 ± 5,8 ^{a,b}	88,0 ± 8,9 ^{a,b}	80,6 ± 2,6 ^{a,b,*}

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média do HDL nos diferentes períodos (n=5 animais por grupo). HDL: Lipoproteína de alta intensidade.*Diferença significativa em relação ao grupo controle (água) no mesmo período $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc de Tukey*). ^aDiferença significativa em relação ao período de pré-cópula $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc de Tukey*). ^bDiferença significativa em relação ao período de gestação $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc de Tukey*).

Fonte: Do Autor

Observou-se um aumento significativo nos níveis de HDL no período da lactação, em ambos os grupos (controle e frutose 10%/L; 20%/L), em comparação ao período de pré-cópula e gestação ($p < 0,05$). Além disso, houve uma diminuição significativa nos níveis de HDL em relação ao controle no grupo frutose 20% ($p < 0,05$).

A tabela 8, mostra a média do TG de camundongos fêmeas do grupo controle, frutose 10% e frutose 20%.

Tabela 8. Triglicerídeos (mg/dL) de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L), medidas durante a pré-cópula, gestação e lactação.

	Controle (água) (mg/dL)	Frutose 10%/L (mg/dL)	Frutose 20%/L (mg/dL)
Pré-Cópula	61,1 ± 10,7	62,8 ± 14,8	63,1 ± 15,4
Gestação	116,0 ± 36,8 ^{a,b}	183,8 ± 44,8 ^{*a}	177,5 ± 23,3 ^{a,b}
Lactação	65,0 ± 20,0	108,7 ± 41 ^a	117,8 ± 10,5 ^{*a}

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média do triglicerídeos nos diferentes períodos (n=5 animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo controle (água) no mesmo período $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey). ^aDiferença significativa em relação ao período de pré-cópula $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey). ^bDiferença significativa em relação ao período de lactação $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey).

Fonte: Do Autor

Os resultados demonstram um aumento significativo nos níveis de TG no período de gestação, em todos os grupos, em comparação ao período de pré-cópula ($p < 0,05$). Além disso, o grupo frutose 10% mostrou aumento significativo no período da gestação em relação ao mesmo período no grupo controle ($p < 0,05$), no entanto, o mesmo não se manteve no período de lactação ($p > 0,05$). Na dose de frutose 20%, foi observado um aumento significativo nos níveis de TG no período da gestação em relação ao período de pré-cópula e lactação do mesmo grupo ($p < 0,05$). No período de lactação, foi observada uma diferença significativa no grupo frutose 20% em relação ao grupo controle, havendo um aumento nos níveis de TG nas fêmeas ($p < 0,05$). Além disso, observou-se um aumento significativo de TG na lactação em relação ao período da pré-cópula, nos grupos que receberam frutose (10 e 20%/L) ($p < 0,05$).

A tabela 9, mostra a razão de TG/HDL nos diferentes grupos e períodos.

Tabela 9. Razão de Triglicerídeos/HDL em mg/dL de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L), medidas durante a pré-cópula, gestação e lactação.

	Controle (água) (mg/dL)	Frutose 10%/L (mg/dL)	Frutose 20%/L (mg/dL)
Pré-Cópula	1,1 ± 0,3	1,2 ± 14,8	1,2 ± 0,3
Gestação	2,2 ± 0,9 ^{a,c}	3,7 ± 44,8 ^{*,a,c}	3,5 ± 0,4 ^{*,a,c}
Lactação	0,7 ± 1,8	1,0 ± 0,5	1,9 ± 0,9

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média da razão nos diferentes períodos (n=5 animais por grupo). HDL: Lipoproteína de alta intensidade *Diferença significativa em relação ao grupo controle (água) no mesmo período $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey). ^aDiferença significativa em relação ao período de pré-cópula $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey). ^bDiferença significativa em relação ao período de gestação $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Dunnett's). ^cDiferença significativa em relação ao período de lactação $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis com *post hoc* Dunn's).

Fonte: Do Autor

Ao analisar a relação do perfil lipídico, foi observado um aumento significativo no período da gestação, em todos os grupos, quando comparados ao período da pré-cópula e lactação ($p < 0,05$). Além disso, em ambas as doses de frutose analisadas (10% e 20%) foi observado um aumento nos valores do índice de Castelli durante o período da gestação quando comparados estatisticamente ao grupo controle ($p < 0,05$).

4.1.4 Avaliação da resposta glicêmica nas fêmeas gestantes e lactantes

A fim de avaliar os parâmetros glicêmicos durante o período de tratamento, realizou-se análise da glicemia de jejum (tabela 10) e o teste de tolerância a glicose (GTT) durante o período da gestação (Figuras 7 e 8).

Tabela 10. Glicemia de jejum (mg/dL) de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L;20%/L), medidas durante a pré-cópula, gestação e lactação.

	Controle (água) (mg/dL)	Frutose 10%/L (mg/dL)	Frutose 20%/L (mg/dL)
Pré-Cópula	94,2 ± 5,7	94,2 ± 5,7	92,0 ± 4,3
Gestação	102,4 ± 8,4	113,8 ± 18,3	129,0 ± 16,4 ^{*a}
Lactação	119,6 ± 14,7 ^a	123,2 ± 19,1	121,3 ± 8,0

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média da glicemia de jejum nos diferentes períodos (n=5 animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo controle (água) no mesmo período $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey). ^aDiferença significativa em relação ao período de pré-cópula $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey).

Fonte: Do Autor

Os resultados mostram que houve um aumento na glicemia de jejum no grupo controle no período de lactação em comparação ao período da pré-cópula ($p < 0,05$). No grupo frutose 20%, observou-se um aumento na glicemia de jejum no período da gestação em relação ao grupo controle e ao período da pré-cópula no mesmo grupo ($p < 0,05$). Já no grupo frutose 10%, não foram encontradas diferenças significativas.

As figuras 7 e 8, demonstram o teste de tolerância à glicose no período da gestação. Neste contexto, não houve diferença significativa na resposta glicêmica na gestação nos diferentes tratamentos, demonstrando uma metabolização adequada de glicose em ambos os grupos.

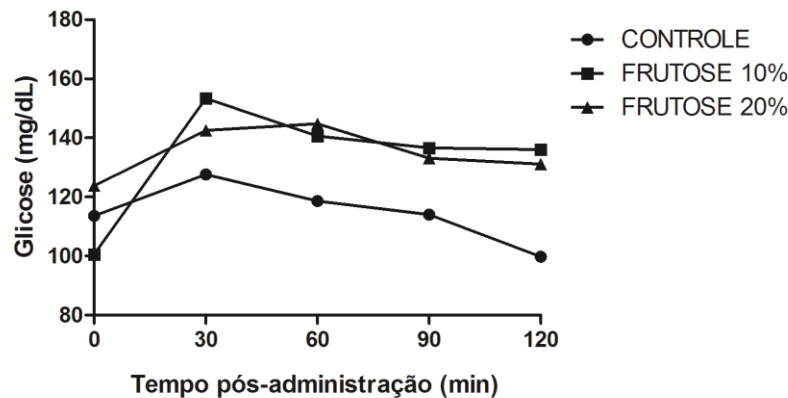


Figura 7. Teste oral de tolerância à glicose (OGTT) em camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L). Medida foi realizada durante a gestação em função do tempo. ($n = 5$ animais por grupo). Dados estatisticamente não significativos. Fonte: Do Autor

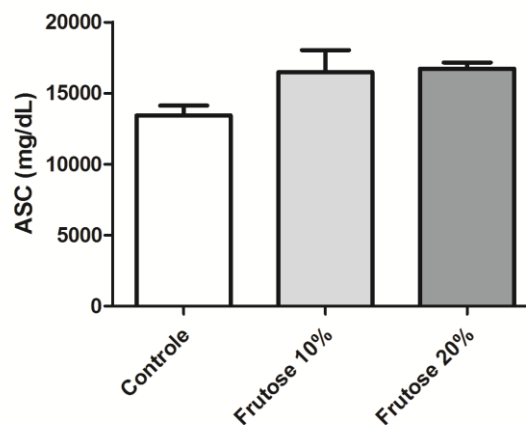


Figura 8. Área sob a curva (ASC) do Teste de tolerância a glicose em camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L), realizada durante a gestação em função do tempo. ($n=5$ animais por grupo). Dados estatisticamente não significativos. Fonte: Do Autor

4.1.5 Ensaio Cometa das fêmeas gestantes e lactantes

Neste trabalho foram analisados os danos no DNA em tecidos periféricos de camundongos fêmeas que ingeriram água ou frutose (10%/L; 20%/L) durante a gestação e lactação. Foram avaliadas células de sangue periférico total (Figura 9), através do ensaio cometa alcalino e oxidativo, por meio do parâmetro de índice de danos (0-400).

Na figura 9, observamos a avaliação do índice de danos de sangue periférico no período de pré-cópula, gestação e lactação.

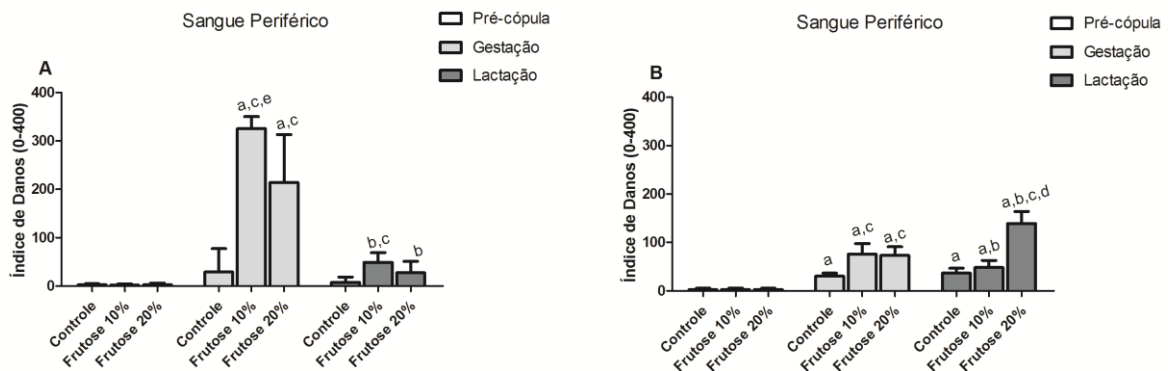


Figura 9. Índice de danos no DNA em células de sangue periférico de camundongos Swiss fêmeas, suplementados ou não com frutose (10%/L; 20%/L) durante o período de gestação e lactação. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n= 5 animais por grupo). A: Ensaio Cometa Alcalino. B: Ensaio Cometa Oxidativo. ^aDiferença significativa em relação ao mesmo tratamento na pré-cópula, $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias seguido pelo *post hoc* de Bonferroni). ^bDiferença significativa em relação ao mesmo tratamento no período da gestação, $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias seguido pelo *post hoc* de Bonferroni). ^cDiferença significativa em relação ao controle no mesmo período de suplementação, $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias seguido pelo *post hoc* de Bonferroni). ^dDiferença significativa em relação ao grupo suplementado com frutose 10%/L no mesmo período de suplementação, $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias seguido pelo *post hoc* de Bonferroni). ^eDiferença significativa em relação ao grupo suplementado com frutose 20%/L no mesmo período de suplementação, $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias seguido pelo *post hoc* de Bonferroni).

Fonte: Do Autor

Quando avaliado o ensaio cometa alcalino (Figura 9A), podemos observar que não houve diferença significativa em todos os grupos no período da pré-cópula, demonstrando que todos os animais antes de iniciarem o tratamento possuíam níveis de dano no DNA muito baixos, compatíveis com animais saudáveis. Da mesma forma, não houve diferença significativa no grupo controle entre os períodos de gestação e lactação.

