



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

Priscila Viana Carapeto

Consequências da dieta rica em frutose parental, ou só materna, ou só paterna no metabolismo hepático da prole adulta de machos

Rio de Janeiro
2018

Priscila Viana Carapeto

**Consequências da dieta rica em frutose parental, ou só materna, ou só paterna
no metabolismo hepático da prole adulta de machos**

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

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

Rio de Janeiro

2018

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

C261 Carapeto, Priscila Viana.
Consequências da dieta rica em frutose parental, ou só materna, ou só paterna no metabolismo hepático da prole adulta de machos / Priscila Viana Carapeto. – 2018.
74 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarin de Lacerda

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

1. Frutose – Teses. 2. Fígado - Teses. 3. Metabolismo - Teses. 4. Inflamação - Teses. I. Lacerda, Márcia Barbosa Águila Mandarin de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.36-003.826

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Priscila Viana Carapeto

**Consequências da dieta rica em frutose parental, ou só materna, ou só paterna
no metabolismo hepático da prole adulta de machos**

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

Aprovada em 28 de fevereiro de 2018.

Banca Examinadora:

Prof^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarin de Lacerda (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^a Dra Alessandra da Rocha Pinheiro Mulder

Instituto de Nutrição - UERJ

Prof^a Dra Lucia Gomes Rodrigues

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Às pessoas mais importantes da minha vida: minha vó, minha mãe, meu irmão e
minha irmã.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Apressa o passo. Pula umas pedras pelo caminho e vai. Um sorriso aberto feito sol de verão que inaugura o dia. Lembra da menina que era ainda em outras primaveras. Quem inaugurava agora, era ela. Estampa o rosto de mudança. Percebe o tamanho das pernas. Prontas para pular. Agora abismos. Essa era sua especialidade. Pulos. Sempre em frente. Depois de muito tempo, ela agora sabia bem onde queria chegar.

Vanessa Leonardi

RESUMO

CARAPETO, Priscila Viana. *Consequências da dieta rica em frutose parental, ou só materna, ou só paterna no metabolismo hepático da prole adulta de machos*. 2018. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

O estudo teve como objetivo avaliar as consequências da dieta materna e paterna rica em frutose (HFR) sobre a prole adulta de machos. Os progenitores foram alimentados com dieta HFR ou dieta controle (C) por oito semanas antes do acasalamento até o desmame da prole. Após o desmame, proles (identificados primeiro pela dieta da mãe, depois pela dieta do pai) só receberam dieta C até os três meses de idade. Progenitores: a pressão arterial (PA) foi maior no grupo HFR, em comparação com seus controles (pai +27%, mãe +35%, $P < 0,0001$). Os progenitores HFR apresentaram massa hepática maior (pai +15%, mãe +18%, $P = 0,0290$), maior triglicerídeo hepático (Pai +89%, mãe +41%, $P < 0,0001$), hipercolesterolemia (pai + 25%, mãe +24%, $P = 0,0158$), hipertrigliceridemia (pai +45%, mãe +39%, $P < 0,001$), leptina aumentada e menor adiponectina no plasma (Leptina: pai +68% mãe +55%, $P < 0,0001$; Adiponectina: pai -6%, $P = 0,018$, mãe -21%, $P < 0,0001$). Proles: em comparação com o grupo C/C, o grupo HFR/HFR apresentou aumento da pressão arterial sistêmica; os grupos C/HFR, HFR/C e HFR/HFR mostraram maior ácido úrico e leptina e menor adiponectina no plasma. O grupo HFR/HFR mostrou maiores marcadores de inflamação hepática (NF κ -B, SOCS3, JNK, TNF-alfa, IL1-beta e IL-6). O grupo HFR/HFR mostrou aumento de SREBPB1c e FAS. Em conclusão, o estudo demonstra que tanto a mãe quanto o pai, individualmente ou em combinação, alimentados com dieta HFR podem afetar o metabolismo e o fígado da prole macho adulta. A combinação da dieta HFR materna e paterna aumentou os efeitos adversos na saúde da prole e teve outras consequências na programação da prole que a mãe e o pai sozinhos não expressaram.

Palavras-chave: Programação paterna. Programação materna. Dieta rica em frutose. Fígado. Inflamação.

ABSTRACT

CARAPETO, Priscila Viana. *Consequences of the fructose rich diet parental, or only maternal, or only paternal in the hepatic metabolism of adult male offspring*. 72p. Dissertation (Master's Degree in Human and Experimental Biology) - Roberto Alcantara Gomes Biology Institute, The University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 2018.

The study aimed to evaluate the consequences of feeding high-fructose diet (HFR) to mother or father, and to both mother and father, on progeny. Parents received HFR or control diet (C) for eight weeks before mating until weaning. After weaning, pups (identified first by the mother's diet, then by the father's diet) only received C diet until three months of age. Parents: blood pressure (BP) was higher in HFR parents, compared to their controls (father +27%, mother +35%, $P < 0.0001$). The HFR parents, had an enlarged liver (father +15%, mother +18%, $P = 0.0290$), greater hepatic triacylglycerol content (father +89%, mother +41%, $P < 0.0001$), hypercholesterolemia (father +25%, mother +24%, $P = 0.0158$), hypertriglyceridemia (father +45%, mother +39%, $P < 0.001$), higher plasmatic leptin and lower adiponectin (Leptin: father +68%, mother +55%, $P < 0.0001$; Adiponectin: father -6%, $P = 0.018$, mother -21%, $P < 0.0001$). Offspring: compared to C/C, HFR/HFR had high BP; C/HFR, HFR/C, and HFR/HFR showed higher uric acid and leptin, and lower adiponectin. HFR/HFR showed higher liver inflammation markers (NF κ -B, SOCS3, JNK, TNF-alpha, IL1-beta, and IL-6). HFR/HFR showed an increase of both SREBPB1c and FAS. In conclusion, the study can demonstrate that both mother and father, individually, or in combination fed a HFR diet may affect the metabolism and liver in the adult male progeny. The combination of mother and father HFR enhanced the adverse effects on the offspring health and had other consequences in the offspring programming than the mother and father alone.

Keywords: Father programming. Mother programming. High-fructose diet. Liver. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Modelo integrado de detecção de nutrientes pela placenta e demanda fetal.....	24
Figura 2 –	Principais alterações epigenéticas na programação fetal.....	27
Figura 3 –	Absorção de frutose e formação de ácido úrico.....	33
Figura 4 –	Desenho esquemático dos grupos experimentais.....	37
Figura 5 –	Marcadores de inflamação (NFκB, SOCS3, JNKp).....	52
Figura 6 –	Marcadores de inflamação (TNF-α, IL-6).....	53
Figura 7 –	Marcadores de inflamação (IL-1β).....	53
Figura 8 –	Marcadores de lipogênese (SREBP1c, ChREBP).....	54
Figura 9 –	Marcadores de lipogênese (PPAR-γ, FAS).....	55
Figura 10 –	Marcadores de beta-oxidação (PPAR-α, CPT-1).....	56
Figura 11 –	Mecanismo hipotético pelo qual a dieta parental rica em frutose pode programar proles adultas masculinas.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição das dietas experimentais.....	36
Tabela 2 –	Primers utilizados no RT-qPCR e suas respectivas sequências...	43
Tabela 3 –	Dados biométricos e bioquímicos dos progenitores.....	46
Tabela 4 –	Dados biométricos e bioquímicos das proles.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
ACL	ATP citrato liase
ADP	Adenosina difosfato, <i>adenosine diphosphate</i>
AMP	Adenosina monofosfato, <i>adenosine monophosphate</i>
AMPK	Proteína quinase ativada pelo AMP, <i>AMP-activated protein kinase</i>
ATP	Adenosina trifosfato, <i>adenosine triphosphate</i>
BPM	Membrana plasmática basal, <i>basal plasma membrane</i>
C	Controle
ChREBP	Proteína ligante a elemento responsivo ao carboidrato, <i>carbohydrate response element-binding protein</i>
CpG	Citosina-fosfato-guanina
CPT1	Carnitina palmitoil transferase 1, <i>carnitine palmitoyltransferase 1</i>
CT	Colesterol total
DHAP	Diidroxiacetona-fosfato, <i>dihydroxyacetone phosphate</i>
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico, <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNAc	DNA complementar
DNMT	Metiltransferases de DNA, <i>DNA methyltransferase</i>
EHNA	Esteatohepatite não alcoólica
EROS	Espécies reativas de oxigênio
F1F	Frutose-1-fosfato
F6F	Frutose-6-fosfato
FAS	Ácido graxo sintetase, <i>fatty acid synthase</i>
PF2A	Proteína fosfatase 2A
GA3P	Gliceraldeido-3-fosfato, <i>glyceraldehyde 3-phosphate</i>
GLUT	Transportador de glicose, <i>glucose transporter</i>
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade, <i>high density lipoprotein</i>

HFR	Rica em fructose, <i>High fructose</i>
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1, <i>Insulin-like growth factor 1</i>
IL	Interleucina
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
JNKp	JNK fosforilada
JNKt	JNK total
LDL	Lipoproteína de baixa densidade, <i>low density lipoprotein</i>
Malonil-CoA	Malonil coenzima A
MAP-quinase	Proteína-quinases ativadas por mitógenos, <i>mitogen Activated Protein Kinases</i>
MiRNA	Micro RNA
MVM	Membrana microvilar, <i>microvillous plasma membrane</i>
NFκB	Fator nuclear-κB, <i>nuclear fator-κB</i>
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo, <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
PA	Pressão arterial
PF2A	Proteína fosfatase 2A
PGC	Co-ativador do ativador de proliferação peroxissomal gama, <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator</i>
PPAR	Receptor ativador de proliferação peroxissomal, <i>peroxisome proliferatoractivated receptor</i>
RNA	Ácido ribonucleico, <i>ribonucleic acid</i>
RNAm	RNA mensageiro
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real
SOCS3	Proteína supressora de sinalização de citocina 3, <i>suppressor of cytokine signaling 3</i>
SREBP-1c	Proteína ligante de elemento regulador de esterol-1c, <i>sterol regulatory elemento-binding protein-1c</i>
ST	Sinciciotrofoblasto
TAB	Tecido adiposo branco
TG	Triglicerídeos

TNF- α Fator de necrose tumoral- α , *tumor necrosis fator- α*
TOTG Teste oral de tolerância à glicose

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DA LITERATURA	19
1.1	Programação Fetal	19
1.1.1	<u>Estudo cronológico</u>	19
1.1.2	<u>Regulação placentária</u>	22
1.1.3	<u>Mecanismo epigenético</u>	24
1.1.4	<u>Programação da função hepática</u>	27
1.2	Frutose	30
2	OBJETIVOS	34
2.1	Gerais	34
2.2	Específicos	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	Animais e dieta	35
3.2	Massa corporal, ingestão alimentar e ingestão hídrica	37
3.3	Pressão arterial	38
3.4	Glicemia de jejum e Teste oral de tolerância à glicose	38
3.5	Eutanásia	38
3.6	Análises bioquímicas do fígado	39
3.7	Análises plasmáticas	40
3.8	Western blot (WB)	40
3.9	Isolamento de RNA e PCR em tempo real	41
3.10	Análise estatística	43
4	RESULTADOS	44
4.1	Dados dos progenitores	44
4.1.1	<u>Massa corporal, ingestão alimentar e ingestão hídrica</u>	44
4.1.2	<u>Pressão arterial</u>	44
4.1.3	<u>Glicemia de jejum e Teste oral de tolerância à glicose</u>	44
4.1.4	<u>Massa hepática e análises bioquímicas do fígado</u>	45
4.1.5	<u>Análises plasmáticas</u>	45
4.2	Proles	47

4.2.1	<u>Massa corporal, ingestão alimentar e ingestão hídrica</u>	47
4.2.2	<u>Pressão arterial</u>	47
4.2.3	<u>Glicemia de jejum e Teste oral de tolerância à glicose</u>	47
4.2.4	<u>Massa hepática e análises bioquímicas do fígado</u>	47
4.2.5	<u>Gorduras visceral e subcutânea</u>	48
4.2.6	<u>Análises plasmáticas</u>	48
4.2.7	<u>WB e RT-qPCR</u>	51
4.2.7.1	Marcadores de inflamação.....	51
4.2.7.2	Marcadores de lipogênese.....	54
4.2.7.3	Marcadores de beta-oxidação.....	54
5	DISCUSSÃO	57
	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64
	ANEXO – Comitê de ética	72
	APÊNDICE A – Artigo publicado	73
	APÊNDICE B – Submissão de artigo	74

INTRODUÇÃO

A frutose é uma hexose de fórmula química semelhante à glicose, encontrada nos alimentos na forma de açúcar simples ou como um componente da sacarose (glicose – frutose) (Tappy *et al.*, 2010). A sacarose manteve-se o edulcorante quase exclusivo a ser consumido até a década de 1960, quando a indústria alimentícia desenvolveu e colocou em uso tecnologias que permitiram a extração do amido de milho, isolamento da glicose e conversão de parte da glicose na frutose através da isomerização enzimática (Johnson *et al.*, 2009; Abdelmalek *et al.*, 2010).

O isolamento industrial da frutose fez com que seu preço reduzisse drasticamente e incentivou a introdução comercial de xaropes de milho ricos em frutose nos alimentos processados. De todos os açúcares, a frutose tem o maior poder edulcorante, além de ser um bom umectante e contribuir para dar cor e aroma agradável aos alimentos. Estas características unidas ao baixo custo de produção tornaram-se atrativos para a sua utilização em larga escala na indústria alimentícia (Bray *et al.*, 2004).

Os efeitos adversos do consumo de açúcar para a saúde têm sido uma questão de grande interesse público e científico. Durante décadas, observou-se que uma alta ingestão de açúcar estaria associada ao desenvolvimento de obesidade, diabetes tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares (Johnson *et al.*, 2009). Dado os diferentes destinos metabólicos que diferenciam a frutose da glicose, a atenção recente tem focado na frutose como protagonista na etiologia dessas doenças crônicas (Tappy *et al.*, 2010).

Achados recentes mostram que o consumo agudo de frutose modula os níveis plasmáticos de lipídios em indivíduos saudáveis, além de provocar aumento significativo de lipoproteína de alta densidade (HDL, high density lipoprotein) com um aumento simultâneo da lipoproteína de baixa densidade (LDL, low density lipoprotein) em comparação com glicose e sacarose (Jameel *et al.*, 2014). Adicionalmente, o consumo crônico de frutose está relacionado ao desenvolvimento de comorbidades associadas à síndrome metabólica, como o estresse oxidativo, disfunção endotelial e doença hepática gordurosa não alcoólica ou DHGNA (Johnson *et al.*, 2009).

Explicações para estes achados se devem em parte ao metabolismo da frutose ser distinto da glicose. Antes de convergir com a via glicolítica, o metabolismo inicial da frutose envolve a fosforilação da frutose em frutose-1-fosfato (F1F) pela frutoquinase que, ao contrário da glucoquinase, é específica e não é limitada. A absorção maciça e posterior fosforilação da frutose no fígado também leva à uma diminuição de adenosina trifosfato (ATP, trifosfato de adenosina) intracelular, ocasionando um conseqüente aumento de ácido úrico, culminando com complicações metabólicas (Abdelmalek et al., 2010).

Adicionalmente, o excesso da ingestão de frutose gera um aumento da produção de acetil-coenzima A (acetil-CoA) que acaba não sendo metabolizado pelo ciclo tricarboxílico e irá se acumular no citoplasma. Este excedente de acetil-CoA servirá como um substrato para a lipogênese de novo, sendo convertida em malonil-CoA pela enzima acetil-Coa carboxilase, o que irá inibir a β -oxidação mitocondrial (Lim et al., 2010).

Embora ocorra esta associação da frutose com ativação da via da lipogênese, os mecanismos moleculares subjacentes à transição do consumo de frutose e progressões na DHGNA não são completamente compreendidos.

DHGNA é a atual causa mais comum de doença hepática crônica para adultos no mundo (Younossi et al., 2011) e sua prevalência tem aumentado entre as crianças. O primeiro caso relatado da doença no grupo pediátrico foi em 1983 (Moran et al., 1983) e atualmente é a forma mais prevalente de doença hepática crônica na infância e na adolescência, afetando aproximadamente 10% a 20% desta faixa etária (Temple et al., 2016). A história natural da DHGNA em pediatria é desconhecida, sugerindo que eventos pré-natais estão relacionados à progressão da doença e a conseqüente evolução para a esteatohepatite não alcoólica ou EHNA na vida adulta.

O processo pelo qual os fatores atuantes no início da vida influenciam a saúde da prole na idade adulta é definido como programação metabólica, e é considerado um mecanismo chave para a instalação de fenótipos adversos na prole (Barker, 1995; Langley-Evans, 2009). Assim, afim de entender e demarcar os mecanismos associados à alterações fetais, diversos modelos experimentais são utilizados, nos quais o ambiente hormonal e metabólico durante o período pré-natal ou pós-natal é alterado através de mudanças do estado nutricional materno.