Quando avaliamos o período da gestação, pode-se observar um aumento no índice de dano no DNA nos grupos frutose 10 e 20% quando comparado ao

mesmo tratamento no período de pré-cópula ($p < 0,05$) e ao grupo controle ($p < 0,05$). Além disso, houve um aumento significativo no grupo frutose 10% quando comparado à frutose 20% neste mesmo período ($p < 0,05$).

Já no período da lactação, pode-se observar um aumento significativo de danos no DNA no grupo frutose 10% quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Entretanto, quando comparado à gestação foi observado uma diminuição significativa nos grupos frutose 10 e 20%.

Na avaliação do ensaio cometa oxidativo (Figura 9B), nossos resultados não apresentaram diferença significativa em ambos os grupos que receberam frutose no período de pré-cópula com o grupo controle. Apesar disso, durante o período da gestação e lactação foi observado um aumento significativo no ID quando comparado ao período de pré-cópula em ambos os grupos frutose ($p < 0,05$). Estes grupos apresentaram um aumento significativo de dano ao DNA no período da gestação quando comparado ao grupo controle.

Na lactação, o grupo frutose 10% mostrou uma diferença significativa em relação ao período da gestação, sendo observado uma diminuição no dano ao DNA ($p < 0,05$). Já o grupo frutose 20%, aumentou significativamente estes danos quando comparado ao grupo controle e frutose 10% durante a lactação e ao mesmo tratamento no período da gestação ($p < 0,05$).

Também foram avaliados os danos no DNA em células de fígado e rim das fêmeas após o período da lactação através do ensaio cometa alcalino, por meio do parâmetro de índice de danos (Figura 10). No fígado, os resultados demonstraram um aumento significativo no parâmetro avaliado, quando comparado o grupo controle à frutose 10 e 20% ($p < 0,05$) (Figura 10). No entanto, no tecido renal não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes grupos.

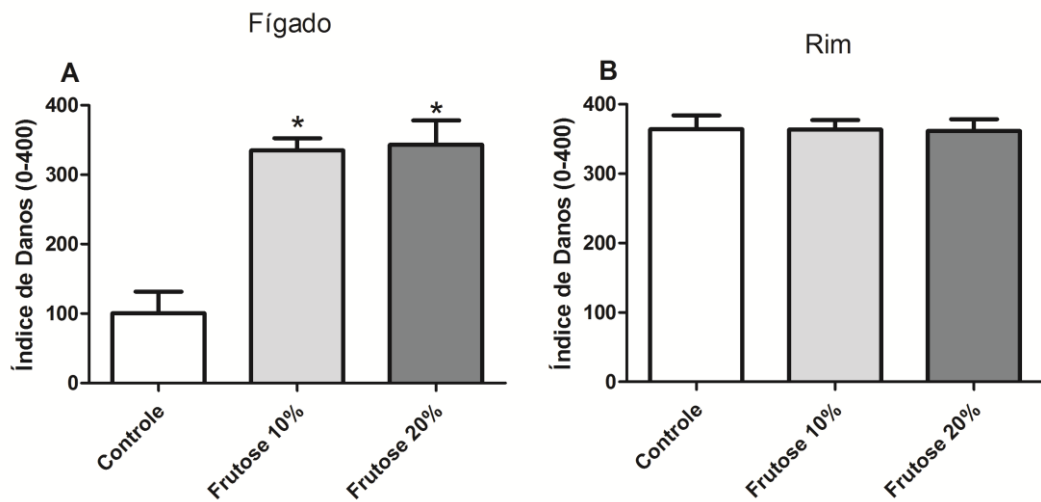


Figura 10. Índice de danos no DNA em células de tecidos periféricos de camundongos Swiss fêmeas, suplementados ou não com frutose (10%/L; 20%/L) após o período da lactação. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n= 5 animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao controle no mesmo período, $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey).

Fonte: Do Autor

4.1.6 Teste de Micronúcleos nas fêmeas após o desmame

A tabela 11, apresenta os resultados do teste de micronúcleos, que avaliou se o consumo de frutose durante a gravidez e lactação provoca efeitos mutagênicos nas células de medula óssea das fêmeas.

Tabela 11. Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMn) observados nas amostras de medula óssea de camundongos Swiss fêmeas tratadas com frutose durante a gravidez e lactação.

Tratamento	EPCMn	ENCMn	EPC/ENC
Controle	2,2 \pm 0,9	0,6 \pm 0,5	1,1 \pm 0,1
Frutose 10%/L	6,3 \pm 1,1*	0,8 \pm 0,4	1,2 \pm 0,1
Frutose 20%/L	3,3 \pm 2,3	1,6 \pm 1,1	1,2 \pm 0,1

Foram analisadas 2000 células por amostra e estão demonstradas na tabela como média \pm desvio padrão da média (n= 6 animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey).

Fonte: Do Autor

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas de micronúcleos em EPC nas fêmeas tratadas com frutose 10% durante a gravidez e

lactação em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças significativas em ENCMn.

Em relação a proporção de EPC/ENC (Tabela 11), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, demonstrando que a produção de eritrócitos está ocorrendo normalmente na medula óssea, sem indícios de citotoxicidade.

4.2 AVALIAÇÃO DA PROLE (MACHOS E FÊMEAS)

4.2.1 Avaliação do consumo alimentar, curva de peso corporal, eficiência energética e consumo total energético da prole cujas mães receberam frutose durante a gestação e lactação

Após o nascimento da prole, que receberam água ou frutose durante a gestação e lactação, os machos e fêmeas passaram pela quantificação de parâmetros do consumo alimentar e ganho de peso até atingir os 30 dias de vida.

4.2.1.2 Consumo alimentar

Até atingir os 30 dias de vida da prole, foram pesadas as quantidades de ração animal ingerida por estes animais (já sem as mães desde os 21 dias de vida), a fim de verificar o consumo alimentar. A tabela 12 mostra a ingestão média de ração do grupo que ingeriu somente água e dos grupos cujas mães ingeriram as diferentes doses de frutose durante a gestação e lactação.

Tabela 12. Ingestão de ração animal em g, pela prole de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L) durante a gestação e lactação. A ingestão foi avaliada no período de 7 dias.

	Controle (água) (g)	Frutose 10%/L (g)	Frutose 20%/L (g)
Fêmeas	4,0 ± 0,2	5,0 ± 0,2*	4,7 ± 0,2
Machos	4,1 ± 0,3	5,3 ± 0,2*	4,5 ± 0,1

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média do consumo de ração ingerido por dia de troca (n=8 animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo controle (água) $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido do *post hoc* de Dunn's).

Fonte: Do Autor

Ao avaliar o consumo alimentar das fêmeas e dos machos, pode-se observar um aumento significativo no grupo frutose 10%, quando comparadas ao grupo água em ambos os sexos ($p < 0,05$).

4.2.1.3 Curva de peso corporal

A fim de avaliar o ganho de peso no decorrer dos dias, a prole foi pesada aos 7, 14, 21 e 30 dias de vida. A figura 11, mostra a curva de peso corporal das fêmeas cujas mães receberam água ou frutose durante a gestação e lactação.

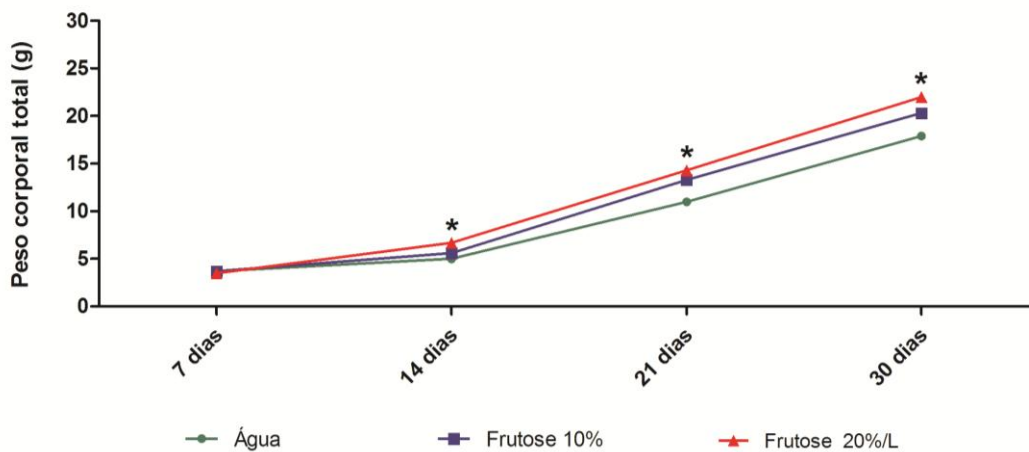


Figura 11. Curva de peso corporal (g) de fêmeas da prole de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L) durante a gestação e lactação. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão da média do peso dos animais em diferentes dias do desenvolvimento até completarem 30 dias ($n=8$ animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo água $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey).

Fonte: Do Autor

Nossos resultados demonstram que após o nascimento, aos 7 dias de vida, não havia diferença estatisticamente significativa entre os grupos. No entanto, houve aumento significativo no ganho de peso corporal no grupo frutose 20%, quando comparado ao grupo controle nas idades 14, 21 e 30 dias de vida ($p < 0,05$).

Em relação aos filhotes machos cujas mães que receberam água ou frutose durante a gestação e lactação, a figura 12 mostra a curva de peso corporal até os 30 dias de vida.

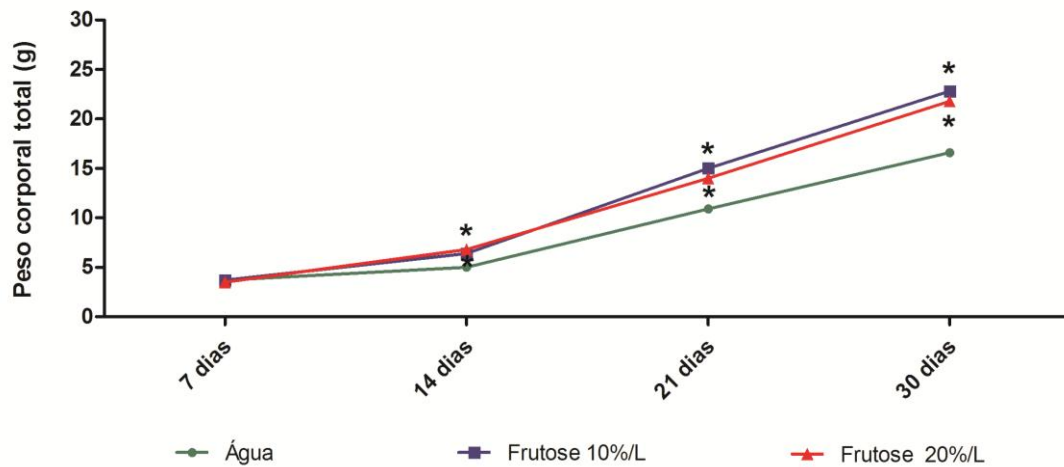


Figura 12. Curva de peso corporal (g) de machos da prole de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L) durante a gestação e lactação. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão da média do peso dos animais durante o desenvolvimento até completarem 30 dias (n=8 animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo água $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey).
Fonte: Do Autor

Assim como as fêmeas, ao nascerem os machos não apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo controle. Entretanto, foi observado um aumento no peso corporal no decorrer da vida nos grupos que receberam frutose 10 e 20% quando comparados ao grupo controle, nas idades 14, 21 e 30 dias de vida ($p < 0,05$).

4.2.1.4 Eficiência energética

Através da média do ganho de peso corporal (g) e do consumo energético (kcal) foi calculada a eficiência energética (g/kcal) da prole cujas mães receberam frutose durante a gestação e lactação. A tabela 13, mostra a média da eficiência energética no grupo que recebeu somente água e dos grupos que receberam as duas doses de frutose.

Tabela 13. Eficiência energética (g/kcal) da prole de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L) durante a gestação e lactação.

	Controle (água) (g/kcal)	Frutose 10%/L (g/kcal)	Frutose 20%/L (g/kcal)
Fêmeas	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1* [#]
Machos	0,9 ± 0,3	1,1 ± 0,0	1,2 ± 0,2*

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média do consumo de comida ingerido por dia de troca (n=8 animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo controle (água) p<0,05 (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey). [#]Diferença significativa em relação ao grupo frutose 10%/L p<0,05 (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey).

Fonte: Do Autor

Não foi encontrada diferença significativa nas proles fêmeas e machos no grupo água e frutose 10%. No entanto, foi observado um aumento significativo na eficiência energética no grupo frutose 20% quando comparado ao grupo controle e ao grupo frutose 10% nas fêmeas (p<0,05). Em relação aos machos, foi encontrado um aumento significativo na eficiência energética somente no grupo 20% em relação ao grupo controle (p<0,05).

4.2.1.5 Consumo total energético

Através da média do consumo alimentar e das calorias da dieta por dia, foi calculado o consumo total energético (kcal/dia) da prole cujas mães receberam frutose durante a gestação e lactação. A tabela 14, mostra a média do consumo total energético no grupo que recebeu somente água e dos grupos que receberam as duas doses de frutose, e pode-se observar um aumento significativo no consumo em machos e fêmeas no grupo na qual as mães receberam frutose 10%.

Tabela 14. Consumo total energético (g/kcal) da prole de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L) durante a gestação e lactação.

	Controle (água) (g/kcal)	Frutose 10%/L (g/kcal)	Frutose 20%/L (g/kcal)
Fêmeas	16,4 ± 0,0	21,6 ± 0,0*	18,1 ± 0,0
Machos	16,7 ± 0,0	20,3 ± 0,0*	18,9 ± 0,0

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média do consumo de comida ingerido por dia de troca (n=8 animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo controle (água) p<0,05 (Kruskal-Wallis seguido pelo *post hoc* de Dunn's).

Fonte: Do Autor

4.2.2 Avaliação do perfil lipídico da prole (machos e fêmeas) cujas mães receberam frutose durante a gestação e lactação

A fim de avaliar o perfil lipídico da prole foram realizadas análises sanguíneas do colesterol total, TG, HDL e a razão TG/HDL dos machos e fêmeas da prole. A tabela 15, mostra a média do perfil lipídico de fêmeas cujas mães receberam água ou frutose durante a gestação e lactação.

Tabela 15. Perfil lipídico de fêmeas da prole de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L) durante a gestação e lactação.

	Controle (água)	Frutose (10%/L)	Frutose (20%/L)
Colesterol Total (mg/dL)	111,1 ± 17,0	123,9 ± 22,4	112,5 ± 47,4
HDL (mg/dL)	58,8 ± 5,8	49,5 ± 10,1	44,6 ± 9,2*
Triglicerídeos (mg/dL)	59,8 ± 21,3	123,8 ± 16,5*	123,8 ± 37,1*
TG/HDL	1,0 ± 0,4	1,8 ± 0,5	2,7 ± 1,3 [#]

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média do perfil lipídico da prole fêmea (n=8 animais por grupo). TG: Triglicerídeos. HDL: Lipoproteína de alta intensidade.*Diferença significativa em relação ao grupo controle (água) p<0,05 (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey).[#]Diferença significativa em relação ao grupo controle (água) p<0,05 (Kruskal-Wallis seguido pelo *post hoc* de Dunn's).

Fonte: Do Autor

Os dados de colesterol total não foram estatisticamente significativos nas fêmeas da prole. No entanto, os níveis de HDL no grupo frutose 20% apresentaram uma diminuição significativa no grupo frutose 20% quando comparados ao grupo controle (p<0,05).

No que se refere aos níveis de triglicerídeos, pode-se observar um aumento significativo nos grupos frutose 10 e 20% quando comparados ao grupo controle (p<0,05). Em relação a razão TG/HDL, observou-se um aumento estatisticamente significativo nas fêmeas das mães que receberam frutose 20% quando comparadas ao grupo controle (p<0,05).

A tabela 16, mostra a média do perfil lipídico de machos cujas mães receberam água ou frutose durante gestação e lactação.

Tabela 16. Perfil lipídico de machos da prole de camundongos Swiss fêmeas que receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L) durante a gestação e lactação.

	Controle (água)	Frutose (10%/L)	Frutose (20%/L)
Colesterol Total (mg/dL)	81,5 ± 19,7	156,3 ± 68,4 [#]	120,3 ± 20,0
HDL (mg/dL)	53,5 ± 6,7	53,1 ± 5,4	58,3 ± 6,5
Triglicerídeos (mg/dL)	73,0 ± 19,5	144,1 ± 27,2*	118,3 ± 14,4*
TG/HDL	1,4 ± 0,4	2,0 ± 0,4*	1,7 ± 0,3

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média do perfil lipídico da prole macho (n=8 animais por grupo). TG: Triglicerídeos. HDL: Lipoproteína de alta intensidade. *Diferença significativa em relação ao grupo água p<0,05 (ANOVA com *post hoc* Tukey). [#]Diferença significativa em relação ao grupo água p<0,05 (Kruskal-Wallis com *post hoc* Dunn's).

Fonte: Do Autor

Os resultados de colesterol total nos machos mostram um aumento estatisticamente significativo no grupo frutose 10% em relação ao grupo controle (p<0,05). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos valores de HDL entre os grupos.

Em relação ao nível de triglicerídeos, pode-se observar um aumento estatisticamente significativo em relação aos grupos frutose 10 e 20% quando comparados ao grupo controle (p<0,05). Já a razão, chamada de índice de Castelli, mostrou diferença significativa apenas no grupo frutose 10% quando comparado ao grupo controle (p<0,05).

4.2.3 Avaliação da glicemia de jejum da prole (machos e fêmeas) que receberam frutose durante a gestação e lactação

A fim de avaliar os parâmetros glicêmicos da prole realizou-se análise da glicemia de jejum (tabela 17).

Tabela 17. Glicemia de jejum da prole de camundongos Swiss fêmeas cujas mães receberam água ou frutose (10%/L; 20%/L) durante a gestação e lactação.

	Controle (água)	Frutose (10%/L)	Frutose (20%/L)
Fêmeas	119,6 ± 14,4	170,6 ± 33,5*	152,6 ± 24,0
Machos	136,8 ± 6,7	172,4 ± 11,7*	163,2 ± 21,8

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média da glicemia de jejum da prole (n=8 animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo controle (água) p<0,05 (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey).

Fonte: Do Autor

Ao avaliar a glicemia de jejum da prole, os resultados demonstraram um aumento estatisticamente significativo da glicemia de jejum no grupo frutose 10% quando comparado ao grupo controle, tanto em fêmeas quanto em machos, cujas mães receberam frutose durante a gestação e lactação ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa em relação ao grupo controle e frutose 20%.

4.2.4 Ensaio Cometa da prole cujas mães receberam frutose durante a gestação e lactação

Foram analisados os danos causados no DNA de células de tecidos periféricos, da prole (machos e fêmeas) de fêmeas que receberam água ou frutose (10%; 20%) durante a gestação e lactação.

Na figura 13 estão os resultados de danos em células de sangue periférico total dos machos avaliados através do ensaio cometa alcalino e oxidativo, respectivamente, pelo parâmetro de índice de danos.

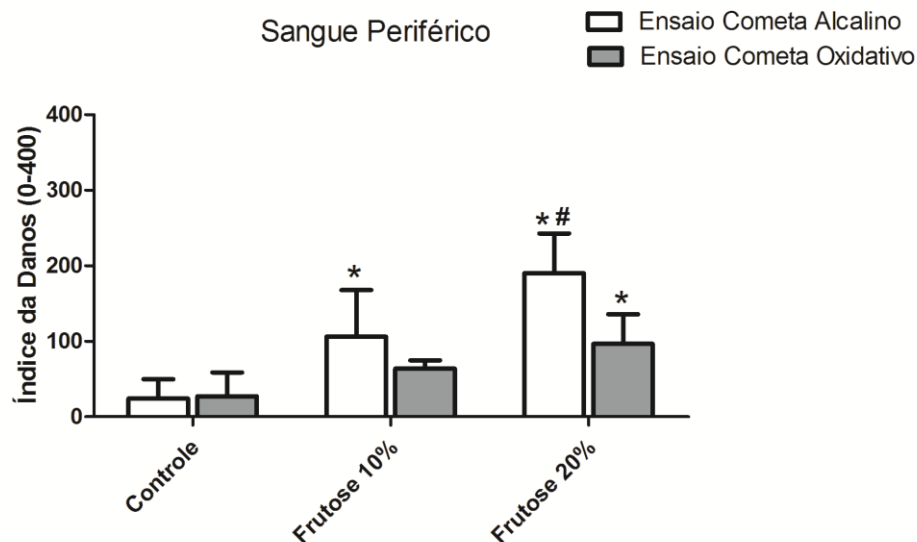


Figura 13. Índice de danos no DNA em células de sangue periférico de machos da prole de camundongos Swiss fêmeas, suplementados ou não com frutose (10%/L; 20%/L) durante o período de gestação e lactação. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão ($n = 6$ animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo controle no mesmo período de vida $P < 0,05$ (ANOVA com *post hoc* de Tukey). #Diferença significativa em relação ao grupo frutose 10%/L $P < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey).

Fonte: Do Autor

Ao analisar os danos alcalinos ao DNA através do índice de danos (figura 13, barras brancas) em sangue periférico de machos cujas mães receberam água ou

frutose durante gravidez e lactação, pode-se observar um aumento de dano significativo no grupo frutose 10% quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). No grupo frutose 20%, os resultados demonstraram aumento estatisticamente significativo em comparação ao grupo controle e grupo frutose 10% ($p < 0,05$).

Em relação ao ensaio cometa oxidativo, (Figura 13, barras cinzas), não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo frutose 10%. No entanto, o grupo frutose 20% apresentou um aumento significativo no índice de danos quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$).

A figura 14 apresenta os resultados do índice de danos em células de fígado e rim de machos da prole de fêmeas suplementadas com água ou frutose durante a gravidez e lactação.