Estudos com roedores demonstraram que a mudança no metabolismo gestacional da mãe pode afetar o desenvolvimento placentário e embrionário, resultando em maior influxo de nutrientes via placenta para o feto, fato que influencia o seu crescimento e resulta em adaptações irreversíveis na estrutura e função de órgãos e sistemas, como fígado (Bruce et al., 2009; Gregorio et al., 2010; Volpato et al., 2012).

Pesquisadores documentam que a administração neonatal de dieta hiperlipídica promove aumento no tamanho e acúmulo de gotículas de gordura no fígado, configurando o quadro de DHGNA (Bayol et al., 2010; Oben et al., 2010). Embora essa característica seja inicialmente benigna e assintomática, a esteatose hepática representa a lesão primária para o desenvolvimento de entidades patológicas mais graves como a cirrose hepática e o hepatocarcinoma (Paredes et al., 2012).

A maioria dos estudos epidemiológicos e experimentais concentram suas atenções para a influência materna sobre a saúde da prole. No entanto, experimentos recentes realizados com roedores também demonstraram a influência paterna na programação metabólica da prole adulta (Ng et al., 2010).

Em 2010, um estudo experimental com progenitores alimentados com dieta restrita em proteínas, identificou que a expressão hepática de genes envolvidos na proliferação e na biossíntese do colesterol nas proles é sensível à dieta paterna e que tais alterações poderiam ser explicadas pela epigenética, uma vez que constatou-se modificação na cromatina e no empacotamento do genoma no esperma (Carone et al., 2010). Entretanto os mecanismos que possam elucidar a influência paterna sobre a descendência ainda não são totalmente conhecidos.

Adicionalmente, no âmbito epidemiológico, uma investigação realizada com a população base de um estudo denominado Framingham Offspring Study demonstrou a importância da saúde paterna na programação fetal, sugerindo que os pais poderiam transmitir suas características com força similar das mães. As conclusões do estudo apontaram para taxas de risco equivalente tanto para a programação materna como para a programação paterna no desenvolvimento de DM2 nos filhos (Meigs et al., 2000).

Diante do grande consumo de produtos industrializados ricos em xarope de milho com alto teor de frutose por crianças e adolescentes, pesquisas mais atuais tem avaliado os efeitos da exposição à dieta rica em frutose em fase inicial de

desenvolvimento e durante gestação. Os resultados incluem hipertrigliceridemia, hipertensão arterial sistêmica (HAS), hiperinsulinemia e infiltrados de gordura hepática (Rodriguez et al., 2016a; Rodriguez et al., 2016b; Tain et al., 2016). Porém, pouco se sabe sobre alterações hepáticas dos filhotes relacionadas ao consumo crônico de frutose, sobretudo no que concerne à programação paterna e à programação parental (relativa à ambos os progenitores).

Diante do exposto, a hipótese deste trabalho é que uma dieta rica em frutose administrada desde o período de pré-acasalamento afetará o metabolismo e o desenvolvimento do fígado na prole adulta de machos.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Programação Fetal

1.1.1. Estudo cronológico

O século XX testemunhou grandes mudanças nos padrões de mortalidades em todo o mundo, com reduções de mortes por doenças infecciosas e um aumento de doenças crônicas não transmissíveis (Barker, 1989). Com isso, cresceu o número de estudos epidemiológicos com o objetivo de caracterizar as causas para as mudanças observadas. Sugeriu-se que muitos fatores ambientais e de nutrição do passado estariam relacionados com efeitos permanentes na morfologia, função e metabolismo de órgãos e que se manifestariam durante o presente.

No final da década de 60, um estudo demonstrou um risco aumentado de sobrepeso tardio na infância de crianças nascidas de mães diabéticas, o que confirmou uma relação entre ambiente materno e saúde da prole (Farquhar, 1969). Em sequência, na década de 70, foi observado que o diabetes materno também era capaz de aumentar o risco de tolerância à glicose e desenvolvimento de diabetes na prole (Amendt et al., 1976). Posteriormente, estudos demonstraram que o DM2 é predominantemente transmitido ao longo das gerações através de linhas maternas, mas não paternas, uma vez que a incidência de DM2 na avó materna de descendentes de terceira geração com diabetes juvenil foi significativamente maior em comparação com as suas homólogas paternas (Dorner et al., 1987).

Seguindo os achados, na década de 80, estudos retrospectivos observaram que municípios noruegueses mostravam uma correlação positiva significativa entre as taxas de mortalidade por doenças cardíacas em pessoas com idade entre 40 e 69 anos e taxas de pobreza e desnutrição na infância e adolescência dos mesmos (Forsdahl, 1977). Estes achados sugeriram que o acometimento da desnutrição durante a fase de desenvolvimento era um fator de risco na saúde cardiovascular em fase adulta.

Na década de 90, observações dos registros de nascimentos no Reino Unido, indicaram correlação geográfica entre mortalidade infantil e maior prevalência de obesidade e síndrome metabólica nas regiões mais desfavorecidas (Barker e Osmond, 1986). Estes dados corroboraram com achados anteriores e levaram à conclusão que o desenvolvimento de doenças crônicas na idade adulta estaria influenciado pelo período inicial de vida, especialmente através da nutrição inadequada disponível durante a vida intrauterina (Barker, 1995).

A partir de então, consolidou-se a “Hipótese da Programação Fetal” (ou “Programação Intrauterina para Doenças da Vida Adulta” ou ainda “Hipótese de Barker”), definida como fenômeno através do qual insultos durante um período crítico do desenvolvimento resultam em alterações morfológicas, fisiológicas e metabólicas permanentes (Barker, 1995).

Como explicação para os dados observados, postulou-se que quando o suprimento nutricional fetal é menor que a demanda, o feto se adapta para a sobrevivência durante a gestação, resultando em uma redistribuição do fluxo sanguíneo para poupar o cérebro à custa de outros órgãos, que por sua vez alteraria a estrutura, o metabolismo, a fisiologia e o ambiente hormonal das áreas afetadas de forma a programar um aumento de doença crônica após o nascimento (Barker, 1995).

Seguidamente, a hipótese foi aplicada em estudos de casos do “Inverno da Fome Holandês”, um embargo de sete meses de alimentos imposto pela Alemanha. Resultados observados permitiram caracterizar consequências de insultos maternos nas diferentes fases de gestação, avançando com as teorias de programação. Assim, quando a mãe foi exposta a fome durante o primeiro e o segundo trimestre de gestação, os filhos quando adultos apresentaram obesidade, perfil lipídico aterogênico e alto risco de doença cardiovascular (Ravelli et al., 1999). Inversamente, a desnutrição materna no terceiro trimestre foi correlacionada com baixo peso na prole adulta e intolerância à glicose (Roseboom et al., 2001).

Como retratado, a desnutrição materna durante a gravidez foi um fator bem estudado como insulto da programação fetal. No entanto, o crescente fardo global da obesidade no início do século XXI representou um grande desafio para a saúde pública (Jehn e Brewis, 2009), redirecionando as pesquisas.

Por conseguinte, estudos epidemiológicos e experimentais concentraram suas atenções nas consequências da obesidade materna durante a gestação e

lactação sobre a saúde da prole. Resultados de pesquisas demonstraram que os sistemas fetais mais vulneráveis à programação nociva foram o sistema nervoso central e o sistema cardiometabólico (um fenômeno denominado "impressão metabólica") (Sullivan et al., 2011), contribuindo para a retratada epidemia de obesidade infantil e distúrbios metabólicos em idade adulta (Heerwagen et al., 2010).

Embora a programação do desenvolvimento de disfunções na prole pela mãe seja amplamente aceita, ao longo das últimas duas décadas se tornou cada vez mais evidente que a programação paterna também pode acontecer. Esta compreensão partiu do consenso de que a obesidade masculina altera os hormônios sexuais, a composição molecular e a função dos espermatozoides (Kasturi et al., 2008), conduzindo pesquisadores a presumirem impactos fetais.

Em vista disto, estudos epidemiológicos concluíram que além da interrupção do desenvolvimento embrionário e do progresso da gravidez precoce, pais obesos são mais propensos a ter filhos obesos (Whitaker et al., 1997). Em roedores, a obesidade paterna induzida por alto teor de gordura na dieta foi capaz de alterar permanentemente a resistência à insulina da prole feminina através da alteração epigenética da função das células beta (Ng et al., 2010).

Em conjunto, há evidências claras de que os fatores nutricionais paternos são capazes de residir em espermatozoides portadores de informação epigenética, programando as células germinativas que serão transmitidas aos descendentes, resultando em padrões modificados de expressão fenotípica mais tarde na vida (Chong et al., 2007).

O epigenoma do espermatozoide era tradicionalmente considerado insignificante, uma vez que se postulava que o seu perfil de metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA, deoxyribonucleic acid) era apagado imediatamente após a fecundação. No entanto, nos últimos anos, tem havido um aumento no número de casos notificados de herança epigenética aparente através da linha germinal masculina, sugerindo que este epigenoma pode transmitir informações entre as gerações (Chen et al., 2012; Gapp et al., 2014).

Em função dos crescentes achados, a hipótese da programação foi atualizada, postulando que genes maternos e paternos podem influenciar o esperma maturante, o oócito e, posteriormente, o embrião/feto, levando à sua alteração epigenética (Hochoer, 2014). Logo, o fenótipo observado da prole pode ser alterado

por genes maternos e/ou paternos independentes do genoma fetal (Ornellas et al., 2017).

1.1.2. Regulação placentária

As alterações na nutrição e no metabolismo dos progenitores, o fluxo sanguíneo uteroplacentário restrito e perturbações no compartimento materno podem perturbar os períodos críticos de desenvolvimento fetal, resultando em maior susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças na infância e na vida adulta (Jansson e Powell, 2013). Neste contexto, a placenta desempenha um papel crítico na modulação da alocação de recursos materno-fetal, afetando assim o crescimento e a saúde da prole.

A placenta é um tecido endócrino dinâmico que constitui a interface ativa entre as circulações de sangue materno e fetal e é responsável por uma multiplicidade de funções críticas para o desenvolvimento do feto, incluindo o transporte de nutrientes, a produção de hormônios e o fornecimento de uma barreira imunológica (Nugent e Bale, 2015). Evidências sugerem que distúrbios na fisiologia materna influenciam a estrutura e a função da placenta, levando a mudanças em fluxos sanguíneos uteroplacentários e umbilicais, na área de troca disponível, espessura de barreira, metabolismo placentário, gradientes de concentração e expressão/atividade do transportador na barreira placentária (Carter, 2009). Assim, a placenta responde e modula perturbações no ambiente materno, desempenhando um papel fundamental na transmissão dos estímulos de programação para o feto.

Os capilares placentários fetais são tipicamente contínuos, o que permitiria a passagem irrestrita de moléculas do tamanho da glicose e aminoácidos através de espaços intercelulares, e restringiria a transferência de grandes moléculas, como imunoglobulinas (Gaccioli et al., 2013). No entanto, o sinciciotrofoblasto (ST), funciona como principal barreira que limita a transferência de moléculas. Em humanos, ST é formado por duas camadas de membrana de plasma polarizadas: uma membrana microvilar (MVM, microvillous plasma membrane) voltada para a mãe, e outra membrana plasmática basal (BPM, basal plasma membrane) orientada para a circulação fetal (Gaccioli et al., 2013); fundamentais para o desenvolvimento

e crescimento do feto – à medida que determinam o suprimento nutricional fetal e secretam uma série de hormônios e moléculas de sinalização na circulação materna (Jansson e Powell, 2006).

Um grande número de transportadores de glicose, aminoácidos, ácidos graxos, íons e micronutrientes são expressos e ativos em MVM e BPM (Lager e Powell, 2012).

A restrição de nutrientes em humanos e modelos animais diminui os níveis circulantes de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I), leptina e insulina e aumenta as concentrações séricas de adiponectina no soro. Em contrapartida, concentração inversas foram observados em casos de obesidade materna. Assim, os níveis desses hormônios na circulação materna transmitirão informações críticas para a placenta em relação à capacidade da linha de suprimento materno para alocar nutrientes ao crescimento fetal (Jansson e Powell, 2013).

De uma maneira geral, os receptores da maioria desses hormônios são altamente expressos na MVM do ST e, portanto, diretamente acessíveis ao sangue materno, sugerindo regulação materna. Diante do exposto, foi proposto o “modelo de oferta materna” (Barker et al., 2010; Gaccioli et al., 2013) para justificar o trinômio mãe-placenta-feto.

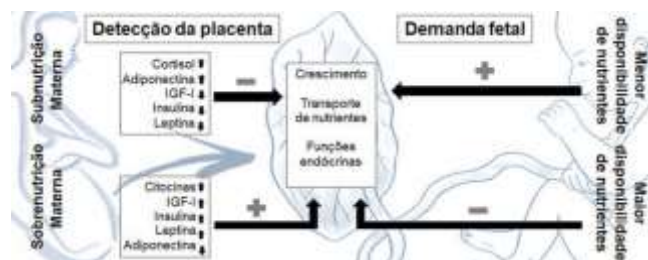
Segundo este modelo, o crescimento fetal é compatível com a capacidade de suprimento materno para alocar recursos para o feto. Assim, os transportadores de nutrientes são regulados em resposta a um evento primário, provocando mudanças no crescimento placentário e contribuindo diretamente para alterações no crescimento fetal. Os sinais maternos que transportam informações nutricionais para a placenta podem incluir hormônios metabólicos como insulina, cortisol, leptina e adiponectina, que são conhecidos por serem influenciados pela nutrição materna e por regular o transporte placentário (Jansson e Powell, 2006; Gaccioli et al., 2013).

Por outro lado, o modelo de demanda fetal, realizado sobretudo em roedores, postula que a placenta é principalmente controlada pela demanda do feto. Sendo assim, em resposta à subnutrição materna, o feto sinaliza para a placenta regular o crescimento placentário e o transporte de nutrientes (Sibley et al., 2010). No entanto, os transportadores de placenta para aminoácidos, lipídios e íons são, em geral, regulados para baixo em modelos de restrição de crescimento intrauterino humano,

o que é inconsistente com um modelo de demanda homeostática ou fetal para a regulação do transporte placentário (Jansson e Powell, 2013).

Por fim, atualmente é proposto um modelo integrado (Figura 1), em que a placenta integra uma multiplicidade de sinais nutricionais maternos e fetais para equilibrar a demanda mãe-filho através da regulação da fisiologia materna, crescimento placentário e transporte de nutrientes (Gaccioli et al., 2013). Como modelo, é observado que o crescimento fetal em resposta à subnutrição materna, produzirá uma prole que, apesar de menor em tamanho, irá sobreviver e poderá se reproduzir. Este crescimento fetal reduzido apresenta-se como uma alternativa para não extrair os nutrientes necessários para o crescimento normal de uma mãe já privada; potencializando a sobrevivência materna e fetal.

Figura 1 – Modelo integrado de detecção de nutrientes pela placenta e demanda fetal



Legenda: Sinais maternos que transportam informações para a placenta, como cortisol, adiponectina, IGF-I, insulina e leptina, são influenciados pelo estado nutricional materno e irão regular o crescimento placentário, o transporte de nutrientes (detecção de nutrientes) e as funções endócrinas. Paralelamente, o feto sinaliza a placenta para regular o crescimento placentário e suas funções em resposta à disponibilidade de nutrientes.

Fonte: Adaptado de Gaccioli et al., 2013.

1.1.3. Mecanismo epigenético

Desde o estabelecimento do Mendelismo, os genes têm sido considerados como a única forma pela qual as características biológicas podem ser transmitidas através de sucessivas gerações. Entretanto, hoje existem várias evidências moleculares da existência de uma herança não genética. Estudos mostram que variações epigenéticas adquiridas durante a vida de um organismo podem frequentemente ser transmitidas para os descendentes (Chango e Pogribny, 2015).

O termo “epigenética” tem origem do grego, onde “*epi*” significa “acima, perto, a seguir”, e estuda as mudanças nas funções dos genes, sem alterar as sequências de bases (adenina, guanina, citosina e timina) da molécula de DNA. Estas alterações podem ocorrer na própria molécula de DNA ou em proteínas chamadas histonas; e para que os sinais epigenéticos tenham reflexos, eles precisam alcançar um compartimento crucial da célula - o núcleo (Heard e Martienssen, 2014).

O núcleo tem a principal função de abrigar o DNA. No entanto, a molécula de DNA é infinitamente maior do que o próprio núcleo. Logo, para caber dentro do núcleo, a molécula de DNA precisa ser empacotada pelas proteínas nucleares denominadas histonas, dando origem a uma estrutura chamada de nucleossomos (Carneiro *et al.*, 2014).

Para que os genes possam ser expressos, a molécula de DNA precisa, portanto, ser parcialmente desempacotada, para que os genes fiquem acessíveis à ação de proteínas (fatores de transcrição). Entretanto, diferentes genes são expressos em diferentes momentos e, naturalmente, estão localizados em diferentes regiões da molécula de DNA (ou nos cromossomos). Nesse sentido, partes da molécula de DNA são constantemente desenroladas e enroladas – o que se conhece por “*remodelamento dos cromossomos*” (Chango e Pogribny, 2015).