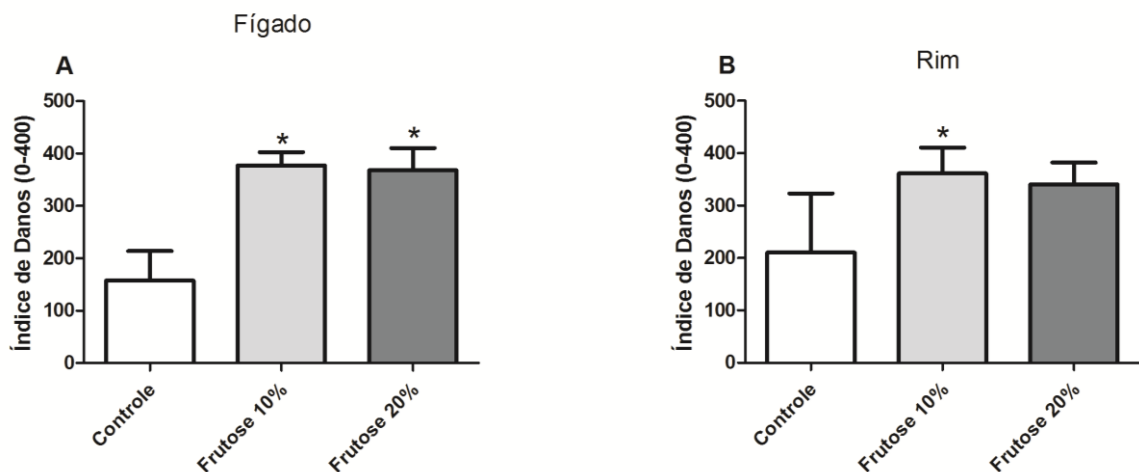


Figura 14. Índice de danos no DNA através do ensaio cometa alcalino, em células de fígado e rim de machos da prole de camundongos Swiss fêmeas, suplementadas ou não com frutose (10%/L; 20%/L) durante o período de gestação e lactação. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão ($n = 6$ animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo controle no mesmo período de vida $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey).
Fonte: Do Autor

Ao avaliar o índice de danos no ensaio cometa alcalino, podemos observar um aumento significativo de danos no DNA nos grupos frutose 10 e 20% em relação ao grupo controle no fígado (figura 14 A) ($p < 0,05$). Já no rim (figura 14 B), houve um aumento significativo apenas no grupo frutose 10% em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), o grupo frutose 20% não demonstrou esta diferença.

Foram avaliados os danos no DNA das células de sangue total periférico também da prole fêmea (Figura 15), através do ensaio cometa alcalino e oxidativo.

Ao avaliar o os danos alcalinos no DNA, pode-se observar que não houve diferença significativa entre o controle e o grupo frutose 10%. No entanto, o grupo frutose 20% demonstrou valores significativamente maiores em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). Já na avaliação dos danos oxidativos, pode-se observar um aumento no índice de dano também no grupo frutose 20% em relação ao grupo controle e grupo frutose 10% ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças significativas quando comparados o grupo controle e grupo frutose 10%.

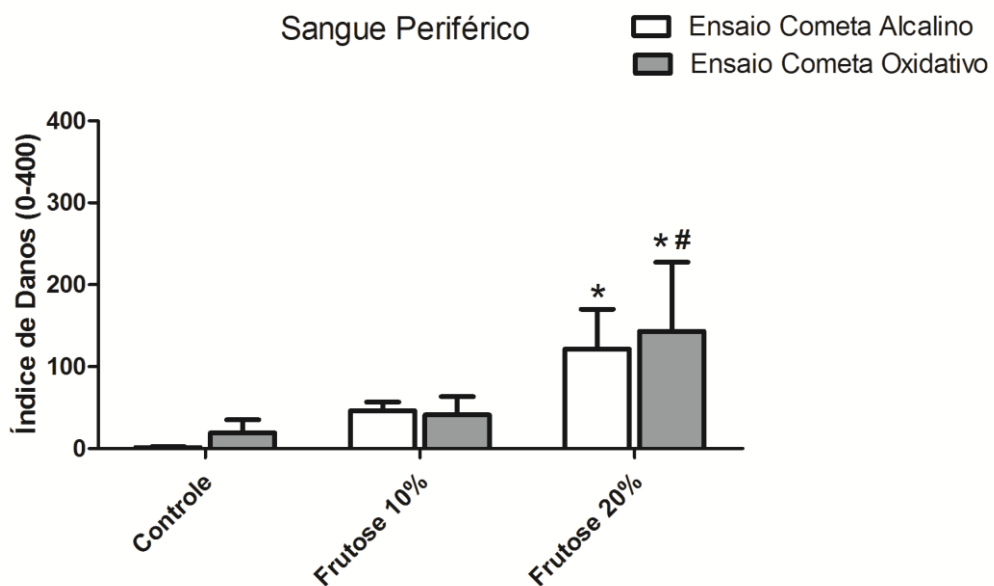


Figura 15. Índice de danos no DNA em células de sangue periférico da prole fêmea de camundongos Swiss fêmeas, suplementados ou não com frutose (10%/L; 20%/L) durante o período de gestação e lactação. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão ($n = 6$ animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo controle no mesmo período de vida $P < 0,05$ (ANOVA com *post hoc* de Tukey). #Diferença significativa em relação ao grupo frutose 10%/L $P < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey).

Fonte: Do Autor

A figura 16 apresenta a avaliação do índice de danos ao DNA em células de fígado e rim da prole fêmea de mães que receberam frutose ou água durante a gravidez e lactação.

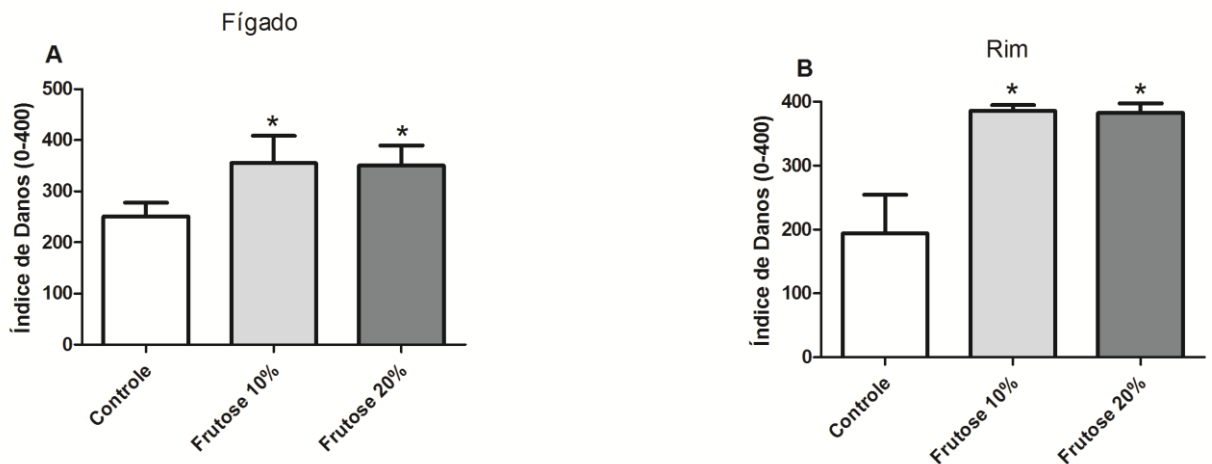


Figura 16. Índice de danos no DNA em células de fígado e rim da prole fêmea de camundongos Swiss fêmeas, suplementados ou não com frutose (10%/L; 20%/L) durante o período de gestação e lactação. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n= 6 animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo controle no mesmo período de vida $P < 0,05$ (ANOVA com *post hoc* de Tukey).

Fonte: Do Autor

Ao avaliar o índice de danos no fígado (A) e no rim (B), através do ensaio cometa alcalino, nossos resultados demonstraram um aumento significativo de danos no DNA no grupo frutose 10 e 20% quando comparados ao grupo controle em ambos os tecidos ($p < 0,05$).

4.2.5 Teste de Micronúcleos na prole (machos e fêmeas) de camundongos fêmeas que receberam água ou frutose durante a gestação e lactação

O teste de micronúcleos avaliou se o consumo de frutose durante a gravidez e lactação foi capaz de provocar efeitos mutagênicos na prole. As tabelas 18 e 19 apresentam os resultados encontrados neste teste nos machos e fêmeas, respectivamente.

Tabela 18. Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMn) observados nas amostras de medula óssea de machos da prole de camundongos Swiss fêmeas tratadas com frutose durante a gravidez e lactação.

Tratamento	EPCMn	ENCMn	EPC/ENC
Controle	0,5 ± 0,5	0,0 ± 0,0	1,1 ± 0,1
Frutose 10%/L	0,3 ± 0,5	0,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Frutose 20%/L	0,5 ± 0,5	0,1 ± 0,3	1,1 ± 0,1

Foram analisadas 2000 células por amostra e estão demonstradas na tabela como média ± desvio padrão da média (n= 6 animais por grupo). Dados estatisticamente não significativos.

Fonte: Do Autor

Tabela 19. Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMn) observados nas amostras de medula óssea de fêmeas da prole de camundongos Swiss fêmeas tratadas com frutose durante a gravidez e lactação

Tratamento	EPCMn	ENCMn	EPC/ENC
Controle	0,3 ± 0,5	0,0 ± 0,0	1,1 ± 0,09
Frutose 10%/L	1,0 ± 1,1	0,0 ± 0,0	1,2 ± 0,09
Frutose 20%/L	1,1 ± 1,1	0,2 ± 0,7	1,1 ± 0,07

Foram analisadas 2000 células por amostra e estão demonstradas na tabela como média ± desvio padrão da média (n= 6 animais por grupo). Dados estatisticamente não significativos.

Fonte: Do Autor

Podemos observar que não foram encontradas diferenças significativas de micronúcleos em medula óssea de camundongos fêmeas e machos, cujas mães receberam água ou frutose durante a gravidez e lactação em relação ao grupo controle, nos dois tipos celulares avaliados (EPC e ENC). Os mesmos resultados foram observados em relação à proporção de EPC/ENC (Tabelas 18 e 19), onde não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos, demonstrando que a produção de eritrócitos está ocorrendo normalmente na medula óssea, sem indícios de citotoxicidade.

5 DISCUSSÃO

Durante período de gestação e lactação, o ambiente intrauterino é um local crítico de exposição a fatores exógenos e endógenos que podem provocar alterações metabólicas por meio da programação fetal. Dentre os fatores exógenos, destacam-se os componentes alimentares, dentre eles incluem-se a frutose, visto que o seu consumo é comum entre as mulheres, inclusive durante o período gestacional (Silveira et al., 2007, Luo et al., 2010, Hanson e Gluckman, 2014).

No presente estudo foi avaliado se o consumo de frutose durante a gestação e lactação seria prejudicial às fêmeas e à sua prole no que diz respeito aos danos no material genético, bem como avaliações bioquímicas e dietéticas. De acordo com os resultados, houve um aumento no consumo de líquidos e de ração animal no grupo água e no frutose nas fêmeas nos período da gestação e lactação. Esse aumento da ingestão alimentar e hídrica pode ser explicado através das mudanças metabólicas que ocorrem durante a gravidez. Segundo Ladyman et al. (2010) a gravidez e a lactação são momentos importantes, nos quais as fêmeas, além de atenderem suas próprias demandas energéticas, precisam também fornecer energia para seus filhos. Várias adaptações metabólicas emergem durante esses períodos, ajudando a suprir a energia adicional necessária. Para isso, aumentos pronunciados na ingestão de alimentos, por exemplo, são observados durante a gestação e a lactação (Woodside, 2007).

Como a frutose pode ser transportada e produzida pela placenta, considera-se que o processo de programação fetal é impulsionado não só pela frutose, mas também por seus metabólitos (Holmberg et al., 1956; Tain et al., 2016). Estudos recentes sugerem que a glicose e a frutose estão envolvidos em mecanismos recompensatórios no cérebro e sensores de energia de maneiras opostas (Rorabaugh et al., 2015). Esse mecanismo recompensatório estimula a ingestão de monossacarídeos devido ao aumento na conectividade funcional entre o hipotálamo e o estriado (Page et al., 2013). Isso pode explicar nossos resultados referentes à prole das fêmeas que consumiram frutose, pois mostram um aumento na ingestão alimentar e hídrica em relação ao grupo controle, cujas mães receberam apenas água durante toda a gestação e lactação.

Rorabaugh et al. (2015) avaliaram se soluções isocalóricas de 8% de sacarose, glicose e frutose possuem perfis de compulsão alimentar semelhantes ou

diferentes ao consumo prévio de cocaína em animais. Os resultados mostraram que a frutose e a glicose produzem graus de recompensa divergentes da cocaína. A glicose produziu baixos níveis de compulsão alimentar e baixo uso da cocaína, enquanto os animais que receberam frutose produziram comportamento altamente compulsivo e o consumo de cocaína preservado. Estes resultados suportam a ideia de que componentes individuais dos açúcares podem provocar, diferencialmente, um circuito de recompensa dentro do cérebro e ocasionar uma compulsão alimentar.

Acompanhando o aumento no consumo alimentar, podemos observar um aumento na eficiência energética e do consumo total energético nas fêmeas, principalmente durante o período de lactação, nos grupos que receberam frutose. O parâmetro de eficiência energética, isto é, a média do ganho de peso corporal pela média da unidade de energia ingerida, também mostrou-se elevado em camundongos que receberam uma dieta de alto teor de carboidratos (Cole et al., 2014). Sendo assim, observou-se que a medida que aumentou o consumo alimentar, houve também um aumento na eficiência energética e no consumo total energético associado ao aumento do ganho de peso acentuado, principalmente nos grupos que receberam frutose em relação ao grupo controle, mostrando que há aumento da demanda energética nas fêmeas durante os períodos de gestação e lactação quando há consumo excessivo de frutose. Nas fêmeas de mamíferos, de fato, a lactação é o período mais energeticamente exigente da vida e é caracterizada por um aumento dramático na exigência de energia e nutrientes do organismo para a produção de leite (Loudon e Racey, 1987; Speakman, 2008)., o que explicaria os resultados encontrados nesse trabalho, não só nos grupos frutose, mas também nos controles.

A prole, machos e fêmeas, que receberam altas doses de frutose durante o período de gestação e lactação também consumiram mais alimentos em relação aos animais controle, logo houve aumento no seu consumo total energético no grupo frutose (10%/L) em relação ao grupo controle. Além disso, a eficiência energética nesses animais mostrou-se elevada, principalmente devido à média do peso corporal, nos animais de ambos os sexos que receberam frutose, ter sido elevada no decorrer da vida, necessitando de um aumento da atividade energética. De fato, a programação metabólica na gestação e lactação pode gerar à prole um ambiente saudável ou doente. A obesidade materna e diabetes gestacional têm provocado alterações em longo prazo sobre os sistemas que regulam o balanço de energético

na prole. O aumento da obesidade infantil e do diabetes em crianças é frequentemente atribuído a um aumento de dietas densamente calóricas e redução do exercício físico. No entanto, acredita-se que a mudanças alimentares precoces, tanto nas mães quanto nos filhotes, contribui significativamente para tratar essas patologias (Frias e Grove, 2012).

Através dos nossos resultados pudemos observar que a prole de fêmeas que apresentaram aumento no consumo alimentar e no peso corporal, nasceram com o peso adequado, porém no decorrer da vida, os mesmos adquiriram maior ganho de peso em relação aos animais controle até atingirem os 30 dias de vida, em ambos os sexos. Em uma revisão bibliográfica, Ravelli et al. (1976) demonstraram que alterações metabólicas na gravidez, e em ambientes pós-natal, influenciam no peso e energia da prole na idade adulta. Interessantemente, o ambiente uterino pode ter influência sobre preferências no sabor e alimentação saudável da prole. Os sabores da dieta materna são encontrados no líquido amniótico e conseqüentemente ingeridos pelo feto, assim sabores experimentados no período intrauterino determinam uma preferência que persiste na infância ou mesmo na vida adulta, juntamente com possíveis complicações como diabetes mellitus tipo 2 e obesidade (Trout e Wetzel-Effinger, 2012).

A fim de avaliar a possível relação entre o consumo de frutose na gestação e lactação e o quanto isso influencia na prole, avaliou-se a resposta glicêmica de mães e filhotes. Observamos um aumento na glicemia de jejum nas fêmeas no período da gestação no grupo que recebeu altas doses de frutose, porém, não foi observada uma resistência à glicose nesses animais. Uma hipótese para o não desenvolvimento dessa resistência seria devido ao tempo de tratamento que foram de apenas 42 dias (gestação + lactação), sendo que a maioria dos modelos animais utiliza um tempo maior de dieta/suplementação. Den Hartigh et al. (2018) utilizaram um modelo de dieta rica em sacarose e gordura saturada durante 20 semanas a fim de avaliar o efeito da rapamicina oral e observaram que os animais estavam resistentes à insulina e que a rapamicina melhorou a sensibilidade à mesma. Além disso, também observamos um aumento da glicemia de jejum na prole (machos e fêmeas) no grupo frutose 10% quando comparado ao grupo controle. O aumento da glicemia de jejum nesses animais está relacionado com as desordens ocasionadas na gestação devido ao consumo de frutose. Em uma revisão sistemática e de metanálise, Yamamoto et al. (2018) observaram que existe uma

relação entre o perfil glicêmico de mães em relação a sua prole e que intervenções dietéticas modificadas durante a gestação influenciam favoravelmente os resultados relacionados à glicemia materna e ao peso ao nascer da prole.

Quando avaliamos o perfil lipídico nas fêmeas durante a gestação e lactação e na sua prole, observamos um aumento do colesterol total e HDL no período da lactação em todos os grupos. Segundo Pichaud et al. (2013), alterações metabólicas estão associadas ao período da lactação, podendo levar a um aumento da necessidade de lipídeos, principalmente, dos níveis de colesterol no leite materno, a fim de suprir a necessidade fisiológica da prole (Dimova et al., 2018). No entanto, o grupo frutose 20% apresentou menor HDL em relação ao grupo controle na lactação. Corroborando com os nossos resultados, Lowndes et al., (2014), observaram uma diminuição nos níveis de HDL, em uma dieta rica em xarope de milho (alimento rico em frutose) quando comparada a uma dieta com baixo teor de gordura em humanos.

Além disso, os níveis de triglicerídeos mostraram-se aumentados nos grupos frutose em relação ao grupo controle no período da gestação e lactação nas mães e na sua prole (machos e fêmeas). Sabe-se que parte da metabolização da frutose pode ser usada para a síntese de ácidos graxos e glicerol nos hepatócitos através da lipogênese, favorecendo a reesterificação de ácidos graxos e glicerol para formar triglicerídeos, podendo passar via gestação para prole (Topping et al., 1972; Tappy e Lê, 2010).

A razão entre TG e HDL, denominada Índice de Castelli I (Castelli et al., 1983), é utilizada como um potente preditor do desenvolvimento de doenças coronarianas, além de ser considerado um indicador fácil e rápido de ser obtido, especialmente quando considerado o contexto da atenção básica de saúde (Da Luz et al., 2005; 2008). Neste sentido, os nossos resultados mostraram um aumento na razão TG/HDL no período da gestação, nos grupos que receberam frutose e na respectiva prole (machos e fêmeas), em virtude dos baixos níveis de HDL e aumento do TG, ou seja, maior risco para doenças crônicas não transmissíveis.

Existe uma relação entre o alto consumo de frutose e síndrome metabólica. Dentre os componentes da síndrome metabólica segundo o NCEP-ATP III (National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III), encontra-se: obesidade abdominal por meio de circunferência abdominal (Homens > 102 cm; Mulheres > 88 cm); triglicerídeos \geq 150 mg/dL; HDL colesterol (Homens < 40 mg/dL;

Mulheres < 50 mg/dL); pressão arterial (≥ 130 mmHg ou ≥ 85 mmHg) e glicemia de jejum ≥ 110 mg/dL. A síndrome metabólica ocorre quando estão presentes três destes cinco critérios (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2005). Dessa forma, com os nossos resultados pode-se observar um aumento nos níveis de TAG e glicemia de jejum nas fêmeas que consumiram frutose na gestação, e nas suas respectivas proles, um aumento glicêmico (machos e fêmeas), baixo HDL (fêmeas) e aumento de triglicerídeos (machos e fêmeas), evidenciando assim uma síndrome metabólica nas fêmeas da prole. Segundo Lee et al. (2018), o consumo excessivo de frutose no início da vida, via lactação ou alimentação, é um fator de risco para o aparecimento da síndrome metabólica e disfunções em múltiplos tecidos e órgãos na idade adulta, dados estes que corroboram com nossos achados.

Em um trabalho semelhante ao nosso, Rodríguez et al. (2016), avaliaram o efeito do consumo de frutose na gestação em relação ao perfil lipídico na prole fêmea. Eles forneceram aos camundongos fêmeas alto consumo de frutose (10%/L em água potável) durante 3 semanas na gestação e avaliaram o seu efeito em fêmeas da prole, sendo que observaram elevações de triglicerídeos e o aparecimento de esteatose hepática. A hipótese para isso ter acontecido apenas nas fêmeas, assim como no presente estudo, seria pela expressão e a atividade da proteína de ligação a elementos de resposta a carboidratos (ChREBP), um fator de transcrição lipogênico, apresentarem-se maiores nas fêmeas do que nos machos. Logo, a ingestão de frutose materna pode influenciar a resposta da prole feminina adulta à frutose e, portanto, induzir desequilíbrios metabólicos.

O aumento do uso de alimentos refinados, que são ricos em frutose, são particularmente preocupantes em crianças e adolescentes, uma vez que a ingestão calórica total e a prevalência da síndrome metabólica estão aumentando continuamente nessas populações (Crescenzo et al., 2018). No entanto, ainda especula-se qual o mecanismo de programação fetal induzida pelo alto consumo materno de frutose, com o aparecimento de síndrome metabólica na prole, sendo importante ressaltar que os efeitos adversos da alimentação com frutose depende da quantidade e duração do seu consumo (Toop e Gentili, 2016).

A fim de verificar se o tratamento com frutose durante a gestação, lactação e na prole pode levar a danos no DNA, foi realizado o ensaio cometa alcalino e oxidativo em células de sangue periférico de camundongos Swiss. Através dessa técnica é possível a detecção de quebras de fita simples e dupla, sítios álcali-

lábéis e ligações cruzadas entre DNA-DNA e DNA-proteína e danos oxidativos através da enzima FPG (Singh, 1988; Fairbairn et al., 1995). Adicionando DNA glicosilase à versão clássica deste ensaio, é possível medir danos de DNA específicos, como as bases oxidadas. A enzima mais comumente utilizada é a FPG, que detecta purinas oxidadas, dentre elas a 8-oxoguanina, uma das lesões de DNA mais comuns resultantes do ataque de ERO, sendo um importante biomarcador de estresse oxidativo (Danielsen et al., 2008). Assim, a incubação com esta enzima específica permite uma estimativa dos níveis de dano oxidativo no DNA (Azqueta et al., 2009). Segundo Moller et al. (2017), o ensaio cometa oxidativo, utilizando FPG, tem sido amplamente empregado em estudos de biomonitoramento em humanos com análise sanguínea. Dessa forma, foi utilizada somente análise oxidativa no sangue periférico dos animais devido a maior sensibilidade da FPG nesse tecido e a versão alcalina foi feita também no fígado e rim.

Os resultados encontrados neste estudo mostraram um aumento de danos ao DNA em sangue periférico nas fêmeas que receberam frutose (10%/L e 20%/L) durante a gestação e lactação, quando comparadas ao grupo controle e pré-cópula, tanto no ensaio cometa alcalino quanto no oxidativo. No entanto, no período de lactação observamos dano oxidativo elevado na dose de frutose 20%/L. Shortliffe et al. (2015), sugerem que a alta ingestão de frutose dietética em ratos na gestação pode resultar em profundas alterações sistêmicas e patológicas durante a gravidez, como alteração no perfil lipídico, glicêmico e estresse oxidativo, que por sua vez, pode danificar a molécula de DNA.