Assim, epigenética significa a forma como a informação genética é organizada, mantida e lida. As modificações epigenéticas incluem (Estampador e Franks, 2014):

- a) Metilação de citosinas;
- b) Modificações de histonas; e
- c) RNAs não codificantes

A metilação corresponde às modificações químicas a partir da adição de um grupo metila (-CH₃, ou seja, um átomo de carbono ligado a três átomos de hidrogênio) na posição 5 do anel de citosina, catalisada pelas metiltransferases de DNA (DNMT, *DNA methyltransferase*), levando à formação de 5-metilcitosina (Gaudet *et al.*, 2003). A maioria da metilação do DNA ocorre em regiões chamadas ilhas citosina-fosfato-guanina (CpG), que corresponde a regiões genômicas com muitos dinucleotídeos CpG; Cerca de 55% dessas ilhas estão nas regiões promotoras de aproximadamente 40% de genes de mamíferos. A hipermetilação de

regiões promotoras ricas em dinucleotídeos tem um papel significativo na perda de expressão gênica (Gao *et al.*, 2014).

O segundo mecanismo epigenético bem estudado e mais complexo que regula a estrutura da cromatina e a acessibilidade e atividades transcricionais dentro de uma célula envolve modificações nas proteínas das histonas. As caudas amino-terminais das histonas estão sujeitas a pelo menos oito tipos de modificações, incluindo acetilação e metilação (Kouzarides, 2007).

As histonas 3 e 4 são comumente estudadas, e a acetilação é a principal modificação epigenética considerada; ocorre na lisina e arginina e neutraliza a carga positiva de resíduos básicos. A enzima histona acetilase adiciona grupo acetila ($-COCH_3$) aos resíduos de histona e acredita-se que as histonas acetiladas têm uma afinidade reduzida com o DNA, estando relacionadas ao silenciamento de genes deixando a cromatina em um estado relaxado e transcricionalmente ativo. Em contraste, a desacetilação de resíduos de lisina da histona, catalisada por várias classes diferentes de histona desacetilases, está associada ao silenciamento de genes (Roper e Esteller, 2007).

Recentemente, estudos extensivos indicaram a existência e a importância de outro mecanismo de regulação epigenética da função genética mediada por ácido ribonucleico (RNA, ribonucleic acid) não codificante, ou seja, que não é traduzido em proteína. Atualmente, os micro-RNAs (miRNA) são reconhecidos como principais reguladores de genes que codificam proteínas no genoma humano. Eles são pequenos RNAs não codificantes que funcionam principalmente como reguladores de genes negativos no nível pós-transcrição. Os miRNAs podem induzir a clivagem do RNA mensageiro (RNAm) se a complementação for perfeita ou a repressão de tradução se a complementação for imperfeita (Chango e Pogribny, 2015).

De uma forma geral, todos os componentes do epigenoma celular (*isto é*, metilação do DNA, modificações das histonas e miRNAs) estão conectados de forma forte e interdependente (Figura 2). Por exemplo, a metilação do DNA depende do padrão de modificações das histonas e do funcionamento das proteínas modificadoras das histonas. Do mesmo modo, o estado das modificações das histonas depende da metilação do DNA. Da mesma forma, a expressão de muitos miRNAs é regulada epigeneticamente pela metilação do DNA ou modificações nas histonas (Denis *et al.*, 2011). Por outro lado, vários miRNAs direcionam diretamente DNMTs e outros genes que modificam a cromatina.

Figura 2 – Principais alterações epigenéticas na programação fetal



Legenda: A metilação do DNA em regiões promotoras específicas, na maioria das vezes, impede a transcrição gênica, inativando o gene em questão. Quanto às modificações em histonas, a hipermetilação favorece a condensação da cromatina, dificultando o acesso de proteínas reguladoras que promovem a transcrição. Enquanto histonas não metiladas, geralmente, garantem a cromatina descondensada, favorecendo a transcrição gênica. A acetilação de histonas abre a cromatina, permitindo acoplação do maquinário transcricional.

Fonte: Adaptado de Ornellas e al., 2017.

1.1.4. Programação da função hepática

O fígado desempenha papel central no controle da homeostase glicêmica e está sujeito a uma regulação complexa por substratos, insulina e outros hormônios (Musso *et al.*, 2009). A dieta hiperlipídica materna durante períodos críticos do desenvolvimento resulta no surgimento de alterações morfológicas e estruturais no fígado, o que pode culminar em prejuízo da sua função em longo prazo. A administração neonatal de dieta hiperlipídica promove aumento no tamanho do fígado e acúmulo de gotículas de gordura, configurando uma condição patológica conhecida como esteatose hepática (Gregorio *et al.*, 2010; Oben *et al.*, 2010; Alfaradhi *et al.*, 2014).

A esteatose hepática ou DHGNA é um termo clínico dado a mudanças estruturais, que podem evoluir para esteatohepatite não alcoólica, progredindo para fibrose, carcinoma hepatocelular e falência hepática (Charlton, 2004; Torres e Harrison, 2015). A incidência de DHGNA pediátrica aumentou dramaticamente nos

últimos 30 anos, paralelamente ao seu aumento em adultos (Schwimmer *et al.*, 2006; Barshop *et al.*, 2009). Logo, evidências crescentes indicaram que a fisiopatologia pode estar associada à uma programação de disfunção hepática fetal.

Imediatamente após o nascimento, a pressão de oxigênio do sangue arterial aumenta de 25 para 100 mmHg e a temperatura ambiental diminui repentinamente do útero para as condições atmosféricas externas (Sato *et al.*, 2004). Além disso, os nutrientes no colostro ainda são insuficientes para manter o desenvolvimento neonatal e a maturação. Desta forma, o recém-nascido deve estar pronto para superar o estresse causado pela elevação da pressão de oxigênio, queda da temperatura, desidratação e fome (Sato *et al.*, 2004). Para isto, mudanças significativas no metabolismo fetal ocorrem sistematicamente para permitir a adaptação e sobrevivência no ambiente extrauterino.

Todos os órgãos são remodelados por suas células constituintes para se adaptarem a grandes mudanças em seu ambiente durante o período perinatal. O fígado é um centro de hematopoese durante o período fetal, mas torna-se um centro metabólico para desintoxicação e manutenção da homeostase após o nascimento. Assim, durante a gestação, o desenvolvimento do fígado fetal está constantemente em grandes mudanças na determinação e população de células, bem como mudanças mais refinadas nos fenótipos metabólicos celulares (Sato *et al.*, 2004).

O acúmulo de lipídios é fundamental para o desenvolvimento normal do feto; no entanto, o excesso de lipídios pode ser citotóxico e induzir disfunção metabólica. Durante o início da gestação, o fluxo lipídico placentário é mínimo e aumenta exponencialmente com posterior aumento da lipólise materna e transporte lipídico placentário, coincidindo com o desenvolvimento do tecido adiposo fetal (Bernstein *et al.*, 1997). Portanto, se o excesso de exposição lipídica fetal ocorrer no início ou no meio da gestação, irá utilizar o fígado e outros órgãos em desenvolvimento como sítios ectópicos de deposição lipídica na ausência de tecido adiposo.

A sobrecarga de lipídios durante a gravidez cria um gradiente de concentração que dirige a um aumento do transporte de lipídios placentários. No entanto, o excesso de influxo de lipídios no fígado fetal, particularmente antes do desenvolvimento do tecido adiposo fetal, pode resultar em acúmulos, o que poderia promover disfunção metabólica, estresse celular e inflamação em um órgão ainda não competente no manejo de uma sobrecarga desse substrato (Sato *et al.*, 2004).

O fígado adulto é um regulador principal da homeostase lipídica e, como tal, realiza múltiplos processos metabólicos, incluindo lipogênese *de novo* e processamento de ácidos graxos para a síntese de ATP através de β -oxidação. A lipogênese *de novo* é limitada no feto, assim como a oxidação lipídica, fazendo com que a glicose seja o principal combustível metabólico (Haggarty, 2010). Assim, a exposição ao excesso de lipídios maternos e a esteatose hepática resultante podem promover disfunção mitocondrial hepática fetal, dano oxidativo e inflamação, levando a uma maior suscetibilidade aos insultos pós-natal necessários para desenvolvimento e progressão da DHGNA.

Como resultado da disfunção mitocondrial, o excesso de lipídios no fígado pode promover a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando à peroxidação lipídica e inflamação (Perez-Carreras *et al.*, 2003; Serviddio *et al.*, 2008).

A inflamação é outro componente importante na fisiopatologia da DHGNA. A obesidade, e particularmente, a obesidade materna, aumenta os marcadores de inflamação sistêmica (Grant *et al.*, 2011). Numerosos modelos animais de obesidade materna demonstraram alterações inflamatórias no fígado de descendentes adultos, correspondendo à progressão da DHGNA, incluindo níveis aumentados de TNF α e IL-1 β (Ashino *et al.*, 2012), proteínas de sinalização de insulina hepática alteradas e aumento da fibrogênese hepática. No entanto, dado que todas essas mudanças ocorreram com o desenvolvimento concomitante da obesidade descendente, fica difícil distinguir apenas o impacto relativo das alterações pró-inflamatórias *no útero*.

Embora a obesidade seja o fator de risco mais comum para DHGNA, estilo de vida sedentário, aumento da circunferência da cintura, alto consumo de frutose, diminuição da ingestão de ácidos graxos poli-insaturados, resistência à insulina e síndrome metabólica também estão associados ao aumento do risco e/ou gravidade da doença (Mager *et al.*, 2010). Além disso, os polimorfismos genéticos associados ao metabolismo lipídico, citocinas inflamatórias, mediadores fibróticos e estresse oxidativo também parecem desempenhar um papel tanto na susceptibilidade quanto na severidade da doença (Day, 2010).

1.2. Frutose

Ao longo do século passado, ocorreram mudanças importantes na composição alimentar das dietas ocidentais, em termos de ácidos graxos essenciais e consumo de açúcar, e em particular frutose.

A frutose é um monossacarídeo naturalmente presente nas frutas e no mel. No entanto, a principal fonte de frutose em todo o mundo é a sacarose, ou açúcar de mesa (Tappy *et al.*, 2010). A sacarose é um dissacarídeo que consiste em 50% de frutose e 50% de glicose. Após a ingestão, a sacarose é degradada no intestino, liberando frutose e glicose que são então absorvidas. Além da sacarose, a outra fonte principal de frutose é o xarope de milho, que foi introduzido no início da década de 70 como adoçante.

Estudos na década de 50 observaram que dietas ricas em sacarose podem induzir rapidamente características da síndrome metabólica, incluindo hiperglicemia, resistência à insulina, dislipidemia, HAS e hiperuricemia. Adicionalmente, estudos posteriores documentaram que estas alterações metabólicas foram devido ao grande consumo de frutose (Tappy *et al.*, 2010).

Após ser consumida, a frutose é absorvida no intestino delgado e transportada para os enterócitos através de seus receptores de transporte de glicose (GLUT, *glucose transporter*) 5, localizados no polo apical da célula. GLUT5 é um transportador específico que não é dependente da insulina. Uma vez dentro do enterócito, a frutose se dirige para a circulação porta através de seus receptores GLUT2 na superfície basolateral do enterócito (Douard e Ferraris, 2008), sendo, então, conduzida ao fígado onde rapidamente será fosforilada nas posições carbono 1 (mediada por frutoquinase), formando frutose-1-fosfato (F1F), ou carbono 6 (mediada por uma hexocinase), formando frutose-6-fosfato (F6F).

A fosforilação da frutose em F1F é capaz de ativar SREBP-1c via co-ativador do ativador de proliferação peroxissomal gama (PGC, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator*) -1 β . E, através da conversão em F6F, há a ativação de ChREBP via proteína fosfatase 2A (PF2A). Como SREBP-1c e ChREBP são fatores de transcrição que ativam enzimas lipogênicas, como a ATP citrato liase (ACL), acetil-CoA carboxilase (Gaccioli *et al.*, 2013), ácido graxo sintase (FAS, *fatty acid synthase*) e estearoil coenzima-A desaturase, a frutose é capaz de ativar a

lipogênese *de novo*. Conseqüentemente, a concentração de malonil-CoA é aumentada no interior do hepatócito, inibindo CPT1 e posteriormente a β -oxidação (Denechaud *et al.*, 2008; Koo *et al.*, 2009).

A maioria da frutose é fosforilada no carbono 1 e acumula-se rapidamente no fígado, onde é hidrolisada em 2 trioses: dihidroxiacetona e gliceraldeído-fosfato. Essas 2 trioses podem seguir 3 caminhos diferentes: 1) participar na via glicolítica produzindo piruvato, que é convertido em ácido láctico em condições anaeróbicas ou entrar no ciclo do ácido cítrico como acetil CoA em condições aeróbicas, liberando energia; 2) o fosfato de dihidroxiacetona pode ser reduzido a glicerol-3-fosfato, o que é necessário para a síntese de lipídios incluindo triglicérides (TG) e fosfolípidos; e 3) dihidroxiacetona fosfato pode ser condensado para formar fructose-1,6-difosfato, formando glicose ou glicogênio. Conseqüentemente, produz-se piruvato, lipídio e glicogênio (Tappy *et al.*, 2010).

Para a fosforilação de frutose em F1F, há a entrada de um fosfato proveniente de ATP, que passa então a ser adenosina difosfato (ADP, *adenosine diphosphate*). A frutoquinase não é inibida por ADP ou por concentrações de citrato e, portanto, não é regulada pelo estado energético celular. Neste ponto, a frutose difere da glicose, já que tanto o ADP quanto as concentrações de citrato exercem um *feedback* negativo sobre as enzimas dos passos iniciais da glicólise (Lim *et al.*, 2010).

Por ser extremamente instável, ADP é rapidamente convertido em adenosina monofosfato (AMP, *adenosine monophosphate*). A rápida conversão de frutose em F1F irá gerar um desequilíbrio, aumentando a razão AMP/ATP. O destino deste AMP é definido por duas enzimas: a proteína quinase ativada por AMP (AMPK, *AMP-activated protein kinase*) e a xantina desidrogenase. Quando a xantina desidrogenase é mais ativa que a AMPK, o AMP é convertido em ácido úrico (Figura 3), gerando hiperuricemia (Abdelmalek *et al.*, 2010).

Apesar da sua designação precoce como antioxidante (Nieto *et al.*, 2000), o ácido úrico agora é conhecido por ter propriedades pró-oxidativas (Sautin *et al.*, 2007). Estas incluem liberação de substâncias inflamatórias (Rao *et al.*, 1991), indução de quimiotaxia de monócitos (Zare *et al.*, 2006), inibição de proliferação e migração de células endoteliais (Kang *et al.*, 2005), estresse oxidativo em adipócitos através da ativação de fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) oxidase e uma redução na

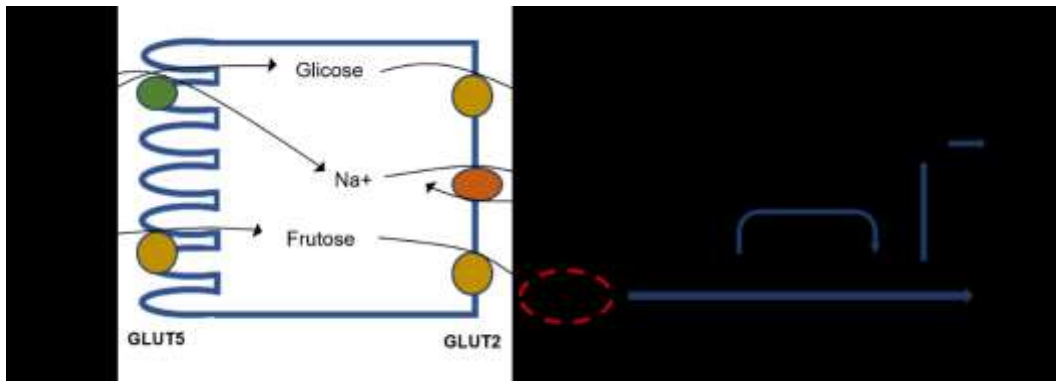
concentração de óxido nítrico. Além disso, altas concentrações de ácido úrico são observadas em uma ampla variedade de doenças metabólicas, o que suporta a hipótese de que a hiperuricemia é um fator causal na progressão de síndrome metabólica (Choi e Ford, 2007).

Por provocar diminuição na concentração de óxido nítrico, o aumento de ácido úrico provoca vasoconstrição e subsequente aumento da pressão arterial. De fato, estudos em modelos experimentais (Farah *et al.*, 2006; Sanchez-Lozada *et al.*, 2006; Dianat *et al.*, 2015) e em humanos (Nguyen *et al.*, 2009; Kell *et al.*, 2014) demonstraram associação entre dietas ricas em frutose e hipertensão arterial sistêmica (HAS).

Os mecanismos pelos quais a frutose causa HAS são considerados multifatoriais e muitos não são totalmente conhecidos. No entanto, sabe-se que a eliminação não enzimática de intermediários da glicólise, na qual a frutose participa, gera aumento da produção de metilglioxal (Liu *et al.*, 2011). Este composto é um aldeído altamente tóxico capaz de gerar espécies reativas de oxigênio e reagir com os grupos sulfídricos das proteínas, alterando suas funções. Além disso, também pode alterar a função de canais de cálcio, levando a um aumento do cálcio intracelular que gera resistência vascular em células musculares lisas (Vasdev *et al.*, 2004).

Além do aumento da produção de ácido úrico e formação de metilglioxal, outros fatores que relacionam consumo de frutose com HAS foram propostos como a atenuação do barorreflexo e aumento da atividade do sistema nervoso simpático, elevação das catecolaminas circulantes, aumento da atividade do sistema renina-angiotensina, aumento da reabsorção de sódio e disfunção endotelial (Dornas *et al.*, 2015).

Figura 3 – Absorção de frutose e formação de ácido úrico. A frutose é absorvida no enterócito pelo seu receptor GLUT5, localizado no polo apical da célula



Legenda: Em seguida se dirige para a circulação porta através de seus receptores GLUT2 na superfície basolateral do enterócito. Ao entrar no hepatócito pelos seus receptores GLUT2, a frutose é rapidamente fosforilada a frutose-1-fosfato (F1F) por ação da frutoquinase. A grande atividade da frutoquinase frente ao excesso de frutose absorvido leva a um aumento na relação AMP/ATP. O AMP irá ser preferencialmente metabolizado pela xantina desidrogenase, formando ácido úrico.

Fonte: A autora, 2018.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

Investigar se a dieta materna e/ou paterna rica em frutose administrada desde o período de pré-acasalamento afeta diferentemente o metabolismo e a estrutura hepática de proles de camundongos machos em idade adulta.

2.2. Específicos

- a) Acompanhar a evolução da massa corporal, ingestão alimentar e ingestão hídrica dos progenitores (pais e mães);
- b) Acompanhar a evolução da massa corporal, ingestão alimentar, ingestão hídrica das proles machos durante os três meses de idade.
- c) Verificar a pressão arterial dos progenitores e das proles machos aos três meses de idade (pré-acasalamento e antes do sacrifício, respectivamente)
- d) Verificar o comportamento glicêmico e o perfil lipídico dos progenitores e proles;
- e) Estudar a estrutura hepática, assim como a expressão genica e proteica dos componentes da lipogênese, beta-oxidação e inflamação no fígado das proles de machos aos três meses de idade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e dieta

Todos os cuidados e procedimentos experimentais realizados seguiram as diretrizes atuais estabelecidas no guia convencional para a experimentação com animais (Publicação NIH N°. 85-23, revisado em 1996). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (número de protocolo CEUA 021/2016, Anexo 1).

Camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 foram alocados no biotério do Laboratório de Morfometria, Metabolismo e doença Cardiovascular (LMMC) em gaiolas ventiladas sob condições controladas de temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($60\pm 10\%$) no sistema NexGen (Allentown Inc., PA, EUA), com livre acesso à comida e à água. O ambiente foi submetido a ciclos de 12/12h claro-escuro e de renovação de ar (15 min/h).

Camundongos machos e fêmeas com quatro semanas de idade foram aleatoriamente divididos em dois grupos ($n=20$ em cada grupo) e alimentados ad libitum com uma dieta controle (C) ou com uma dieta rica em frutose (HFR).

Os animais receberam dieta própria para roedores para a fase de crescimento, gestação e lactação (AIN-93G); sendo as dietas C e HFR isoenergéticas - normoglicídica (64% kcal carboidrato/Kg dieta), normoproteica (19% kcal proteína/Kg dieta) e normolipídica (17% kcal lipídios/Kg dieta). Ressalta-se que para confecção da dieta HFR, uma parte do amido foi substituído por frutose (45% kcal frutose/Kg dieta). O aporte de vitaminas e minerais foi idêntico nas duas dietas, seguindo as normas preconizadas para roedores do American Institute of Nutrition (Reeves et al., 1993). As dietas experimentais foram confeccionadas pela empresa PragSoluções (Jau, SP, Brasil), sendo a composição nutricional detalhada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais

Nutrientes (g/kg)	C	HFR
Caseína	190,00	190,00
Amido de milho	399,00	48,00
Amido de milho dextrinizado	133,00	40,00
Sacarose	100,00	100,00
Frutose	-	444,00
Óleo de soja	70,00	70,00
Fibra (celulose microcrista)	50,00	50,00
Mistura de vitaminas*	10,00	10,00
Mistura de minerais**	35,00	35,00
L-Cistina	3,00	3,00
Cloreto de colina	2,50	2,50
Antioxidante	0,01	0,01
Total (g)	1.000	1.000
Energia (kcal/kg)	3.950	3.950
Carboidratos (% Energia)	64	64
Frutose (% Energia)	-	45
Proteínas (% Energia)	19	19
Lipídios (% Energia)	17	17

Legenda: Mistura de vitaminas* e de minerais** segundo a recomendação da AIN-93G (Reeves *et al.*, 1993). Abreviações: C: dieta controle, HFR: dieta frutose.

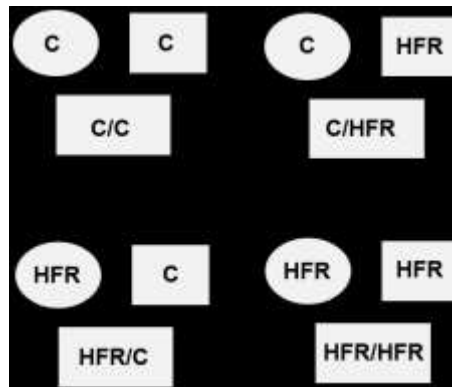
Os pais foram removidos das gaiolas logo após o aparecimento do plug vaginal, considerado o primeiro dia de gestação. Ao nascer, os filhotes foram identificados por sexo de acordo com a distância anogenital (Wolterink-Donselaar *et al.*, 2009). A seguir, os filhotes foram pesados separadamente. No dia 0, o tamanho da ninhada foi ajustado para seis filhotes por lactante (três fêmeas e três machos, quando possível), a fim de garantir nutrição adequada e igualada para todas as ninhadas (Langley-Evans, 2009).

Os pais e as mães foram sacrificados após o desmame das proles. Aos 21 dias, um filhote macho de cada ninhada foi aleatoriamente separado para compor os

grupos experimentais, mantidos separados e alimentados com dieta C (AIN-93G) até a idade de 12 semanas (três meses) quando foram sacrificados.

Conseqüentemente, quatro grupos de proles foram formados, identificados de acordo com a dieta materna (primeira sigla) e dieta paterna (segunda sigla): C/C (de mãe C e pai C), C/HFR, (de mãe C e pai HFR), HFR/C, (de mãe HFR e pai C) e HFR/HFR (de mãe HFR e pai HFR). A Figura 4 ilustra o desenho experimental e os diferentes grupos formados.

Figura 4 – Desenho esquemático dos grupos experimentais



Legenda: Os círculos representam o sexo feminino, e os quadrados representam o sexo masculino. Abreviaturas: HFR: dieta rica em frutose, C: dieta controle, M: mãe, P: pai. Mãe C cruzou com pai C e nasceram os filhotes C/C machos; mãe C cruzou com pai HFR e nasceram os filhotes C/HFR machos; mãe HFR cruzou com pai C e nasceram os filhotes HFR/C machos; mãe HFR cruzou com pai HFR e nasceram os filhotes HFR/HFR machos.

3.2. Massa corporal, ingestão alimentar e ingestão hídrica

A massa corporal dos progenitores e filhotes foi mensurada semanalmente por meio de balança digital (modelo BL3200A) de precisão 0,01g. As ingestões alimentar e hídrica foram monitoradas diariamente (sempre no mesmo horário, às 12h), mediante subtração entre a quantidade total ofertada e a quantidade remanescente. As dietas experimentais eram renovadas diariamente descartando a ração não ingerida.

3.3. Pressão arterial

A pressão arterial (PA) sistólica foi aferida no período de pré-acasalamento (nos pais) e antes do sacrifício (nas proles), sempre aos três meses de idade. Os animais foram submetidos por duas semanas às condições para a aferição da PA como forma de treinamento a fim de minimizar o estresse dos animais. A PA foi aferida por pletismografia da artéria caudal (Letica LE 5100, Panlab, Barcelona, Espanha). Os animais foram mantidos conscientes durante todo o procedimento.

3.4. Glicemia de jejum e Teste oral de tolerância à glicose

O TOTG foi realizado dois dias anteriores ao acasalamento nos progenitores, e nos filhotes, ao completarem três meses de idade. Para tal, após o jejum de 6 horas (1a.m.-7a.m.), foi administrada, por gavagem orogástrica, uma solução contendo glicose (25% em solução salina estéril, NaCl a 0,9%) na dosagem de 1g/kg. Posteriormente, o sangue da veia caudal foi coletado após os tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração da glicose, sendo a determinação dos níveis de glicose sanguínea (em mg/dL) obtida com o glicômetro (Accu-Chek, Roche, Alemanha).

Os valores de glicose no tempo zero foram considerados como valores de glicemia de jejum e para a avaliação da intolerância à glicose foi considerada a área sob a curva (Paschos e Paletas), mensurada a partir da utilização do software Prisma (versão 7.03 para Windows, software GraphPad, San Diego, CA, USA).

3.5. Eutanásia

Como mencionado, pais e mães foram sacrificados após o desmame da prole, enquanto as proles foram sacrificadas aos três meses de idade. Para tal, os animais foram submetidos a jejum durante seis horas. No momento da eutanásia os

animais receberam heparina (200mg/kg) e foram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (150mg/kg).

Em seguida o tórax foi aberto expondo o coração e amostras de sangue foram obtidas rapidamente por punção cardíaca (átrio direito). O sangue foi coletado e o plasma foi separado por centrifugação (120g, 15 min à temperatura ambiente). O plasma foi estocado à temperatura de -80°C até a realização da análise bioquímica.

Em seguida o fígado foi dissecado, seu volume foi determinado pelo método de *Scherle* (*Scherle, 1970*) e foram obtidos fragmentos de todos os seus lobos. Esses fragmentos foram congelados a -80°C para análises futuras. Adicionalmente, os depósitos de gordura genital, inguinal e perirrenal de proles foram removidos e pesados em balança (modelo AY220) de precisão 0,0001g. A gordura intra-abdominal presente na porção inferior do abdômen, conectada aos epidídimos foi considerada gordura genital epididimária. O tecido adiposo subcutâneo entre a parte inferior da caixa torácica e a coxa foi considerado como gordura inguinal, enquanto a gordura conectada à parede abdominal posterior na vizinhança dos rins e à porção abdominal dos ureteres foi tida como perirrenal. O somatório da gordura genital com a gordura perirrenal deu origem à gordura visceral.

3.6. Análises bioquímicas do fígado

50mg de tecido hepático congelado foi colocado em um processador ultrassônico (com 1 mL de isopropanol). O homogenato foi centrifugado a 2000g e 5µl do sobrenadante foram coletados para medição de TG hepáticos pelo método enzimático colorimétrico utilizando espectrofotômetro automático (Bioclin System II, Quibasa Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil) e o seu respectivo kit para análise (Quibasa Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil).

3.7. Análises plasmáticas

As concentrações plasmáticas de colesterol total (CT) e TG foram analisados nos progenitores. O ácido úrico, CT e TG foram medidos nas proles de três meses de idade. As análises foram quantificadas por método enzimático colorimétrico usando um espectrofotômetro automático e kits comerciais conforme as instruções preconizadas (Bioclin System II, Quibasa Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil).

As concentrações plasmáticas de insulina, leptina e adiponectina dos progenitores e das proles foram mensuradas em duplicata, utilizando kits de teste imuno-enzimáticos da Merck KGaA e suas afiliadas (Darmstadt, Alemanha):

- a) Insulina #EZRMI-13K Kit ELISA (% precisão - Inter-ensaio: 6.0-17.9, Intra-ensaio: 0.9-8.4);
- b) Leptina #EZML-82K Kit ELISA (% precisão - Inter-ensaio: 3.0-4.6, Intra-ensaio: 1.1-1.8);
- c) Adiponectina #ZMADP-60K | Kit ELISA (% precisão - Inter-ensaio: 1,4-10,8, Intra-ensaio: 3,8-8,2).

3.8 *Western blot* (WB)

A proteína total do fígado foi extraída com auxílio de tampão de lise e inibidores de protease. Posteriormente, o homogenado obtido foi centrifugado duas vezes durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi recolhido. A concentração de proteína foi determinada usando ensaio de proteína BCA kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). Após a desnaturação, as proteínas foram separadas por eletroforese em um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). As membranas foram bloqueadas com 5% de albumina de soro bovino (BSA), ambos diluídos em tampão salino com Tris (TBS-T, 20 mmol/L Tris/HCl, pH 7,4 e 500

mmol/L de NaCl) à temperatura ambiente por 2 horas para evitar a ligação não específica.

Sequencialmente, a membrana foi incubada durante aproximadamente 12 horas a 4°C com os seguintes anticorpos primários: beta-actina (β -actina) (43 kDa; Santa Cruz Biotechnology, sc-130300); Proteína ligante a elemento responsivo ao carboidrato (ChREBP) (62 kDa; Santa Cruz Biotechnology, sc-33764); Interleucina-1 beta (IL-1 β) (17 kDa; Santa Cruz, sc-52012); Interleucina-6 (IL-6) (26 kDa; Abcam, AB-7737); c-Jun N-terminal kinase total (JNKt) (54 kDa; Santa Cruz Biotechnology, sc-7345); c-Jun N-terminal kinase fosforilada (JNKp) (49 kDa; Santa Cruz Biotechnology, sc-12882); Fator nuclear Kappa B (NF κ B) (65 kDa; Santa Cruz Biotechnology, sc-109); Receptor ativador de proliferação peroxissomal alfa (PPAR- α) (55k Da; Biotecnologia Santa Cruz, sc-9000); Receptor ativador de proliferação peroxissomal gama (PPAR- γ) (67 kDa; Santa Cruz Biotechnology, sc-773); Proteína supressora de sinalização de citocina 3 (SOCS3) (30 kDa; Santa Cruz Biotechnology, sc-7009); Proteína ligante de elemento regulador de esterol-1c (SREBP-1c) (68 kDa; Santa Cruz Biotechnology, sc-367); Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) (26 kDa; Santa Cruz Biotechnology, sc-1350).

Após incubação com o anticorpo primário, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário específico durante 1 hora à temperatura ambiente. A expressão das proteínas foi detectada por meio de um sistema de detecção de quimiluminescência com ECL e as imagens das bandas foram obtidas com o sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A intensidade das bandas quimioluminescentes foi quantificada utilizando o software ImageJ, versão 1.47 (NIH, imagej.nih.gov/ij, EUA). O complexo de ligação do anticorpo foi desfeito e a membrana foi remarcada com beta-actina (45 kDa; Santa Cruz Biotechnology, sc-81178) como proteína constitutiva para normalizar os dados obtidos.

3.9. Isolamento de RNA e PCR em tempo real

A expressão do RNAm no fígado foi medida por reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR).

O RNA total do fígado foi extraído com reagente TRIzol (Invitrogen, CA, EUA). Posteriormente, foram adicionados 200µL de clorofórmio, seguido de centrifugação (11.200 rpm, durante 10 minutos a 4°C) e a porção correspondente ao extrato de RNA foi reservada. A essa porção foram adicionados 500µL de isopropanol que reagiu por 10 minutos para que o RNA precipitasse e logo após foi centrifugado (11.200 rpm, durante 10 minutos a 4°C). O isopropanol foi retirado, o pellet formado foi ressuspensionado com 500µL de etanol 75% e, logo após centrifugado (11.200 rpm, durante 5 minutos a 4°C). O etanol foi retirado e o pellet ressuspensionado em 20µL de água deionizada (MilliQ). As amostras foram submetidas ao banho seco (50°C por 5 min) e quantificadas no sistema Nanovue (GE Life Sciences). O produto final, já quantificado, foi diluído na proporção 1:100 em água MilliQ.

Posteriormente, para transcrição do RNA em DNA complementar (DNAC), 1,0µg de RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen, CA, EUA), e a primeira cadeia de DNAC foi sintetizada utilizando os iniciadores oligo (Amendt *et al.*, 1976) para RNAm e o kit SuperScript III (Invitrogen, CA, EUA). O RT-qPCR foi realizado utilizando termociclador BioRad CFX96 e mix SYBRGreen (Invitrogen, CA, EUA).

As reações de amplificação seguiram as seguintes condições: pré-desnaturação e ativação da polimerase (95°C durante 4 minutos), depois 44 ciclos, cada um a 95°C durante 10 segundos e 60°C durante 15 segundos. A especificidade da amplificação foi determinada por meio de curvas de fusão (60 a 95°C, com uma taxa de aquecimento de 0,1°C/s). A expressão gênica da beta-actina foi realizada em todas as amostras, sendo então utilizada como controle endógeno para normalização do RNAm. Os sinais foram quantificados utilizando o método $\Delta\Delta Ct$ para estimar a diferença entre o número de ciclos dos genes-alvo e do controle endógeno. Os *primers* para RT-qPCR (gene, 5-3', primer) são detalhados na Tabela 2.