A gravidez é um estado fisiológico acompanhado por níveis excessivos de estresse oxidativo devido ao aumento da demanda e utilização de oxigênio. O aumento do estresse oxidativo também está relacionado à menor disponibilidade de antioxidantes e aumento de oxidantes, como por exemplo a frutose, que está presente em grandes quantidades em alimentos ricos em xarope de milho, como sucos industrializados, biscoitos, geleias, salgados e refrigerantes, estes produtos são consumidos durante a gestação e lactação. De fato, a combinação do excesso de frutose associado a alterações no perfil lipídico e obesidade, podem agravar o estado metabólico, seja via inflamação ou oxidação (Berchieri-Ronchi et al., 2011).

Segundo Giris et al. (2018), animais alimentados com uma dieta rica em frutose (60%) por 8 semanas foram capazes de desenvolver resistência à insulina, apresentar níveis elevados de triglicerídeos, do fator de necrose tumoral alfa (TNF-

α), de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e diminuir a atividade da superóxido dismutase (SOD) e da glutathiona peroxidase (GSH-Px). Sendo assim, uma hipótese para justificar os nossos resultados seria a interação das ERO, que estão aumentadas pelo consumo de frutose, com o DNA, indo ao encontro de nossos resultados Sil et al. (2015), observaram dano genético oxidativo nas fêmeas gestantes e lactantes, bem como na sua prole uma vez que foi observado um dano genético oxidativo nas fêmeas gestantes e lactantes, bem como na sua prole (Sil et al., 2015).

Corroborando com os resultados das fêmeas, a prole também apresentou aumento de danos ao DNA no sangue periférico total nos grupos que receberam frutose através da mãe, tanto no ensaio cometa alcalino quanto oxidativo. Os dados do presente trabalho podem ter associação com as alterações metabólicas já citadas anteriormente. Neste sentido, Crescenzo et al. (2018) sugerem que um aumento na ingestão de frutose em ratos jovens está associado à inflamação, aumento do fator TNF- α e estresse oxidativo, além de danos ao DNA (Sir et al., 2015).

O excesso de frutose é consequência do aumento no consumo total energético e de porções alimentares industrializadas, que incorpora a frutose contida na forma de sacarose e xarope de milho (Gutgesell et al., 2009). Pesquisas em animais tem demonstrado associações da incidência de diabetes gestacional com alterações metabólicas materna e fetal (Regnault et al., 2013). De acordo com Carapeto et al. (2018) o consumo de uma dieta rica em frutose (45%) pela mãe e/ou pai está associado a efeitos adversos no metabolismo do fígado da sua prole. De fato, quando avaliamos fígado e rim, observamos um aumento de dano ao DNA no fígado das fêmeas que ingeriram frutose (10%/L;20%/L) após o período de lactação. Grande parte do metabolismo da frutose acontece no fígado (50-75%) e o restante nos rins e adipócitos, sendo assim o fígado é o maior responsável pela metabolização desse monossacarídeo (Tappy e Lê, 2010). Pensando nisso, sugere-se que altas doses de frutose sobrecarregam a absorção intestinal e depuração da frutose intestinal, atingindo tanto o fígado quanto a microbiota colônica (Jang et al. 2018).

Embora existam poucos estudos sobre danos em DNA e frutose na gestação, sugere-se que uma dieta rica em frutose (60%) provoque aumento da peroxidação lipídica hepática e danos ao DNA no fígado de animais (Castro et al., 2012). Além disso, Zhao et al. (2018), mostraram que a alta ingestão de frutose

pode diminuir o fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), que possui atuação na regulação da expressão de enzimas antioxidantes, ocasionando inflamação e estresse oxidativo no fígado. Este resultado é preocupante, pois demonstra que as condições dietéticas durante a gravidez alteram o metabolismo hepático materno provocando anormalidades metabólicas e genéticas na prole, incluindo hiperglicemia, dislipidemia (King, 2000) e danos em DNA.

Interessantemente, em nosso estudo o grupo controle apresentou elevado níveis de danos ao DNA em fígado e rim, sendo que a análise foi realizada depois do período da lactação. Sabe-se que fêmeas que não passaram pela gestação e lactação possuem baixos níveis de danos ao DNA (Heuser et al., 2008). Da mesma forma, Aissa et al. (2013), avaliaram danos ao DNA em fígado de fêmeas adultas tratadas com uma dieta rica em metionina e observaram que as fêmeas do grupo controle possuíam baixos níveis de danos ao DNA. Sendo assim, podemos sugerir que em situações normais, fêmeas adultas possuem danos basais no DNA em sangue e tecidos periféricos, quando comparadas com aquelas que passaram pela gestação e lactação (Heuser et al., 2008).

Além disso, observamos aumento de danos ao DNA no fígado e rim da prole (machos e fêmeas). Semelhantemente aos nossos achados Yamada-Obara et al. (2016), utilizando uma dieta com alto teor de frutose e gordura, em ratos fêmeas por 6 semanas antes da cópula e mantida durante o período de gestação e lactação, demonstraram níveis elevados de adiponectina, peso renal e parâmetros de estresse oxidativo, sendo constatada lesão renal e desequilíbrios metabólicos na prole.

Acredita-se que uma dieta rica em frutose, em animais jovens, provoque distúrbios hepáticos, com aumento nos níveis de triglicerídeos, marcadores oxidantes (TBARS) e baixos níveis de antioxidantes (SOD) (Zaki et al., 2018). Isto está de acordo com nossos resultados, pois observamos que a prole obteve um desequilíbrio hepático, através da análise do perfil lipídico, e aumento nos níveis de triglicerídeos, sendo que isso pode estar associado ao aumento de danos em DNA nos animais, uma vez que a hiperlipidemia pode levar ao estresse oxidativo que por sua vez leva a danos no DNA (Dos Santos et al., 2018). Da mesma forma, Hininger-Favier et al. (2009), sugerem que uma dieta rica em frutose apresenta maior peroxidação lipídica e dano oxidativo ao DNA em fígado de animais, tanto nas mães quanto na prole.

Outro teste utilizado neste trabalho para análise da instabilidade genômica foi o teste do MN em medula óssea de camundongos, que apresenta uma estimativa da quantidade de mutações cromossômicas induzidas através de eventos de clastogênese e aneugênese (Krishna e Hayashi, 2000). Da mesma forma que no ensaio cometa, os resultados mostraram um aumento significativo de MNs nas fêmeas dos grupos que receberam frutose 10%/L, após o período de lactação em relação grupo controle. demonstrando uma ação mutagênica da frutose neste período. No entanto, a prole (machos e fêmeas), diferentemente das mães, não foram observadas diferenças em relação ao controle nem indícios de citotoxicidade, através da proporção EPC/ENC nos filhotes de mães que receberam frutose durante a gestação e lactação.

São escassos os trabalhos relacionando a mutagenicidade com o período gestacional e de lactação com frutose na literatura. MacGregor et al. (1989) avaliaram o potencial mutagênico *in vivo* de vários açúcares incluindo a frutose e aminoácidos, e encontraram mutagenicidade nas combinações de frutose e lisina. Corroborando, Pool et al. (1984), indicaram um potencial mutagênico no desenvolvimento de métodos analíticos com D-frutose. Sugere-se que altas doses de sorbitol (metabólito da frutose) cause genotoxicidade nos hepatócitos, devido à presença de micronúcleos (Cardoso et al., 2016). No nosso trabalho, a frutose foi mutagênica apenas nas fêmeas após o período da gestação e lactação. Dessa forma, os resultados não sugerem um potencial mutagênico na prole. Isto pode ser devido as mutações epigenéticas gaméticas que ocorrem na prole durante a concepção (Ross e Canovas, 2016).

De fato, é importante levar em consideração que a exposição precoce à frutose pode determinar a suscetibilidade de doenças metabólicas em longo prazo, isto é, a nutrição materna pode influenciar fortemente a saúde da prole na vida adulta (Ching et al., 2011). Assim, conclui-se com estes resultados, a necessidade de intervenções nutricionais para jovens e adultos, bem como para a prevenção de alterações metabólicas induzidas pela frutose durante a gravidez e lactação, em virtude das alterações genéticas, metabólicas e nutricionais.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, no período da gestação e lactação as duas doses de frutose testadas (10%/L; 20%/L) apresentaram atividade genotóxica e mutagênica, associada ao aumento do consumo alimentar, peso corporal, perfil lipídico e glicemia de jejum. Da mesma forma, na prole (machos e fêmeas) destas fêmeas, ambas as doses de frutose também foram capazes de aumentar a instabilidade genética. Além disso, a prole (machos e fêmeas) apresentaram alterações nutricionais e metabólicas em virtude do aumento do consumo alimentar, peso corporal, perfil lipídico e glicêmico. Já a prole de fêmeas, que receberam frutose via gestação e lactação, desenvolveram síndrome metabólica no início da vida. Com isso, pode-se sugerir que o alto consumo de frutose durante o período de gestação e lactação é prejudicial tanto para as mães gestantes quanto para sua prole. Dessa forma, salienta-se a conscientização do consumo da frutose entre as gestantes e lactantes.

Limitações e perspectivas

Um das limitações encontradas no nosso estudo foi avaliar a prole até a vida adulta e as vias moleculares uma vez que as mesmas são pouco abordadas.

Como perspectivas futuras, seria de grande valia avaliar a prole até a vida adulta, buscando relacionar parâmetros comportamentais, moleculares e de estresse oxidativo a fim de analisar as vias metabólicas associadas a esses resultados na prole.

7 REFERÊNCIAS

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
- Aissa AF, Gomes TD, Almeida MR, Hernandez LC, Darin JD, Bianchi ML, Antunes LM. Methionine concentration in the diet has a tissue-specific effect on chromosomal stability in female mice. *Food Chem Toxicol.* 2013 Dec;62:456-62.
- Ajiboye TO, Hussaini AA, Nafiu BY, Ibitoye OB. Aqueous seed extract of *Hunteria umbellata* (K. Schum.) Hallier f. (Apocynaceae) palliates hyperglycemia, insulin resistance, dyslipidemia, inflammation and oxidative stress in high-fructose diet-induced metabolic syndrome in rats. *J Ethnopharmacol.* 2017; 23(198):184-193.
- Ajiboye TO, Raji HO, Adeleye AO, Adigun NS, Giwa OB, Ojewuyi OB, Oladiji AT. *Hibiscus sabdariffa* calyx palliates insulin resistance, hyperglycemia, dyslipidemia and oxidative stress in fructose-induced metabolic syndrome rats. *J. Sci. Food Agric. J. Sci. Food Agric.* 2015; 96:1522–1531.
- Amoako AA, Nafee TM, Ola B. Epigenetic Influences During the Periconception Period and Assisted Reproduction. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1014:15-39.
- Aryanpur M, Tarahomi M, Sharifi H, Heydari G, Hessami Z, Akhoundi M, Masjedi MR. Comparison of spermatozoa quality in male smokers and nonsmokers of Iranian infertile couples. *Int J Fertil Steril.* 2011; 5(3):152–157.
- Azqueta A, Shaposhnikov S, Collins AR. DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutat Res.* 2009; 674:101-8.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1987;32:279-312.
- Barreiros RC, Bossolan G, Trindade CEP. Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. *Rev Nutr.* 2005;18 (3): 377-389.
- Belli M, Sabora O, Tabocchini MA. Molecular targets in cellular response to ionizing radiation and implications in space radiation protection. *J Radiat Res.* 2002; 43- 13-9.
- Berchieri-Ronchi CB, Ki SW, Zhao Y, Correa CR, Yeum KJ, Ferreira AI. Oxidative stress status of highly prolific sows during gestation and lactation. *Animal,* 2011; 5:1774-1779.
- Boissonnas CC, El Abdalaoui H, Haelewyn V, Fauque P, Dupont JM, Gut I. Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *Eur J Hum Genet.* 2010; 18(1):73–80.
- Broedbaek K, Henriksen T, Weimann A, Petersen M, Andersen JT, Afzal S, Jimenez-Solem E, Persson F, Parving HH, Rossing P, Poulsen HE. Long-term

effects of Irbesartan treatment and smoking on nucleic acid oxidation in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria: an Irbesartan in patients with type 2 diabetes and Microalbuminuria (IRMA 2) substudy. *Diabetes Care*. 2011; 34:1192-8.

Bundalo M, Djordjevic A, Bursac B, Zivkovic M, Koricanac G, Stanković A. Fructose-rich diet differently affects angiotensin II receptor content in the nucleus and a plasma membrane fraction of visceral adipose tissue. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2017; 42(12):1254-1263.

Carapeto PV, Ornellas F, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Liver metabolism in adult male mice offspring: consequences of a maternal, paternal or both maternal and paternal high-fructose diet. *J Dev Orig Health Dis*. 2018 Aug;9(4):450-459.

Cardoso FS, Araujo-Lima CF, Aiub CA, Felzenszwalb I. Exposure to sorbitol during lactation causes metabolic alterations and genotoxic effects in rat offspring. *Toxicol Lett*. 2016; 17(260):36-45.

Castelli WP, Abbott RD, Mcnamara PM. Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease. *Circulation*. 1983;67(4):730-4.

Castro GSF, Santos RA, Portari GV, Jordão AA, Vannucchi H. Omega-3 improves glucose tolerance but increases lipid peroxidation and DNA damage in hepatocytes of fructose-fed rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab*. 2012; 37: 233–240.

Ching RH, Yeung LO, Tse IM, Sit WH, Li ET. Supplementation of bitter melon to rats fed a high-fructose diet during gestation and lactation ameliorates fructose-induced dyslipidemia and hepatic oxidative stress in male offspring. *J Nutr*. 201;141(9):1664-72.

Choi HK, Willett W, Curhan G. Fructose-Rich Beverages and Risk of Gout in Women. *JAMA*. 2010; 304(20): 2270-2278.

Cioffi F, Senese R, Lasala P, Ziello A, Mazzoli A, Crescenzo R, Liverini G, Lanni A, Goglia F, Iossa S. Fructose-Rich Diet Affects Mitochondrial DNA Damage and Repair in Rats. *Nutrients*. 2017; 24;9(4).

Collins AR, El Yamani N1, Lorenzo Y, Shaposhnikov S, Brunborg G, Azqueta A. Controlling variation in the comet assay. *Front Genet*. 2014; 5:359.

Cole M, Coleman D, Hopker J, Wiles J. Improved gross efficiency during long duration submaximal cycling following a short-term highcarbohydrate diet. *Int J Sports Med*. Mar 2014; 35 (3): 265-9.

Crescenzo R, Cigliano L, Mazzoli A, Cancelliere R, Carotenuto R, Tussellino M1, Liverini G1, Iossa S. Early Effects of a Low Fat, Fructose-Rich Diet on

Liver Metabolism, Insulin Signaling, and Oxidative Stress in Young and Adult Rats. *Front Physiol.* 2018 Apr 26;9:411.

Da Luz PL, Cesena FH, Favarato D, Cerqueira ES. Comparison of serum lipid values in patients with coronary artery disease at <50, 50 to 59, 60 to 69, and >70 years of age. *Am J Cardiol.* 2005;96(12):1640-3.

Da Luz PL, Favarato D, Faria Neto JR Jr, Lemos P, Chagas ACP. High Ratio of triglycerides to HDL cholesterol predicts extensive coronary disease. *Clinics (São Paulo).* 2008;63(4):427-32.

Danielsen PH, Brauner EV, Barregard L, Sallsten G, Wallin M, Olinski R, Rozalski R, Moller P, Loft S. Oxidatively damaged DNA and its repair after experimental exposure to wood smoke in healthy humans. *Mutat Res.* 2008;642(1-2):37-42.

Den Hartigh LJ, Goodspeed L, Wang SA, Kenerson HL, Omer M, O'Brien KD, Ladiges W, Yeung R, Subramanian S. Chronic oral rapamycin decreases adiposity, hepatic triglycerides, and insulin resistance in male mice fed a diet high in sucrose and saturated fat. *Exp Physiol.* 2018.

Dimova LG, Lohuis MAM, Bloks VW, Tietge UJF, Verkade HJ. Milk cholesterol concentration in mice is not affected by high cholesterol diet- or genetically-induced hypercholesterolaemia. *Sci Rep.* 2018 Jun 11;8(1):8824.

Dhar A, Desai K, Kazachmov M, Yu P, Wu L. Methylglyoxal production in vascular smooth muscle cells from different metabolic precursors. *Metab. Clin. Exp.* 2008; 57:1211–1220.

Diniz YS, Faine LA, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GX, Burneiko RC, Cicogna AC, Novelli EL. Monosodium glutamate in standard and high-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. *Nutrition.* 2005; 21(6):749-55.

Diniz YS, Fernandes AA, Campos KE, Mani F, Ribas BO, Novelli EL. Toxicity of hypercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue. *Food Chem Toxicol.* 2004; 42(2):313-19.

Dos Santos JM, Oliveira DS, Moreli ML, Benite Ribeiro SA. The role of mitochondrial DNA damage at skeletal muscle oxidative stress on the development of type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem.* 2018.

Durga KD, Adhisivam B, Vidya G, Vishnu Bhat B, Bobby Z, Chand P. Oxidative stress and DNA damage in newborns born to mothers with hyperglycemia - a prospective cohort study. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017; 12:1-6.

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res.* 1995; 339(1):37-59.

Frias AE, Grove KL. Obesity: a transgenerational problem linked to nutrition during pregnancy. *Semin Reprod Med.* 2012 Dec;30(6):472-8.

Gaino NM, Silva MV. Consumo de frutose e impacto na saúde humana. *Segurança Alimentar e Nutricional.* 2011; 18(2): 88-98.

Giriş M, Dogru-Abbasoglu S, Soluk-Tekkeşin M, Olgaç V, Uysal M. Effect of betaine treatment on the regression of existing hepatic triglyceride accumulation and oxidative stress in rats fed on high fructose diet. *Gen Physiol Biophys.* 2018, 26.

Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, Nascimento PC, Pomblum VJ, Garcia SC. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J Pharm Biomed Anal.* 17;43(2):619-24. 2007.

Gutgesell A, Ringseis R, Eder K. Short communication: Dietary conjugated linoleic acid down-regulates fatty acid transporters in the mammary glands of lactating rats. *J Dairy Sci.* 2009 Mar;92(3):1169-73.

Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica.* 9^{ed.} Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2008.

Hansen M, Baunsgaard D, Autrup H, Vogel UB, Moller P, Lindecrona R, Wallin H, Poulsen HE, Loft S, Dragsted LO. Sucrose, glucose and fructose have similar genotoxicity in the rat colon and affect the metabolome. *Food and Chemical Toxicology.* 2008; 46: 752–760.

Hanson MA, Gluckman PD. Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? *Physiol Rev.* 2014;94: 1027–1076.

Heuser VD, de Andrade VM, Peres A, Gomes de Macedo Braga LM, Bogo Chies JA. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by micronucleus test and comet assay in mice peripheral blood cells. *Cell Biol Int.* 2008 Oct;32(10):1223-9.

Hellerstein MK, Berglund L, Havel PJ. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J. Clin. Investig.* 2009; 119(5):1322–1334.

Hininger-Favier I, Benaraba R, Coves S, Anderson RA, Roussel AM. Green Tea Extract Decreases Oxidative Stress and Improves Insulin Sensitivity in an Animal Model of Insulin Resistance, the Fructose-Fed Rat. *Journal of the American College of Nutrition.* 2009; 28(4): 355–361.

Holmberg NG, Kaplan B, Karvonen MJ, Lind J, Malm M. Permeability of human placenta to glucose, fructose, and xylose. *Acta Physiol Scand* 1956;36:291e9.

Huang DW, Chang WC, Yang HJ, Wu JS, Shen SC. Gallic Acid Alleviates Hypertriglyceridemia and Fat Accumulation via Modulating Glycolysis and Lipolysis Pathways in Perirenal Adipose Tissues of Rats Fed a High-Fructose Diet. *Int J Mol Sci.* 2018;15(1)19.

Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 1997;68(3):285-316.

Jang C, Hui S, Lu W, Cowan AJ, Morscher RJ, Lee G, Liu W, Tesz GJ, Birnbaum MJ, Rabinowitz JD. The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. *Cell Metab.* 2018; 27(2):351-361.

Kelishadi R, Mansourian M, Heidari-Beni M. Association of fructose consumption and components of metabolic syndrome in human studies: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition.* 2014;30(5):503-10.

King JC. Physiology of pregnancy and nutrient metabolism. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1218S–25S.

Ko EA, Kim HR, Kim YB, Kim HS, Lee SH. Effect of High Fructose Corn Syrup (HFCS) Intake on the Female Reproductive Organs and Lipid Accumulation in Adult Rats. *Dev Reprod.* 2017; 21(2):151-156.

Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res.* 2000; 455(1-2):155-66.

Ladyman,SR; Khant Aung, Z; Grattan ,DR: Impact of pregnancy and lactation on the long-term regulation of energy balance in female mice. *Endocrinology.*2010.

LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 1992; 5(2):227-31.

Lee WC, Wu KLH, Leu S, Tain YL. Translational insights on developmental origins of metabolic syndrome: Focus on fructose consumption. *Biomed J.* 2018 Apr;41(2):96-101.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186:464-78.

Levy A, Marshall P, Zhou Y, Kreek MJ, Kent K, Daniels S, Shore A, Downs T, Fernandes MF, Mutch DM, Leri F. Fructose:glucose ratios--a study of sugar self-administration and associated neural and physiological responses in the rat. *Nutrients*. 2015; 22(5):3869-90.

Li B, Zhang Z, Liu W. Flow-injection chemiluminescence determination of chlortetracycline using on-line electrogenerated [Cu(HIO(6))(2)](5-) as the oxidant. *Talanta*. 2001;55 (6):1097-102.

Lieberman M, Ricer RE. *Biochemistry, Molecular Biology, and Genetics*. 6^a ed. Filadélfia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2014.

Lineker C, Kerr PM, Nguyen P, Bloor I, Astbury S, Patel N, Budge H, Hemmings DG, Plane F, Symonds ME, Bell RC. High fructose consumption in pregnancy alters the perinatal environment without increasing metabolic disease in the offspring. *Reproduction, Fertility and Development*. 2016; 28: 2007–2015.

Loudon, ASI; Racey, PA. Reproductive Energetics in Mammals. *Zoological Society of London Symposia*, v. 57, p. 1987 - 371 ,1987.

Lowndes J, Sinnott S, Yu Z, Rippe J. The effects of fructose-containing sugars on weight, body composition and cardiometabolic risk factors when consumed at up to the 90th percentile population consumption level for fructose. *Nutrients* 2014; 6 (8): 3153-68.

Luo ZC, Xiao L, Nuyt, AM. Mechanisms of developmental programming of the metabolic syndrome and related disorders. *World J Diabetes*, 2010;1,89-98.

MacGregor JT, Tucker JD, Ziderman II, Wehr CM, Wilson RE, Friedman M. Non-clastogenicity in mouse bone marrow of fructose/lysine and other sugar/amino acid browning products with in vitro genotoxicity. *Food Chem Toxicol*. 1989 Nov;27(11):715-21.

Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res*. 1990; 239(1):29-80.