Tabela 2 - Primers utilizados no RT-qPCR e suas respectivas sequências

Gene	Sequência <i>forward</i> 5'→3'	Sequência <i>reverse</i> 5'→3'
β-actina	GACCTTCAACACCCCAGCCA	CGTAGTGGGCACAGTGTGGGTG
ChREBP	CACTCAGGGAATACACGCCTAC	ATCTTGGTCTTAGGGTCTTCAGG
CPT1	GCAGAGCACGGCAAATGA	GGCTTTCGACCCGAGAAGAC
FAS	TCGAGGAAGGCACTACACCT	CACCCACTGGAAGCTGGTAT
IL-1β	ACGGATTCCATGGTGAAGTC	CTCACAAGCAGAGCACAAGC
IL-6	AGTTGCCTTCTTGGGAGTGA	ACAGGTCTGTTGGGAGTGGT
PPAR-γ	ACGATCTGCCTGAGGTCTGT	CATCGAGGACATCCAAGACA
SREBP-1c	AGCAGCCCCTAGAACAAACA	TCTGCCTTGATGAAGTGTGG

Abreviações: β-actina: beta-actina, ChREBP: proteína ligante a elemento responsivo ao carboidrato, CPT1: carnitina palmitoil transferase 1, FAS: ácido graxo sintetase, IL-1β: interleucina 1 beta, IL-6: interleucina 6, PPAR-γ: receptor ativador da proliferação peroxissomal gama, SREBP-1c: proteína de ligação ao elemento de regulação de esterol -1c.

3.10. Análise estatística

Os dados foram testados para a curva de distribuição normal (teste de D'Agostino-Pearson) e homogeneidade de variância (teste de Browne-Forsythe), sendo expressos como média e desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância de um fator (Younossi *et al.*, 2011) seguida do pós-teste de Holm-Sidak (GraphPad Prism v.7.03 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Em todos os casos, $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1. Dados dos progenitores

4.1.1. Massa corporal, ingestão alimentar e ingestão hídrica

Os progenitores toleraram bem a dieta oferecida. Não houve diferença significativa na massa corporal inicial dos progenitores C e HFR, sendo este achado mantido durante todo o período de pré-acasalamento. A ingestão alimentar durante todo o período do experimento não foi diferente entre os grupos; logo, não houve diferença em relação ao consumo de energia. No entanto, no que diz respeito à ingestão hídrica, pais e mães HFR apresentaram maior consumo de água quando comparados ao grupo C (pai +106%, mãe +86%, $P < 0,0001$, Tabela 3).

4.1.2. Pressão arterial

No período de pré-acasalamento, ou seja, após oito semanas de dieta experimental, os pais e as mães HFR apresentaram incremento da PA (pai +27%, mãe +35%, $P < 0,0001$, Tabela 3) em comparação com os progenitores C.

4.1.3. Glicemia de jejum e Teste oral de tolerância à glicose

Resultados da glicemia de jejum e do TOTG não mostraram diferenças entre os progenitores C e HFR (Tabela 3).

4.1.4. Massa hepática e análises bioquímicas do fígado

Os progenitores HFR apresentaram um incremento na massa hepática (pai +15%, mãe +18%, $P = 0,0290$) quando comparado com o fígado de progenitores do grupo C. Além disso, as análises de TG hepático demonstraram um conteúdo significativamente aumentado em pais e mães HF (pai +89%, mãe +41%, $P < 0,0001$) em comparação com seus controles. Resultados apresentados na tabela 3.

4.1.5. Análises plasmáticas

Dados da análise de insulina plasmática mostraram não haver diferenças significativas entre os grupos de progenitores C e HFR. No entanto, pais e mães HFR, em comparação com C, apresentaram hipercolesterolemia (pai +25%, mãe +24%, $P = 0,0158$) e hipertrigliceridemia (pai +45%, mãe +39%, $P < 0,001$).

A leptina plasmática mostrou-se aumentada e a adiponectina plasmática diminuída em progenitores do grupo HFR em comparação com os grupos C (Leptina: pai +68%, mãe +55%, $P < 0,0001$; Adiponectina: pai -6%, $P = 0,018$, mãe -21%, $P < 0,0001$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Dados biométricos e bioquímicos dos progenitores

Dados	Pai		Mãe	
	C	HFR	C	HFR
Massa corporal (g)	23,5±2,7	24,4±1,5	19,2±1,3	18,6±1,1
Ingestão alimentar (g/dia/animal)	2,6±0,5	2,6±0,3	2,3±0,4	2,4±0,3
Ingestão hídrica (mL/dia/animal)	2,1±0,6	4,4±0,9 †	2,3±0,8	4,3±0,9 ‡
Pressão arterial (mmHg)	153,8±7,1	196,0±5,4 †	145,2±17,7	196,6±6,5 ‡
Glicemia de jejum (mmol/L)	9,5±0,5	6,9±0,8	6,2±3,3	6,5±1,8
TOTG (mmol/L/min ⁻¹)	25,8±2,4	23,7±0,7	16,4±0,8	16,7±2,1
Massa hepática (g)	1,0±0,1	1,2±0,1 †	0,9±0,1	1,2±0,1 ‡
TG hepático (mg/dL)	78,5±2,6	148,6±8,5 †	83,8±1,7	118,0±5,0 ‡
TG plasmático (mg/dL)	49,8±17,9	72,3±13,4 †	46,9±12,3	65,0±16,4 ‡
Colesterol total (mg/dL)	78,2±15,2	98,0±6,4 †	67,7±4,4	83,9±4,0 ‡
Insulina (pg/mL)	655,3±64,6	621,3±51,1	461,5±73,7	530,0±56,2
Leptina (pg/mL)	1217,0±6,2	2050,0±3,7 †	1666,0±3,7	2581,0±3,5 ‡
Adiponectina (10 ⁶ pg/mL)	97,1±0,4	91,0±5,3 †	100,0±0,5	79,1±3,7 ‡

Os dados são expressos como média e desvio padrão e analisados por ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak. $P < 0,05$ quando: † comparado com pai C e ‡ comparado com mãe C. Abreviações: HFR: dieta rica em frutose, C: dieta controle, TOTG: teste oral de tolerância à glicose, TG: triglicérides.

4.2 Proles

4.2.1. Massa corporal, ingestão alimentar e ingestão hídrica

Ao longo do experimento, os diferentes grupos de proles não apresentaram diferença significativa nos parâmetros de massa corporal, ingestão alimentar e ingestão hídrica. Resultados estão apresentados na Tabela 4.

4.2.2. Pressão arterial

A PA, em comparação com o grupo C/C, foi 13% maior no grupo HFR/HFR ($P < 0,0001$), 10% maior no grupo C/HFR ($P < 0,0001$) e 9% maior no HFR/C grupo ($P < 0,0001$, Tabela 4).

4.2.3. Glicemia de jejum e Teste oral de tolerância à glicose

Assim como nos progenitores, não foi observado diferença significativa entre os grupos de proles para glicemia de jejum e tolerância à glicose (Tabela 4).

4.2.4. Massa hepática e análises bioquímicas do fígado

Ao contrário dos dados de massa hepática dos progenitores, os resultados para as proles não demonstraram diferença significativa entre os diferentes grupos.

A análise bioquímica de TG hepático também se mostrou inalterada entre os grupos de proles (Tabela 4).

4.2.5. Gorduras visceral e subcutânea

Não foi observado diferença estatística em relação à massa de gordura subcutânea entre os diferentes grupos de proles. No entanto, em relação à gordura visceral, foi observado um incremento de 25% no grupo de proles HFR/HFR quando comparado ao grupo C/C ($P = 0,0038$, Tabela 4).

4.2.6. Análises plasmáticas

Proles não apresentaram diferenças significativa entre os grupos em relação à análises de insulina, CT e TG plasmáticos.

A leptina, em comparação com o grupo C/C, foi 25% maior no C/HFR ($P = 0,0022$), 25% maior no grupo HFR/C ($P = 0,0022$) e 50% maior no HFR/HFR grupo ($P < 0,0001$). A leptina também foi maior no grupo HFR/HFR em comparação com C/HFR (+21%, $P = 0,0022$) e HFR/C (+20%, $P = 0,0022$).

A adiponectina, em comparação com o grupo C/C, foi 43% menor no grupo C/HFR ($P < 0,0001$), 45% menor no grupo HFR/C ($P < 0,0001$) e 47% menor no grupo HFR/HFR ($P < 0,0001$).

O ácido úrico, em comparação com o grupo C/C, foi 29% maior no grupo C/HFR ($P = 0,0397$), 34% maior no grupo HFR/C ($P = 0,0171$) e 38% maior no grupo HFR/HFR ($P = 0,0083$, Tabela 4).

Tabela 4 – Dados biométricos e bioquímicos das proles

Dados	C/C	C/HFR	HFR/C	HFR/HFR
MC inicial (g)	1,2±0,0	1,1±0,0	1,1±0,0	1,2±0,0
MC ao desmame (g)	7,7±1,7	8,2±1,7	7,2±1,6	6,5±1,3
MC aos 3 meses (g)	21,5±0,7	22,1±0,8	21,4±1,3	21,2±0,7
Ingestão alimentar (g/dia/animal)	2,7±0,5	2,9±0,4	2,9±0,5	2,8±0,5
Ingestão hídrica (mL/dia/animal)	29,2±4,2	30,6±3,6	26,8±4,8	27,3±4,8
Pressão arterial (mmHg)	167,6±2,5	171,6±7,2	173,1±9,5	189,6±18,3 †‡§
Glicemia de jejum (mmol/L)	4,8±0,9	5,4±1,1	4,2±0,3	4,1±0,6
TOTG (mmol/L/min ⁻¹)	20,2±1,7	22,1±1,9	23,3±2,8	21,0±2,6
Massa hepática (g)	0,9±0,0	0,8±0,3	0,9±0,0	0,8±0,1
Gordura Subcutanea	0,19±0,04	0,18±0,02	0,19±0,02	0,19±0,02
Gordura visceral	0,29±0,04	0,35±0,05	0,34±0,03	0,37±0,04†
TG hepático (mg/dL)	87,0±15,2	89,8±10,6	87,1±6,3	90,2±9,8
TG plasmático (mg/dL)	58,7±15,6	51,5±9,0	56,1±8,1	49,5±11,6
CT (mg/dL)	55,0±3,1	55,6±6,3	57,1±3,8	50,3±7,7
Insulina (pg/mL)	1532±53,7	1470±81,3	1551±43,4	1563±46,1
Leptina (10 ³ pg/mL)	35,1±3,0	43,8±1,9 †	44,0±3,2 †	52,9±4,3 †‡§
Adiponectina (10 ⁶ pg/mL)	25,0±0,4	14,2±0,7 †	13,7±0,7 †	13,3±0,5 †
Ácido úrico plasmático (mg/dL)	2,1±0,3	2,7±0,4 †	2,8±0,2 †	2,9±0,5 †

Legenda: Os dados são expressos como média e desvio padrão e analisados por ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak. $P < 0,05$ quando: † comparado com proles C/C, ‡ comparado com proles C/HFR e § comparados com proles HFR/C. Abreviações: C/C: prole de mãe e pai controles, C/HFR: prole de mãe controle e pai HFR, HFR/C: prole de mãe HFR e pai controle, HFR/HFR: prole de pai e mãe HFR, HFR: dieta rica em frutose, C: dieta controle, MC: massa corporal, TOTG: teste oral de tolerância à glicose, TG: triglicérides, CT: colesterol total.

4.2.7. WB e RT-qPCR

4.2.7.1. Marcadores de inflamação

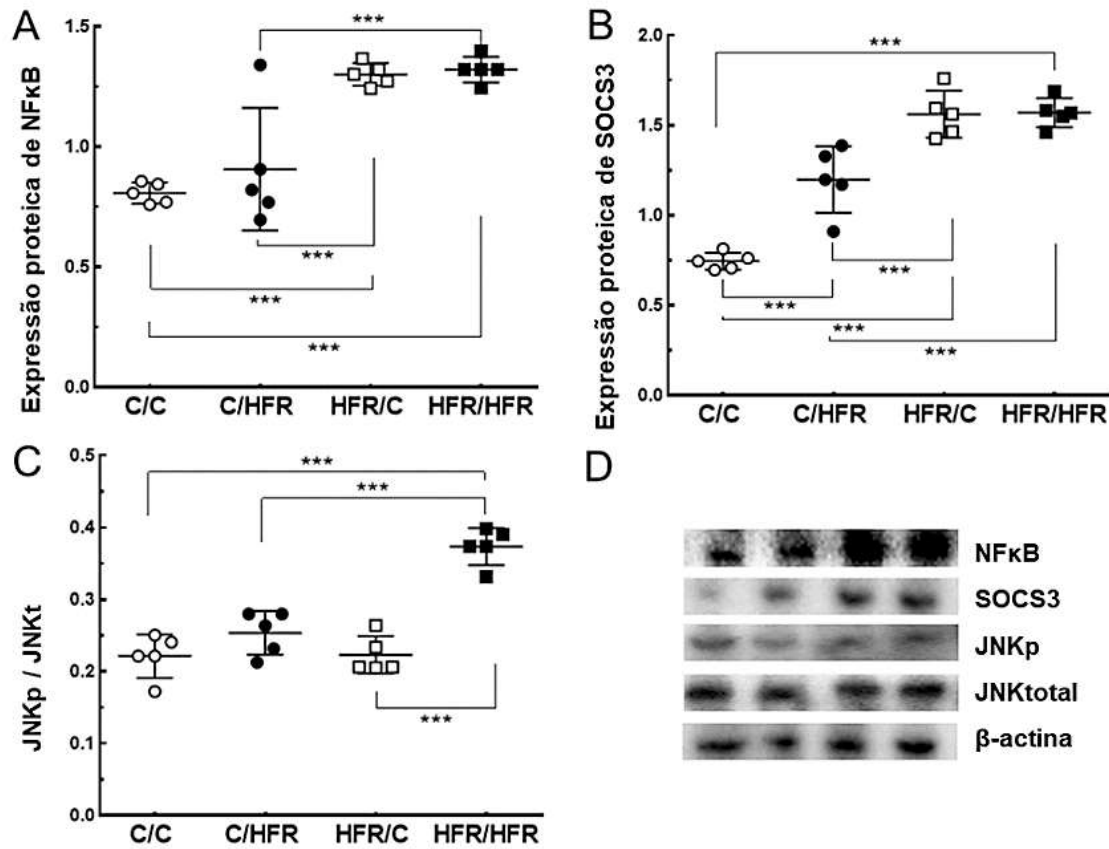
A expressão da proteína NFκB foi maior no grupo HFR/C em comparação ao grupo C/C (+ 61%, $P = 0,0001$) e ao grupo C/HFR (+ 43%, $P = 0,0008$). No grupo HFR/HFR, a expressão da proteína NFκB foi maior que em comparação com os grupos de proles C/C (+ 63%, $P = 0,0001$) e C/HFR (+ 46%, $P = 0,0007$) (Fig. 5A).

A expressão da proteína SOCS3, em comparação com o grupo C/C, foi aumentada nos grupos C/HFR (+ 61%, $P < 0,0001$), HFR/C (+ 109%, $P < 0,0001$) e C/HFR (+30 %, $P = 0,0006$). A expressão de SOCS3 foi +111% maior no grupo HFR/HFR quando comparado com grupo C/C ($P < 0,0001$) e + 31% quando comparado com C/HFR ($P = 0,0006$) (Fig. 5B).

A expressão de JNK fosforilada, em comparação com o grupo C/C, foi maior no grupo HFR/HFR (+69%, $P < 0,0001$), no grupo C/HFR (+ 47%, $P < 0,0001$) e no grupo HFR/C (+ 67%, $P < 0,0001$) (Fig. 5C). A expressão de TNF-α no grupo HFR/HFR foi 84% maior do que em comparação com o grupo C/C ($P = 0,0009$), 54% superior ao grupo C/HFR ($P = 0,0080$) e 41% superior ao HFR/C ($P = 0,0244$) (Fig. 6A).

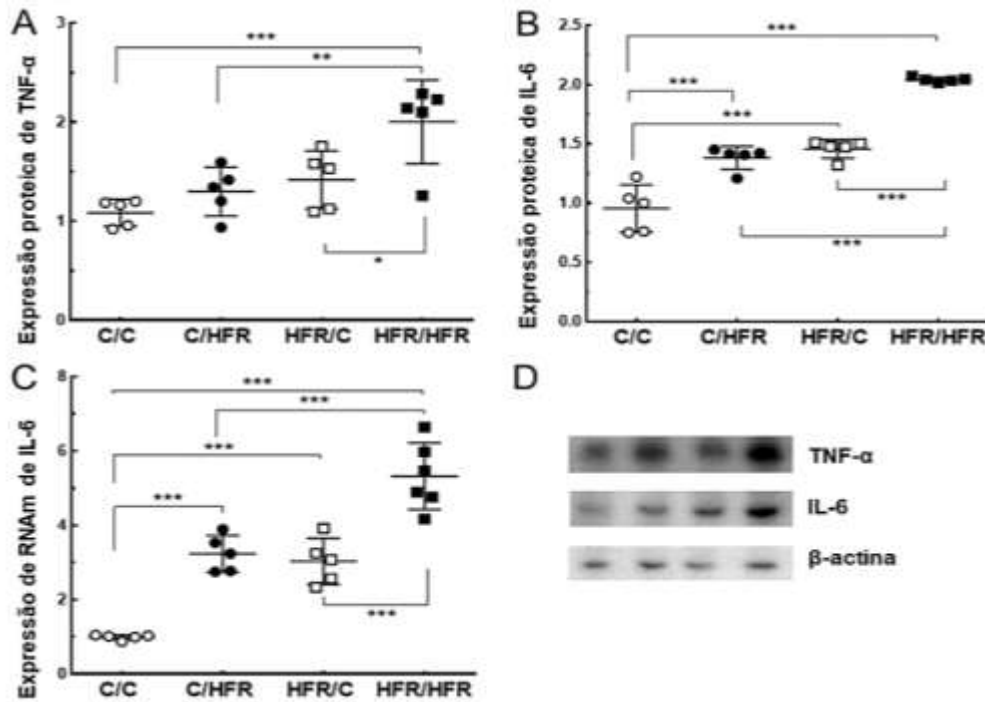
A expressão da proteína IL-6, em comparação com o grupo C/C, foi maior no grupo C/HFR (+45%, $P < 0,0001$) e no grupo HFR/C (+53%, $P < 0,0001$). A expressão da proteína IL-6 foi maior no grupo HFR/HFR: +114% do que C/C ($P < 0,0001$), + 48% do que C/HFR ($P < 0,0001$) e +40% do que HFR/C ($P < 0,0001$) (Fig. 6B). A análise de RNAm de IL-6 se comportou da mesma forma que sua expressão proteica (Fig. 6C). As expressões proteicas e genicas de IL-1β variaram como IL-6 (Figuras 7A-B).

Figura 5 – Marcadores de inflamação



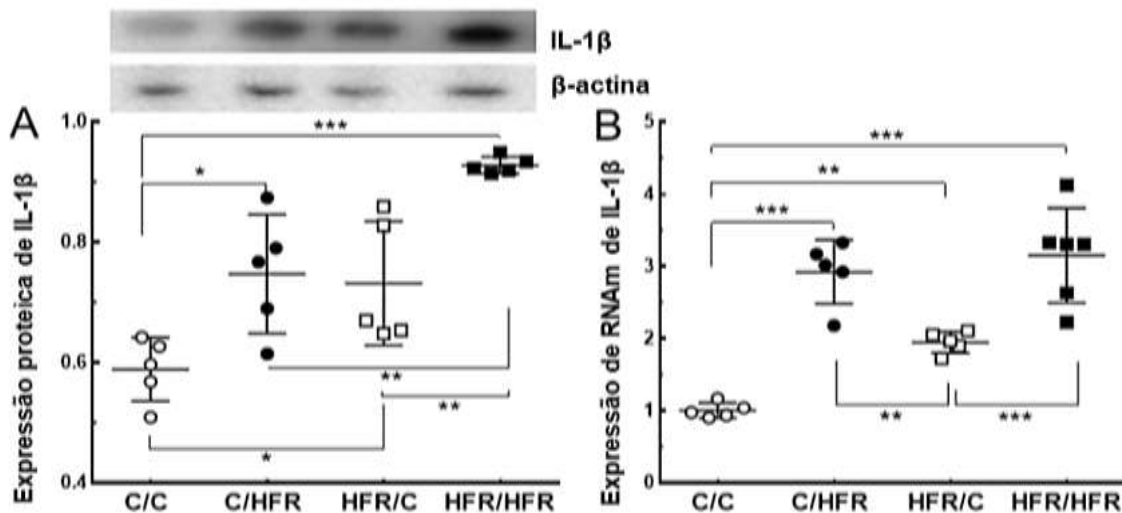
Legenda: (A) expressão proteica de NFκB, (B) expressão proteica de SOCS3, (C) expressão proteica de JNKp e (D) bandas representativas (expressas em unidades arbitrárias, u.a.). β-actina foi utilizada como controle endógeno para normalizar as expressões proteicas. JNKtotal foi utilizado para normalizar a expressão de JNKp. Resultados apresentados como média ± desvio padrão. *** $P < 0.001$ (ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak). NFκB: fator nuclear-κB, SOCS3: proteína supressora de sinalização de citocina 3, JNKp: *c-Jun N-terminal kinase* fosforilada, JNKt: *c-Jun N-terminal kinase* total, C/C: prole de mãe e pai controles, C/HFR: prole de mãe controle e pai HFR, HFR/C: prole de mãe HFR e pai controle, HFR/HFR: prole de pai e mãe HFR, HFR: dieta rica em frutose, C: dieta controle

Figura 6 – Marcadores de inflamação



Legenda: (A) expressão proteica de TNF- α , (B) expressão proteica de IL-6, (C) expressão de RNAm de IL-6 e (D) bandas representativas (expressas em unidades arbitrárias, u.a.). β -actina foi utilizada como controle endógeno para normalizar as expressões. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak). TNF- α : fator de necrose tumoral- α , IL-6: interleucina-6, C/C: prole de mãe e pai controles, C/HFR: prole de mãe controle e pai HFR, HFR/C: prole de mãe HFR e pai controle, HFR/HFR: prole de pai e mãe HFR, HFR: dieta rica em frutose, C: dieta controle.

Figura 7 – Marcadores de inflamação

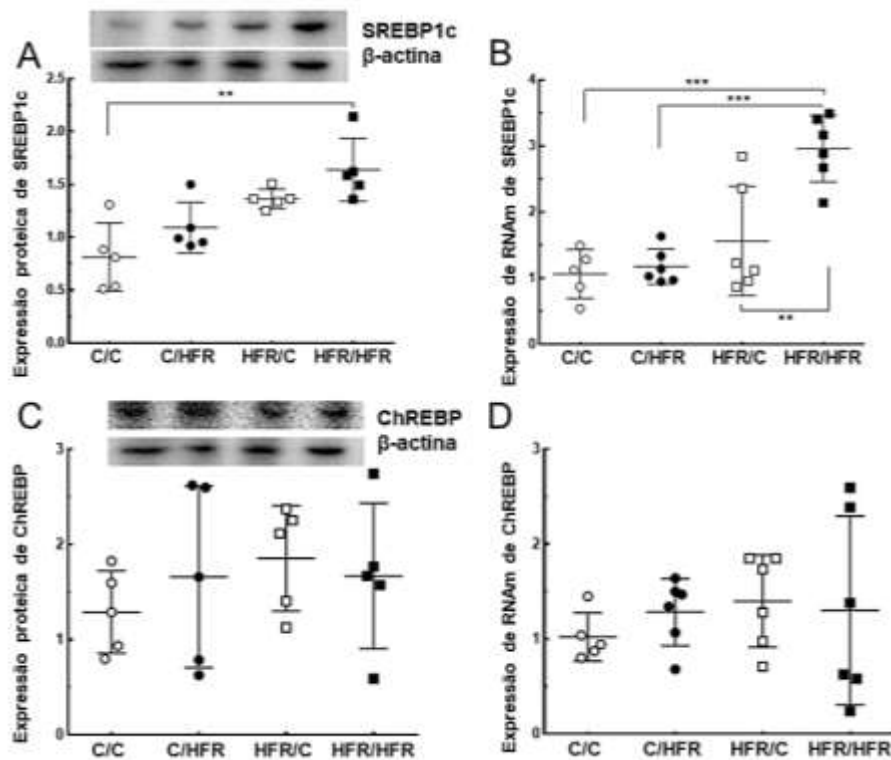


Legenda: (A) expressão proteica de IL-1 β com bandas representativas (expressas em unidades arbitrárias, u.a.) e (B) expressão de RNAm de IL-1 β . β -actina foi utilizada como controle endógeno para normalizar as expressões. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak). IL-1 β : interleucina-1 β , C/C: prole de mãe e pai controles, C/HFR: prole de mãe controle e pai HFR, HFR/C: prole de mãe HFR e pai controle, HFR/HFR: prole de pai e mãe HFR, HFR: dieta rica em frutose, C: dieta controle.

4.2.7.2. Marcadores de lipogênese

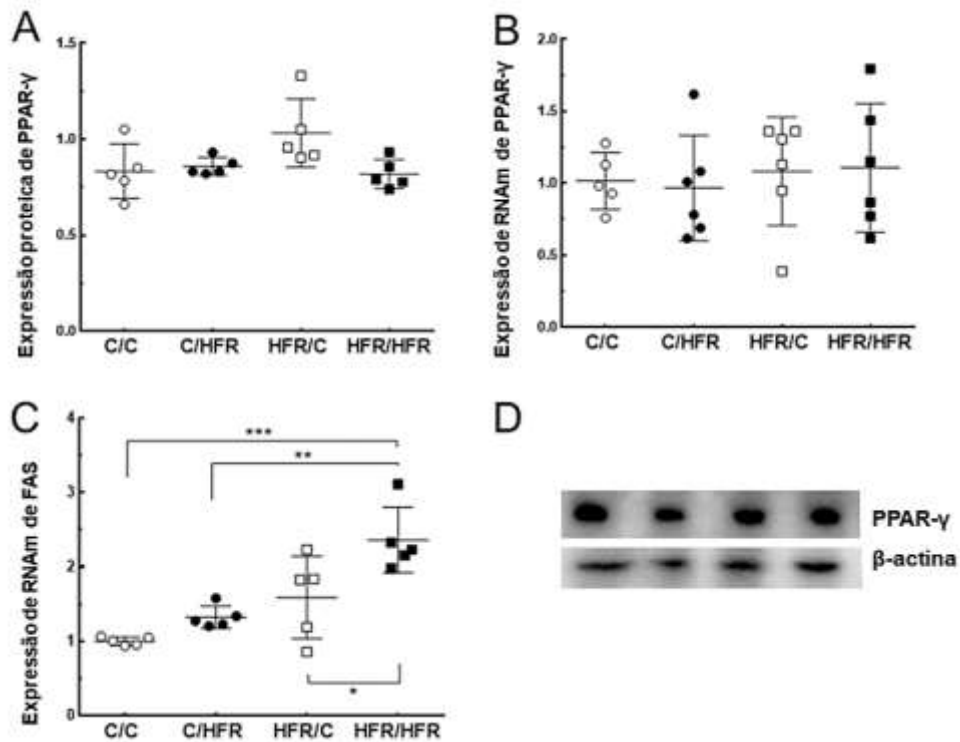
A proteína SREBP-1c, em comparação com o grupo C/C, foi mais expressa no grupo HFR/HFR (+102%, $P = 0,0006$, Fig. 8A), bem como a sua expressão de RNAm - aumentada no grupo HFR/HFR (+179%, $P < 0,0001$), no grupo C/HFR (+152%, $P < 0,0001$) e no grupo HFR/C (+89%, $P = 0,0011$) (Fig. 8B). ChREBP e PPAR- γ não mostraram diferenças significativas entre os grupos (Figuras 8C-D, 9A-B). A expressão do gene FAS foi maior no grupo HFR/HFR: +136% do que no grupo C/C ($P = 0,0001$), +78% do que no grupo C/HFR ($P = 0,0017$) e +49% do que no HFR/C grupo ($P = 0,0152$) (Fig. 9C).

Figura 8 – Marcadores de lipogênese



Legenda: . (A) expressão proteica de SREBP-1c com bandas representativas (expressas em unidades arbitrárias, u.a.), (B) expressão de RNAm de SREBP-1c, (C) expressão proteica de ChREBP com bandas representativas (expressas em unidades arbitrárias, u.a.) e (D) expressão de RNAm de ChREBP. β -actina foi utilizada como controle endógeno para normalizar as expressões. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak). SREBP1c: proteína ligante de elemento regulador de esterol-1c, ChREBP: proteína ligante a elemento responsivo ao carboidrato, C/C: prole de mãe e pai controles, C/HFR: prole de mãe controle e pai HFR, HFR/C: prole de mãe HFR e pai controle, HFR/HFR: prole de pai e mãe HFR, HFR: dieta rica em frutose, C: dieta controle.

Figura 9 – Marcadores de lipogênese

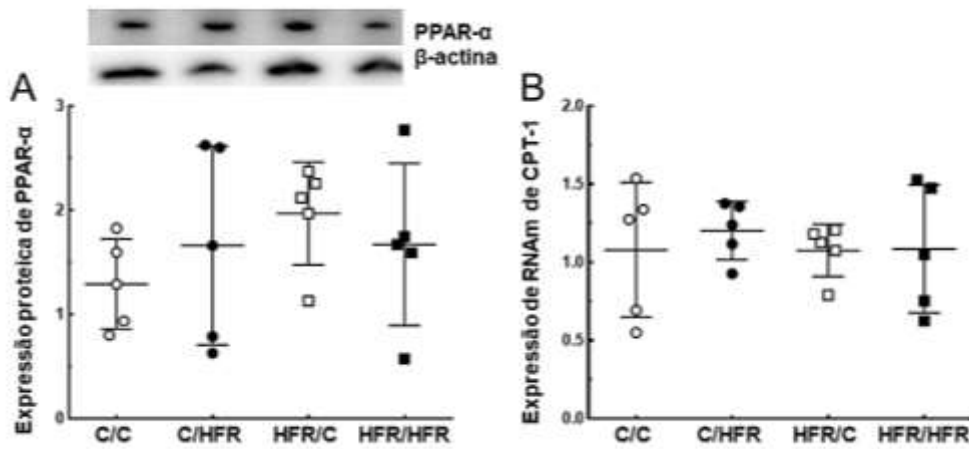


Legenda: (A) expressão proteica de PPAR- γ , (B) expressão de RNAm de PPAR- γ , (C) expressão de RNAm de FAS e (D) bandas representativas (expressas em unidades arbitrárias, u.a.). β -actina foi utilizada como controle endógeno para normalizar as expressões. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak). PPAR- γ : receptor ativador de proliferação peroxissomal- γ , FAS: ácido graxo sintetase, C/C: prole de mãe e pai controles, C/HFR: prole de mãe controle e pai HFR, HFR/C: prole de mãe HFR e pai controle, HFR/HFR: prole de pai e mãe HFR, HFR: dieta rica em frutose, C: dieta controle.

4.2.7.1. Marcadores de beta-oxidação

A expressão da proteína PPAR- α e a expressão do gene CPT-1 não mostraram diferenças significativas entre os grupos (Figuras 10A-B).

Figura 10 – Marcadores de beta-oxidação



Legenda: . (A) expressão proteica PPAR- α com bandas representativas (expressas em unidades arbitrárias, u.a.) e (B) expressão de RNAm de CPT-1. β -actina foi utilizada como controle endógeno para normalizar as expressões. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão. PPAR- α : receptor ativador de proliferação peroxissomal- α , CPT-1: carnitina palmitoil transferase 1, C/C: prole de mãe e pai controles, C/HFR: prole de mãe controle e pai HFR, HFR/C: prole de mãe HFR e pai controle, HFR/HFR: prole de pai e mãe HFR, HFR: dieta rica em frutose, C: dieta controle.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo relacionou os efeitos do consumo crônico de uma dieta rica em frutose sobre o metabolismo e o fígado da prole adulta de machos. Foi observado que pais e mães alimentados com dieta HFR ao longo da vida são capazes de programar a prole para um quadro de inflamação hepática independente de alterações na lipogênese e na beta-oxidação. Sobretudo, a dieta parental (em ambos os progenitores) HFR potencializou alguns efeitos na prole, permitindo a expressão fenotípica de comorbidades que não puderam ser observadas quando apenas um dos progenitores foi alimentado com dieta HFR. Desta forma, a expressão de determinados marcadores inflamatórios foi maximizada em proles do grupo HFR/HFR em comparação com os demais grupos. Além disso, proles HFR/HFR demonstraram efeitos deletérios na via de lipogênese, demonstrando um insulto mais agressivo da programação parental.

Considerando que ambas as dietas C e HFR eram isoenergéticas, não foram observadas diferenças na massa corporal dos progenitores. Este achado torna-se importante na dissociação do consumo de frutose com obesidade. A frutose está relacionada com ganho de peso devido a fontes alimentares na qual é adicionada, sobretudo produtos industrializados e bebidas adoçadas, que tendem a ser hipercalóricas (Schultz et al., 2015). Logo, pode-se imaginar que em muitos experimentos que envolvem condições hipercalóricas, os efeitos observados sejam uma consequência do ganho de massa corporal gerado, ao invés de especificamente serem atribuídos à frutose.

Previamente, nosso grupo demonstrou que uma dieta rica em frutose pode induzir desordens metabólicas independente do sobrepeso ou obesidade (Schultz et al., 2013; Magliano et al., 2015). Portanto, o aumento pronunciado na massa hepática, nos níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides, além do aumento de TG hepático nos progenitores já são suficientes para sugerir um quadro de DHGNA e síndrome metabólica.

Dados da análise plasmática das proles demonstraram que pai e/ou mãe HFR programam a prole um quadro de hiperuricemia. Portanto, basta apenas um dos progenitores receber dieta HFR para observarmos um incremento de ácido úrico a

nível plasmático. O ácido úrico é um produto formado naturalmente durante o metabolismo de frutose, a partir da degradação de AMP (Abdelmalek et al., 2010). O aumento do ácido úrico intracelular é seguido por aumento agudo na circulação, provavelmente devido à sua liberação do fígado.