Mizuno G, Munetsuna E, Yamada H, Ando Y, Yamazaki M, Murase Y, Kondo K, Ishikawa H, Teradaira R, Suzuki K, Ohashi K. Fructose intake during gestation and lactation differentially affects the expression of hippocampal neurosteroidogenic enzymes in rat offspring. *Endocr Res*. 2017; 42(1):71-77.

Moller P, Jantzen K, Lohr M, Andersen MH, Jensen DM, Roursgaard M, Danielsen PH1, Jensen A1, Loft S1. Searching for assay controls for the Fpg- and hOGG1-modified comet assay. *Mutagenesis*. 2018 Feb 24;33(1):9-19.

Nelson DL, Cox MM. Princípios de bioquímica de Lehninger. Artmed. 6ª Ed. Porto Alegre: Artmed; 2014.

Nishikawa T, Sasahara T, Kiritoshi S, Sonoda K, Senokuchi T, Matsuo T, Kukidome D, Wake N, Matsumura T, Miyamura N, Sakakida M, Kishikawa H, Araki E. Evaluation of urinary 8-hydroxydeoxy-guanosine as a novel biomarker of macrovascular complications in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2003; 26:1507-12.

Oishi K, Konishi T, Hashimoto C, Yamamoto S, Takahashi Y, Shiina Y. Dietary fish oil differentially ameliorates high-fructose diet-induced hepatic steatosis and hyperlipidemia in mice depending on time of feeding. *Nutr Biochem*. 2018; 52:45-53.

Page KA, Chan O, Arora J, Belfort-Deaguiar R, Dzuira J, Roehmholdt B, Cline GW, Naik S, Sinha R, Constable RT, Sherwin RS. Effects of fructose vs glucose on regional cerebral blood flow in brain regions involved with appetite and reward pathways. *JAMA*. 2013 Jan 2;309(1):63-70.

Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF). Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil. IBGE. Rio de Janeiro; 2011.

Pichaud, N; Garratt, M; Ballard, J.W; Brooks, R.C. Physiological adaptations to reproduction. II. Mitochondrial adjustments in livers of lactating mice. *J Exp Biol*,v. 216, p. 2889–2895, 2013.

Pool BL, Röper H, Röper S, Romruen K. Mutagenicity studies on N-nitrosated products of the Maillard browning reaction: N-nitroso-fructose-amino acids. *Food Chem Toxicol*. 1984 Oct;22(10):797-801.

Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med*. 1976; 295(7):349–353.

Regnault TR1, Gentili S, Sarr O, Toop CR, Sloboda DM. Fructose, pregnancy and later life impacts. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013 Nov;40(11):824-37.

Rodríguez L, Panadero MI, Rodrigo S, Roglans N, Otero P, Álvarez-Millán JJ, Laguna JC, Bocos C. Liquid fructose in pregnancy exacerbates fructose-induced dyslipidemia in adult female offspring. *J Nutr Biochem*. 2016 Jun;32:115-22.

Rorabaugh JM, Stratford JM, Zahniser NR. Differences in bingeing behavior and cocaine reward following intermittent access to sucrose, glucose or fructose solutions. *Neuroscience*. 2015 Aug 20;301:213-20.

Ross PJ, Canovas S. Mechanisms of epigenetic remodelling during preimplantation development. *Reprod Fertil Dev*. 2016;28(1-2):25-40.

Rovenko BM, Kubrak OI, Gospodaryov DV, Yurkevych IS, Sanz A, Lushchak OV, Lushchak VI. Restriction of glucose and fructose causes mild oxidative stress independently of mitochondrial activity and reactive oxygen species in *Drosophila melanogaster*. *Comp Biochem Physiol*. 2015; 187, 27–39.

Rovenko BM, Kubrak OI, Gospodaryov DV, Yurkevych IS, Sanz A, Lushchak OV, Lushchak VI. Restriction of glucose and fructose causes mild oxidative stress independently of mitochondrial activity and reactive oxygen species in *Drosophila melanogaster*. *Comp Biochem Physiol*. 2015; 187: 27–39.

Sariozkan S, Bucak MN, Canturk F, Ozdamar S, Yay A, Tuncer PB, Servet O, Neslihan S, Caner Y. The effects of different sugars on motility, morphology and DNA damage during the liquid storage of rat epididymal sperm. *Cryobiology*. 2012; 65:93–97.

Setayesh T, Nersesyan A, Mišík M, Ferk F, Langie S, Andrade VM, Haslberger A, Knasmüller S. Impact of obesity and overweight on DNA stability: Few facts and many hypotheses. *Mutat Res*. 2018; 777:64-91.

Shortliffe LM, Hammam O, Han X, Kouba E, Tsao PS, Wang B. Dietary fructose in pregnancy induces hyperglycemia, hypertension, and pathologic kidney and liver changes in a rodent model. *Pregnancy Hypertens*. 2015 Oct;5(4):308-14.

Sil R, Ray D, Chakraborti AS. Glycyrrhizin ameliorates metabolic syndrome-induced liver damage in experimental rat model. *Mol Cell Biochem*. 2015 Nov;409(1-2):177-89.

Sil R, Ray D, Chakraborti AS. Glycyrrhizin ameliorates metabolic syndrome-induced liver damage in experimental rat model. *Mol Cell Biochem*. 2015 Nov;409(1-2):177-89.

Silveira PP, Portella AK, Goldani MZ, Barbieri MA. Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD). *J. Pediatr*, 2007: 83 (494-504).

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988; 175(1):184-91.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia - Volume 84, Suplemento I, Abril 2005*

Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, Hatcher B, Cox CL, Dyachenko A, Zhang W. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases

insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J. Clin. Investig.* 2009; 119:1322–1334.

Tain YL, Chan JY, Hsu CN. Maternal fructose intake affects transcriptome changes and programmed hypertension in offspring in later life. *Nutrients* 2016;8:E757.

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

Tappy L. Fructose metabolism and noncommunicable diseases: recent findings and new research perspectives. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2018; 5.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu, J. C.; Sasaki, Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000; 35(3):206-21.

Toop CR, Gentili S. Fructose Beverage Consumption Induces a Metabolic Syndrome Phenotype in the Rat: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients.* 2016 Sep 20;8(9).

Topping DL, Mayes PA. The immediate effects of insulin and fructose on the metabolism of the perfused liver. Changes in lipoprotein secretion, fatty acid oxidation and esterification, lipogenesis and carbohydrate metabolism. *Biochem J.* 1972; 126(2): 295-311.

Tran NT, Alexandre-Gouabau MC, Pagniez A, Ouguerram K, Boquien CY, Winer N, Darmaun D. Neonatal Citrulline Supplementation and Later Exposure to a High Fructose Diet in Rats Born with a Low Birth Weight: A Preliminary Report. *Nutrients.* 2017; 11(9): 375.

Trout KK, Wetzal-Effinger L. Flavor learning in utero and its implications for future obesity and diabetes. *Curr Diab Rep.* 2012 Feb;12(1):60-6.

United States Department of Agriculture (USDA). Sugar and Sweeteners Yearbook Tables. Other Recommended Data Products. 2009.

Wajchenberg BL, Santomauro ATMG, Nery M, Santos RF, Silva MELR, Ursich MJM, Rocha DM. Resistência à Insulina: Métodos Diagnósticos e Fatores que Influenciam a Ação da Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 1999; 43 (2):76-85.

Wang X, Defa L, Guoyao W, Bazer FW. Functional Roles of Fructose: Crosstalk between O-Linked Glycosylation and Phosphorylation of Akt-TSC2-MTOR Cell Signaling Cascade in Ovine Trophectoderm Cells. *Biol Reprod.* 2016; 95(5):102.

Wang YM, Van EYSJ. Nutritional significance of fructose and sugar alcohols. *Rev Nutr.* 1981; 1:437-75, 1981.

Weeden CE, Asselin-Labat ML. Mechanisms of DNA damage repair in adult stem cells and implications for cancer formation. *Molecular Basis of Disease*. 2017; 89–101.

Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1981;77:325-33.

White CE, Piper EL, Noland PR, Daniels LB. Fructose utilization for nucleic acid synthesis in the fetal pig. *J Anim Sci*. 1982; 55(1):73-6.

Woodside, B. Prolactin and the hyperphagia of lactation. *Physiol Behav*. 2007;91(375–382), 2007.

Yamada-Obara N, Yamagishi SI, Taguchi K, Kaida Y, Yokoro M, Nakayama Y, Ando R, Asanuma K, Matsui T, Ueda S, Okuda S, Fukami K. Maternal exposure to high-fat and high-fructose diet evokes hypoadiponectinemia and kidney injury in rat offspring. *Clin Exp Nephrol*. 2016 Dec;20(6):853-861.

Yamamoto JM, Kellett JE, Balsells M, García-Patterson A, Hadar E, Solà I, Gich I, van der Beek EM, Castañeda-Gutiérrez E, Heinonen S, Hod M, Laitinen K, Olsen SF, Poston L, Rueda R, Rust P, van Lieshout L, Schelkle B, Murphy HR, Corcoy R. Gestational Diabetes Mellitus and Diet: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials Examining the Impact of Modified Dietary Interventions on Maternal Glucose Control and Neonatal Birth Weight. *Diabetes Care*. 2018 Jul;41(7):1346-1361

Zaki SM, Abdel Fattah S, Hassan DS. The differential effects of high-fat and high fructose diets on the liver of male albino rat and the proposed underlying mechanisms. *Folia Morphol (Warsz)*. 2018.

Zhao XJ, Yu HW, Yang YZ, Wu WY, Chen TY, Jia KK, Kang LL, Jiao RQ, Kong LD. Polydatin prevents fructose-induced liver inflammation and lipid deposition through increasing miR-200a to regulate Keap1/Nrf2 pathway. *Redox Biol*. 2018 Sep;18:124-137.

Zhang DM, Jiao RQ, Kong LD. High Dietary Fructose: Direct or Indirect Dangerous Factors Disturbing Tissue and Organ Functions. *Nutrients*. 2017; 9: 335.

Zheng J, Feng Q, Zhang Q, Wang T, Xiao X. Early Life Fructose Exposure and Its Implications for Long-Term Cardiometabolic Health in Offspring. *Nutrients*. 2011,1;8(11).

Zou M, Arentson EJ, Teegarden D, Koser SL, Onyskow L, Donkin SS. Fructose consumption during pregnancy and lactation induces fatty liver and glucose intolerance in rats. *Nutr Res*. 2012 Aug;32(8):588-98.

ANEXO

ANEXO A



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de 28/11/2017.

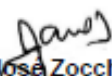
Título do projeto	Efeitos genéticos e bioquímicos do consumo de frutose sobre a prole de camundongos swiss tratados durante a gravidez e lactação.
Project title	Genetic and biochemical effects of fructose consumption on the offspring of swiss mice treated during pregnancy and lactation.
Número do protocolo Protocol number	028/2017-2 – Versão 02
Pesquisador principal Principal Investigator	Vanessa Moraes de Andrade
Pesquisadores Researchers	Marina Lummertz Magenis, Luiza Martins Longaretti, Jessica Aparecida Luciano, Gabriel Paulino Luiz, Pâmela de Souza Marcos, Adriani Paganini Damiani

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica	
Vigência da autorização	15/02/2018 a 30/05/2018	
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico Swiss	
Nº de animais	30	60
Idade/Peso	Matriz (60 dias) /30-35g	Neonatos até 30 dias / 5 – 35g
Gênero	Masc. (15) Fem (15)	Masc. (30) Fem (30)
Origem	Biotério UNESC	

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.

May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Criciúma, 28 de novembro de 2017.


Jairo José Zocche
Coordenador da CEUA