Estudos recentes sugerem que este evento paralelo de formação de ácido úrico na via metabólica da frutose pode ser crítico para o mecanismo com o qual a frutose induz a síndrome metabólica (Abdelmalek et al., 2010). O ácido úrico, ao alcançar níveis plasmáticos, irá estimular o aumento na atividade de NADPH oxidase e na produção de EROS em adipócitos maduros. Consequentemente, estudos retratam a formação de marcadores inflamatórios, como IL-6 e TNF- α , além de diminuição na síntese de adiponectina, um importante anti-inflamatório (Kang e Ha, 2014).

Adicionalmente, o presente estudo mostrou que a dieta HFR parental é capaz de provocar um remodelamento de tecido adiposo branco (TAB) nas proles HFR/HFR, com incremento da gordura visceral independente de aumento da massa corporal. Estudos anteriores reportaram que o consumo de dieta HFR contribuiu para o aumento lipídico no TAB visceral e promoveu inflamação (Bargut et al., 2017).

O tecido adiposo é um órgão endócrino que secreta adipocinas que atuam na homeostase da glicose, regulação da pressão arterial, angiogênese, inflamação, sensibilidade à insulina e na regulação do balanço energético através do controle da saciedade (Ouchi et al., 2012). O aumento do TAB visceral observado, em conjunto com aumento pronunciado de leptina, diminuição de adiponectina e aumento de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6, sugerem um quadro de hipertrofia do tecido adiposo (Berg et al., 2002).

A hipertrofia do tecido adiposo está relacionada à uma mudança do fenótipo de macrófagos locais. Assim, ocorre polarização de macrófagos do tipo M2, presente principalmente no TAB saudável, para o tipo M1. Macrófagos M1 são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias, caracterizando um quadro inflamatório (Fujisaka et al., 2009).

O TAB é conhecido por ser a maior fonte de citocinas inflamatórias presentes no plasma. Devido ao aumento do estado inflamatório do TAB, os níveis plasmáticos também aumentam e acabam por influenciar a função e estrutura de outros órgãos, como o fígado. Além disso, há uma íntima relação entre o TAB e o fígado, uma vez que as vias de sinalização entre eles se inter-relacionam, tanto no metabolismo

quanto no processo imune (Wree et al., 2011). Desta forma, acredita-se que o aumento da expressão de TNF- α e IL-6 pelos adipócitos possivelmente será direcionado para o fígado da prole, sobretudo no grupo HFR/HFR.

TNF- α é uma citocina inflamatória conhecida por regular a fisiologia dos hepatócitos. Desta forma, pode ser tanto um agente citotóxico (induzindo morte celular), quanto um agente protetor (através da ativação de NFkB) (Papa et al., 2009). No entanto, o efeito mais proeminente de TNF- α é a indução de NFkB (Wullaert et al., 2007), cuja expressão se mostrou aumentada em proles de mães HFR, seja no grupo HFR/C ou HFR/HFR, quando comparadas com o grupo C/HFR. Portanto, resultados mostram que a mãe tem um papel substancial na programação de NFkB nas proles.

Em contrapartida, TNF- α também é capaz de induzir proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAP-quinases), entre elas a família JNK e caspases (Papa et al., 2009). Enquanto a ativação de NFkB controla a sobrevivência celular, JNK e caspases são conhecidos por induzir morte celular quando fosforiladas por TNF- α . Portanto, a ativação de JNK completa o estágio crítico de morte celular. O aumento na expressão de JNKp observado em proles HFR/HFR está de acordo com o esperado para o grupo.

Por sua vez, o aumento de expressão de IL-6 estimula a expressão de SOCS3, caracterizando o quadro de inflamação hepática (Wullaert et al., 2007). NFkB e SOCS3 foram mais expressos no grupo HFR/C e HFR/HFR, quando comparados com grupo de proles dos quais apenas o pai recebeu dieta HFR. Assim, mais uma vez o resultado demonstra uma maior participação materna da programação de insultos inflamatórios.

Diante do exposto, os resultados mostram um incremento nos parâmetros inflamatórios sem a instalação da DHGNA, contradizendo a hipótese de “two-hits”, o modelo clássico de patogênese da esteatohepatite e evolução da esteatose (Paschos e Paletas, 2009).

De acordo com a teoria de “two-hits”, a esteatose hepática é principalmente causada pelo acúmulo de lipídios no tecido adiposo (first hit), evoluindo então para a EHNA devido aos efeitos do estresse oxidativo, EROs, peroxidação lipídica e/ou presença de citocinas pró-inflamatórias (second hit). Portanto, segundo esta teoria clássica, primeiramente ocorre um acúmulo de gordura no fígado, caracterizando a esteatose, e secundamente, com a evolução do quadro, ocorre inflamação,

caracterizando a esteatohepatite (esteatose + inflamação) (Paschos e Paletas, 2009).

Porém, os resultados apresentados estão de acordo com a recente hipótese de múltiplos efeitos paralelos “multiple hits” (Tilg e Moschen, 2010), a qual propõe que a EHNA pode refletir uma doença em que a inflamação é seguida pela esteatose. Desta forma, muitos “hits” paralelos, derivados do TAB podem promover a inflamação do fígado.

Evidências recentes sugerem que o consumo de frutas não produz os mesmos efeitos metabólicos adversos que a frutose isolada provoca. Isto se deve à presença de antioxidantes naturais e/ou fibras alimentares presentes nas frutas, que as tornam benéficas à saúde. Portanto, é a frutose isolada industrialmente, sobretudo xaropes de milho ricos em frutose, que são rapidamente absorvidos e direcionados imediatamente aos hepatócitos pelos receptores GLUT 2 (Douard e Ferraris, 2008). Esta frutose industrial tem se mostrado tão danosa à saúde, que muitos dos efeitos deletérios observados nas proles deste estudo estão relacionados ao metabolismo da frutose ingerida pelos progenitores ao longo da vida.

No fígado, a maior parte da frutose absorvida é fosforilada em F1F pela frutoquinase, com consumo de ATP e consequente formação de ADP e AMP. Pelo fato da frutoquinase não ser regulada por concentrações de ADP, virtualmente toda frutose consumida será absorvida. Este mecanismo justifica a maioria dos efeitos deletérios observados nos progenitores que consumiram HFR, programando o feto para fenótipos adversos, mesmo a prole só ingerindo dieta controle para roedor (Tappy et al., 2010).

A ação da frutoquinase também irá impactar a saúde cardiovascular da prole HFR/HFR através da hipertensão arterial herdada pela programação parental. Além da contribuição do ácido úrico para o aumento da pressão arterial, através da inibição de óxido nítrico – um importante vasodilatador, a própria fosforilação da F1F também irá contribuir para este quadro de HAS. Quando a F1F é fosforilada, ocorre a formação de gliceraldeído-3-fosfato (GA3P) e diidroxiacetona-fosfato (DHAP), compostos intermediários de metilglioxal (Liu et al., 2011).

Metilglioxal é um aldeído altamente tóxico, sendo capaz de gerar EROS e reagir com os grupos sulfídricos das proteínas, alterando suas funções. Ele também pode alterar a função de canais de cálcio, levando a um aumento do cálcio

intracelular que gera resistência vascular em células musculares lisas (Vasdev et al., 2004).

As EROS são produzidas de forma contínua pelas células como parte de seus processos metabólicos. Sua produção é equilibrada pela remoção dos mesmos através de mecanismos de defesa antioxidantes presentes nas células (Valko et al., 2007). Porém, quando ocorre um desequilíbrio entre a formação de EROS e a sua remoção – decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou ainda do aumento da geração de espécies oxidantes – ocasiona o processo conhecido como estresse oxidativo.

Os resultados apresentados sugerem uma maior produção de EROS nas proles de pais e/ou mães alimentados com dieta HFR, uma vez que sua produção acompanha o incremento de ácido úrico. Este quadro é prejudicado pelo aumento de citocinas inflamatórias e diminuição de citocina anti-inflamatória, como a adiponectina. Estudos prévios relacionam o aumento da produção de EROS com danos hepatocelulares através de muitos mecanismos como a inibição da Na⁺/K⁺ ATPase da membrana, inibição da cadeia respiratória de mitocôndria, inativação dos canais de sódio da membrana plasmática e mediação da liberação de citocinas inflamatórias pelas células de Kupffer, prejudicando ainda mais a função hepática (Valko et al., 2007).

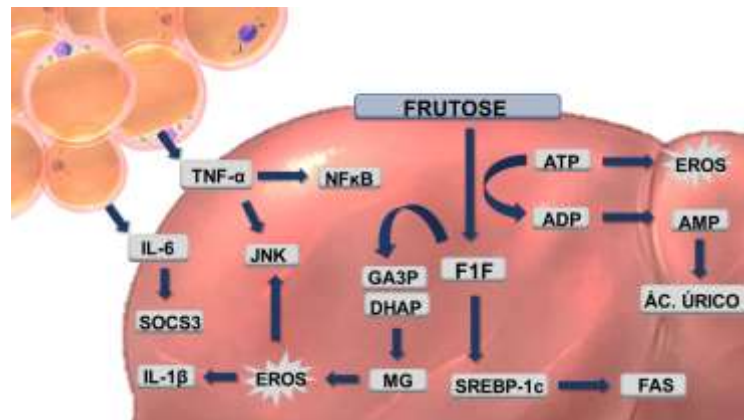
O estresse oxidativo hepatocelular gerado pelo excesso de EROS associado à inflamação, leva à maturação e secreção da citocina pró-inflamatória IL-1 β e uma maior fosforilação de JNK. Interessantemente, a expressão genica de IL-1 β foi maior em proles do grupo C/HFR quando comparadas com grupos HFR/C e C/C, enfatizando a importância da nutrição paterna nos parâmetros epigenéticos da programação fetal.

A F1F também tem papel na ativação de SREBP-1c via PGC-1 β e através de sua conversão em F6F pode ativar o ChREBP via PF2A. Tanto o SREBP-1c quanto o ChREBP são fatores de transcrição que ativam enzimas lipogênicas como ACL, acetil-CoA carboxilase (Gaccioli et al.) e FAS. Os resultados de expressão proteica e genica mostraram um aumento de SREBP-1c e FAS somente em proles do grupo HFR/HFR, sem alterações na expressão de ChREBP (Figura 11)

Portanto, a dieta parental rica em frutose é capaz de ativar a lipogênese de novo e conseqüentemente a concentração de malonil-CoA seria aumentada no interior do hepatócito, inibindo a CPT1 e posteriormente a β -oxidação (Denechaud et

al., 2008), (Koo et al., 2009). Porém, proles adultas de machos do presente estudo não foram capazes de expressar diferenças nos marcadores hepáticos de beta-oxidação. Logo, é plausível de se concluir que o acúmulo lipídico seria o próximo passo após a inflamação hepática, com preservação da beta-oxidação.

Figura 11 - Mecanismo hipotético pelo qual a dieta parental rica em frutose pode programar proles adultas masculinas



Legenda: A quantidade aumentada de gordura visceral contribui para a produção de IL-6 e TNF- α , que são direcionados para o fígado. No fígado, a IL-6 contribui para a superexpressão de SOCS-3 e TNF- α contribui para a superexpressão de JNK e NF κ B, caracterizando a inflamação hepática. Além disso, o consumo de dieta com alto teor de frutose pelos pais afeta algumas vias relacionadas ao metabolismo hepático da frutose na prole, mesmo que a prole tenha consumido apenas dieta de controle. Portanto, o acúmulo plasmático de ácido úrico é encontrado devido ao excesso de AMP, que é formado a partir da fosforilação do ATP. A redução da ATP gera EROS, contribuindo para o aumento da pressão arterial. Além disso, MG é produzido por suas subunidades GA3P e DHAP, contribuindo ainda mais para de EROS e hipertensão. O acúmulo hepático de EROS está associado à superexpressão de JNK e IL-1beta, somando a inflamação. Finalmente, devido ao metabolismo da frutose, há uma ativação do SREBP-1c, um fator de transcrição relacionado à lipogênese de novo, ativando FAS. AMP: Adenosina monofosfato; ATP: adenosina trifosfato, DHAP: fosfato de dihidroxiacetona, FAS: ácido graxo sintase, GA3P: gliceraldeído-3-fosfato, IL: interleucina, JNK: *c-jun N-terminal kinase*; MG: metilglioxal, NF κ B: fator nuclear- κ B, EROS: espécies reativas de oxigênio, SOCS3: proteína supressora de sinalização de citocina 3, SREBP-1c: Proteína ligante de elemento regulador de esterol-1c, TNF- α : fator de necrose tumoral- α .

Fonte: A autora, 2018.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a dieta materna e a dieta paterna, individualmente ou em combinação, rica em frutose pode afetar o metabolismo e o fígado da prole adulta de machos.

A dieta paterna e a dieta materna rica em frutose administradas durante todo o período pré-gestacional até o final da lactação causa nas proles de machos, aos três meses de idade: manutenção da massa corporal, manutenção do metabolismo glicídico, aumento dos níveis plasmáticos de leptina e redução de adiponectina, hiperuricemia e inflamação hepática significativa.

A combinação da dieta materna e paterna rica em frutose maximizou os efeitos adversos sobre a saúde da prole. Além disso, a dieta parental foi capaz de expressar consequências na programação fetal que não puderam ser observadas em proles das quais apenas o pai ou apenas a mãe recebeu a dieta rica em frutose, como hipertensão arterial sistêmica, aumento da gordura visceral e ativação da via da lipogênese.

REFERÊNCIAS

- Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, Unalp-Arida A, Colvin R, Johnson RJ, Diehl AM, Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research N. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010; 51: 1961-1971.
- Alfaradhi MZ, Fernandez-Twinn DS, Martin-Gronert MS, Musial B, Fowden A, Ozanne SE. Oxidative stress and altered lipid homeostasis in the programming of offspring fatty liver by maternal obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2014; 307: R26-34.
- Amendt P, Michaelis D, Hildmann W. Clinical and metabolic studies in children of diabetic-mothers. *Endokrinologie* 1976; 67: 351-361.
- Ashino NG, Saito KN, Souza FD, Nakutz FS, Roman EA, Velloso LA, Torsoni AS, Torsoni MA. Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. *J Nutr Biochem* 2012; 23: 341-348.
- Bargut TCL, Santos LP, Machado DGL, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Eicosapentaenoic acid (EPA) vs. Docosahexaenoic acid (DHA): Effects in epididymal white adipose tissue of mice fed a high-fructose diet. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2017; 123: 14-24.
- Barker DJ. Rise and fall of Western diseases. *Nature* 1989; 338: 371-372.
- Barker DJ. Intrauterine programming of adult disease. *Mol Med Today* 1995; 1: 418-423.
- Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1986; 1: 1077-1081.
- Barker DJ, Thornburg KL, Osmond C, Kajantie E, Eriksson JG. The surface area of the placenta and hypertension in the offspring in later life. *Int J Dev Biol* 2010; 54: 525-530.
- Barshop NJ, Francis CS, Schwimmer JB, Lavine JE. Nonalcoholic fatty liver disease as a comorbidity of childhood obesity. *Ped Health* 2009; 3: 271-281.
- Bayol SA, Simbi BH, Fowkes RC, Stickland NC. A maternal "junk food" diet in pregnancy and lactation promotes nonalcoholic Fatty liver disease in rat offspring. *Endocrinology* 2010; 151: 1451-1461.
- Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 84-89.

Bernstein IM, Goran MI, Amini SB, Catalano PM. Differential growth of fetal tissues during the second half of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 28-32.

Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 537-543.

Bruce KD, Cagampang FR, Argenton M, Zhang J, Ethirajan PL, Burdge GC, Bateman AC, Clough GF, Poston L, Hanson MA, McConnell JM, Byrne CD. Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology* 2009; 50: 1796-1808.

Carneiro VC, de Abreu da Silva IC, Torres EJ, Caby S, Lancelot J, Vanderstraete M, Furdas SD, Jung M, Pierce RJ, Fantappie MR. Epigenetic changes modulate schistosome egg formation and are a novel target for reducing transmission of schistosomiasis. *PLoS Pathog* 2014; 10: e1004116.

Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, Bock C, Li C, Gu H, Zamore PD, Meissner A, Weng Z, Hofmann HA, Friedman N, Rando OJ. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* 2010; 143: 1084-1096.

Carter AM. Evolution of factors affecting placental oxygen transfer. *Placenta* 2009; 30 Suppl A: S19-25.

Chango A, Pogribny IP. Considering maternal dietary modulators for epigenetic regulation and programming of the fetal epigenome. *Nutrients* 2015; 7: 2748-2770.

Charlton M. Nonalcoholic fatty liver disease: a review of current understanding and future impact. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 1048-1058.

Chen YP, Xiao XM, Li J, Reichetzeder C, Wang ZN, Hoche B. Paternal body mass index (BMI) is associated with offspring intrauterine growth in a gender dependent manner. *PLoS One* 2012; 7: e36329.

Choi HK, Ford ES. Prevalence of the metabolic syndrome in individuals with hyperuricemia. *Am J Med* 2007; 120: 442-447.

Chong S, Vickaryous N, Ashe A, Zamudio N, Youngson N, Hemley S, Stopka T, Skoultchi A, Matthews J, Scott HS, de Kretser D, O'Bryan M, Blewitt M, Whitelaw E. Modifiers of epigenetic reprogramming show paternal effects in the mouse. *Nat Genet* 2007; 39: 614-622.

Day CP. Genetic and environmental susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* 2010; 28: 255-260.

Denechaud PD, Dentin R, Girard J, Postic C. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett* 2008; 582: 68-73.

Denis H, Ndlovu MN, Fuks F. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Rep* 2011; 12: 647-656.

Dianat M, Veisi A, Ahangarpour A, Fathi Moghaddam H. The effect of hydro-alcoholic celery (*Apiumgraveolens*) leaf extract on cardiovascular parameters and lipid profile in animal model of hypertension induced by fructose. *Avicenna J Phytomed* 2015; 5: 203-209.

Dornas WC, de Lima WG, Pedrosa ML, Silva ME. Health implications of high-fructose intake and current research. *Adv Nutr* 2015; 6: 729-737.

Dorner G, Plagemann A, Reinagel H. Familial diabetes aggregation in type I diabetics: gestational diabetes an apparent risk factor for increased diabetes susceptibility in the offspring. *Exp Clin Endocrinol* 1987; 89: 84-90.

Douard V, Ferraris RP. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295: E227-237.

Estampador AC, Franks PW. Genetic and epigenetic catalysts in early-life programming of adult cardiometabolic disorders. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2014; 7: 575-586.

Farah V, Elased KM, Chen Y, Key MP, Cunha TS, Irigoyen MC, Morris M. Nocturnal hypertension in mice consuming a high fructose diet. *Auton Neurosci* 2006; 130: 41-50.

Farquhar JW. Prognosis for babies born to diabetic mothers in Edinburgh. *Arch Dis Child* 1969; 44: 36-47.

Forsdahl A. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? *Br J Prev Soc Med* 1977; 31: 91-95.

Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Ikutani M, Oya T, Kanatani Y, Tsuneyama K, Nagai Y, Takatsu K, Urakaze M, Kobayashi M, Tobe K. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* 2009; 58: 2574-2582.

Gaccioli F, Lager S, Powell TL, Jansson T. Placental transport in response to altered maternal nutrition. *J Dev Orig Health Dis* 2013; 4: 101-115.

Gao Q, Tang J, Chen J, Jiang L, Zhu X, Xu Z. Epigenetic code and potential epigenetic-based therapies against chronic diseases in developmental origins. *Drug Discov Today* 2014; 19: 1744-1750.

Gapp K, Jawaid A, Sarkies P, Bohacek J, Pelczar P, Prados J, Farinelli L, Miska E, Mansuy IM. Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat Neurosci* 2014; 17: 667-669.

Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H, Jaenisch R. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 2003; 300: 489-492.

Grant WF, Gillingham MB, Batra AK, Fewkes NM, Comstock SM, Takahashi D, Braun TP, Grove KL, Friedman JE, Marks DL. Maternal high fat diet is associated with decreased plasma n-3 fatty acids and fetal hepatic apoptosis in nonhuman primates. *PLoS One* 2011; 6: e17261.

Gregorio BM, Souza-Mello V, Carvalho JJ, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguilu MB. Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 203: 495 e491-498.

Haggarty P. Fatty acid supply to the human fetus. *Annu Rev Nutr* 2010; 30: 237-255.
Heard E, Martienssen RA. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell* 2014; 157: 95-109.

Heerwagen MJ, Miller MR, Barbour LA, Friedman JE. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 299: R711-722.

Hocher B. More than genes: the advanced fetal programming hypothesis. *J Reprod Immunol* 2014; 104-105: 8-11.

Jameel F, Phang M, Wood LG, Garg ML. Acute effects of feeding fructose, glucose and sucrose on blood lipid levels and systemic inflammation. *Lipids Health Dis* 2014; 13: 195.

Jansson T, Powell TL. IFPA 2005 Award in Placentology Lecture. Human placental transport in altered fetal growth: does the placenta function as a nutrient sensor? -- a review. *Placenta* 2006; 27 Suppl A: S91-97.

Jansson T, Powell TL. Role of placental nutrient sensing in developmental programming. *Clin Obstet Gynecol* 2013; 56: 591-601.

Jehn M, Brewis A. Paradoxical malnutrition in mother-child pairs: untangling the phenomenon of over- and under-nutrition in underdeveloped economies. *Econ Hum Biol* 2009; 7: 28-35.

Johnson RJ, Perez-Pozo SE, Sautin YY, Manitius J, Sanchez-Lozada LG, Feig DI, Shafiu M, Segal M, Glasscock RJ, Shimada M, Roncal C, Nakagawa T. Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocr Rev* 2009; 30: 96-116.

Kang DH, Ha SK. Uric Acid Puzzle: Dual Role as Anti-oxidant and Pro-oxidant. *Electrolyte Blood Press* 2014; 12: 1-6.

Kang DH, Park SK, Lee IK, Johnson RJ. Uric acid-induced C-reactive protein expression: implication on cell proliferation and nitric oxide production of human vascular cells. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3553-3562.

Kasturi SS, Tannir J, Brannigan RE. The metabolic syndrome and male infertility. *J Androl* 2008; 29: 251-259.

Kell KP, Cardel MI, Bohan Brown MM, Fernandez JR. Added sugars in the diet are positively associated with diastolic blood pressure and triglycerides in children. *Am J Clin Nutr* 2014; 100: 46-52.

Koo HY, Miyashita M, Cho BH, Nakamura MT. Replacing dietary glucose with fructose increases ChREBP activity and SREBP-1 protein in rat liver nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390: 285-289.

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007; 128: 693-705.
Lager S, Powell TL. Regulation of nutrient transport across the placenta. *J Pregnancy* 2012; 2012: 179827.

Langley-Evans SC. Nutritional programming of disease: unravelling the mechanism. *J Anat* 2009; 215: 36-51.

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

Liu J, Wang R, Desai K, Wu L. Upregulation of aldolase B and overproduction of methylglyoxal in vascular tissues from rats with metabolic syndrome. *Cardiovasc Res* 2011; 92: 494-503.

Mager DR, Patterson C, So S, Rogenstein CD, Wykes LJ, Roberts EA. Dietary and physical activity patterns in children with fatty liver. *Eur J Clin Nutr* 2010; 64: 628-635.

Magliano DC, Penna-de-Carvalho A, Vazquez-Carrera M, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Short-term administration of GW501516 improves inflammatory state in white adipose tissue and liver damage in high-fructose-fed mice through modulation of the renin-angiotensin system. *Endocrine* 2015; 50: 355-367.

Meigs JB, Cupples LA, Wilson PW. Parental transmission of type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes* 2000; 49: 2201-2207.

Moran JR, Ghishan FK, Halter SA, Greene HL. Steatohepatitis in obese children: a cause of chronic liver dysfunction. *Am J Gastroenterol* 1983; 78: 374-377.

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

Ng SF, Lin RC, Laybutt DR, Barres R, Owens JA, Morris MJ. Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 2010; 467: 963-966.

Nguyen S, Choi HK, Lustig RH, Hsu CY. Sugar-sweetened beverages, serum uric acid, and blood pressure in adolescents. *J Pediatr* 2009; 154: 807-813.

Nieto FJ, Iribarren C, Gross MD, Comstock GW, Cutler RG. Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis? *Atherosclerosis* 2000; 148: 131-139.

Nugent BM, Bale TL. The omniscient placenta: Metabolic and epigenetic regulation of fetal programming. *Front Neuroendocrinol* 2015; 39: 28-37.

Oben JA, Patel T, Muralidarane A, Samuelsson AM, Matthews P, Pombo J, Morgan M, McKee C, Soeda J, Novelli M, Poston L, Taylor P. Maternal obesity programmes offspring development of non-alcoholic fatty pancreas disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394: 24-28.

Ornellas F, Carapeto PV, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Obese fathers lead to an altered metabolism and obesity in their children in adulthood: review of experimental and human studies. *J Pediatr (Rio J)* 2017; 93: 551-559.

Ouchi N, Ohashi K, Shibata R, Murohara T. Adipocytokines and obesity-linked disorders. *Nagoya J Med Sci* 2012; 74: 19-30.

Papa S, Bubici C, Zazzeroni F, Franzoso G. Mechanisms of liver disease: cross-talk between the NF-kappaB and JNK pathways. *Biol Chem* 2009; 390: 965-976.

Paredes AH, Torres DM, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2012; 16: 397-419.

Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia* 2009; 13: 9-19.

Perez-Carreras M, Del Hoyo P, Martin MA, Rubio JC, Martin A, Castellano G, Colina F, Arenas J, Solis-Herruzo JA. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 38: 999-1007.

Rao GN, Corson MA, Berk BC. Uric acid stimulates vascular smooth muscle cell proliferation by increasing platelet-derived growth factor A-chain expression. *J Biol Chem* 1991; 266: 8604-8608.

Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 811-816.

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

Rodriguez L, Panadero MI, Rodrigo S, Roglans N, Otero P, Alvarez-Millan JJ, Laguna JC, Bocos C. Liquid fructose in pregnancy exacerbates fructose-induced dyslipidemia in adult female offspring. *J Nutr Biochem* 2016a; 32: 115-122.

Rodriguez L, Panadero MI, Roglans N, Otero P, Rodrigo S, Alvarez-Millan JJ, Laguna JC, Bocos C. Fructose only in pregnancy provokes hyperinsulinemia,

hypoadiponectinemia, and impaired insulin signaling in adult male, but not female, progeny. *Eur J Nutr* 2016b; 55: 665-674.

Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol* 2007; 1: 19-25.

Roseboom TJ, van der Meulen JH, Ravelli AC, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Twin Res* 2001; 4: 293-298.

Sanchez-Lozada LG, Nakagawa T, Kang DH, Feig DI, Franco M, Johnson RJ, Herrera-Acosta J. Hormonal and cytokine effects of uric acid. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006; 15: 30-33.

Sato EF, Nakagawa E, Hiramoto K, Yamamasu S, Moriyama-Shimamoto I, Inoue M. Oxidative stress promotes the regression of fetal liver hemopoiesis. *Biochemistry (Mosc)* 2004; 69: 18-22, 11 p following 74.

Sautin YY, Nakagawa T, Zharikov S, Johnson RJ. Adverse effects of the classic antioxidant uric acid in adipocytes: NADPH oxidase-mediated oxidative/nitrosative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293: C584-596.

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

Schultz A, Barbosa-da-Silva S, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Differences and similarities in hepatic lipogenesis, gluconeogenesis and oxidative imbalance in mice fed diets rich in fructose or sucrose. *Food Funct* 2015; 6: 1684-1691.

Schultz A, Neil D, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Hepatic adverse effects of fructose consumption independent of overweight/obesity. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 21873-21886.

Schwimmer JB, Deutsch R, Kahen T, Lavine JE, Stanley C, Behling C. Prevalence of fatty liver in children and adolescents. *Pediatrics* 2006; 118: 1388-1393.

Serviddio G, Sastre J, Bellanti F, Vina J, Vendemiale G, Altomare E. Mitochondrial involvement in non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 22-35.

Sibley CP, Brownbill P, Dilworth M, Glazier JD. Review: Adaptation in placental nutrient supply to meet fetal growth demand: implications for programming. *Placenta* 2010; 31 Suppl: S70-74.

Sullivan EL, Smith MS, Grove KL. Perinatal exposure to high-fat diet programs energy balance, metabolism and behavior in adulthood. *Neuroendocrinology* 2011; 93: 1-8.

Tain YL, Chan JY, Hsu CN. Maternal Fructose Intake Affects Transcriptome Changes and Programmed Hypertension in Offspring in Later Life. *Nutrients* 2016; 8.

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

Temple JL, Cordero P, Li J, Nguyen V, Oben JA. A Guide to Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Childhood and Adolescence. *Int J Mol Sci* 2016; 17.

Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010; 52: 1836-1846.

Torres DM, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease: Fibrosis portends a worse prognosis. *Hepatology* 2015; 61: 1462-1464.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.

Vasdev S, Longerich L, Gill V. Prevention of fructose-induced hypertension by dietary vitamins. *Clin Biochem* 2004; 37: 1-9.

Volpato AM, Schultz A, Magalhaes-da-Costa E, Correia ML, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Maternal high-fat diet programs for metabolic disturbances in offspring despite leptin sensitivity. *Neuroendocrinology* 2012; 96: 272-284.

Whitaker RC, Wright JA, Pepe MS, Seidel KD, Dietz WH. Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. *N Engl J Med* 1997; 337: 869-873.

Wolterink-Donselaar IG, Meerding JM, Fernandes C. A method for gender determination in newborn dark pigmented mice. *Lab Anim (NY)* 2009; 38: 35-38.

Wree A, Kahraman A, Gerken G, Canbay A. Obesity affects the liver - the link between adipocytes and hepatocytes. *Digestion* 2011; 83: 124-133.

Wullaert A, van Loo G, Heyninck K, Beyaert R. Hepatic tumor necrosis factor signaling and nuclear factor-kappaB: effects on liver homeostasis and beyond. *Endocr Rev* 2007; 28: 365-386.

Younossi ZM, Stepanova M, Afendy M, Fang Y, Younossi Y, Mir H, Srishord M. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; 9: 524-530 e521; quiz e560.

Zare F, Magnusson M, Bergstrom T, Brisslert M, Josefsson E, Karlsson A, Tarkowski A. Uric acid, a nucleic acid degradation product, down-regulates dsRNA-triggered arthritis. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 482-488.

ANEXO – Comitê de ética



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/021/2016 sobre "Efeitos da dieta materna e/ou paterna rica em frutose sobre o metabolismo e o fígado de filhotes machos adultos. Estudo experimental" sob a responsabilidade de Márcia B. A. Mandarim de Lacerda, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em 29/03/2016. Este certificado expira em 29/03/2020.

Rio de Janeiro, 29 de Março de 2016.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patrícia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ

APÊNDICE A – Artigo publicado

J Pediatr (Rio J). 2017;93(6):551–559



Jornal de
Pediatria

www.jpod.com.br



REVIEW ARTICLE

Obese fathers lead to an altered metabolism and obesity in their children in adulthood: review of experimental and human studies[†]



Fernanda Ornellas, Priscila V. Carapeto, Carlos A. Mandarim-de-Lacerda*,
Marcia B. Aguilá

Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Centro Biomédico, Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doenças Cardiovasculares, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received 29 December 2016; accepted 18 January 2017

Available online 17 August 2017

KEYWORDS

Paternal obesity;
Programming;
Obese child;
Chronic diseases
programming;
Epigenetics

Abstract

Objective: To discuss the recent literature on paternal obesity, focusing on the possible mechanisms of transmission of the phenotypes from the father to the children.

Sources: A non-systematic review in the PubMed database found few publications in which paternal obesity was implicated in the adverse transmission of characteristics to offspring. Specific articles on epigenetics were also evaluated. As the subject is recent and still controversial, all articles were considered regardless of year of publication.

Summary of findings: Studies in humans and animals have established that paternal obesity impairs their hormones, metabolism, and sperm function, which can be transmitted to their offspring. In humans, paternal obesity results in insulin resistance/type 2 diabetes and increased levels of cortisol in umbilical cord blood, which increases the risk factors for cardiovascular disease. Notably, there is an association between body fat in parents and the prevalence of obesity in their daughters. In animals, paternal obesity led to offspring alterations on glucose-insulin homeostasis, hepatic lipogenesis, hypothalamus/feeding behavior, kidney of the offspring; it also impairs the reproductive potential of male offspring with sperm oxidative stress and mitochondrial dysfunction. An explanation for these observations (human and animal) is epigenetics, considered the primary tool for the transmission of phenotypes from the father to offspring, such as DNA methylation, histone modifications, and non-coding RNA.

* Please cite this article as: Ornellas F, Carapeto PV, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguilá MB. Obese fathers lead to an altered metabolism and obesity in their children in adulthood: review of experimental and human studies. J Pediatr (Rio J). 2017;93:551–9.

[†] Corresponding author.

E-mail: mandarim@uerj.br, mandarim.ca@gmail.com (C.A. Mandarim-de-Lacerda).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpod.2017.02.004>

0021-7557/© 2017 Sociedade Brasileira de Pediatria. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

APÊNDICE B – Submissão de artigo

Journal of Developmental Origins of Health and Disease -ordenator@dohejournal.cambridge.org@manuscriptcentral.com- para mim -> 24/10/2017

inglês -> português - Traduzir mensagem Desativar para inglês

24-Oct-2017

Dear Ms. Casapeta

A manuscript titled Liver metabolism in adult male mice offspring: consequences of maternal, paternal, or parental high-fructose diet (DOH20-10-17-0A-0883) has been submitted by Ms. Priscila Casapeta to the Journal of Developmental Origins of Health and Disease.

You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer-review system, Manuscript Central, automatically creates a user account for you. Your USER ID and PASSWORD for your account is as follows:

Site URL: <https://mc.manuscriptcentral.com/dohad>
 USER ID: PRISCILACASAPETA@GMAIL.COM
 PASSWORD: For security reasons your password is not contained in this email. To set your password click the link below

https://mc.manuscriptcentral.com/dohad/CSI_MARK=F2831817102e642e608e202ede81130

You can use the above USER ID and PASSWORD (once set) to log in to the site and check the status of papers you have authored/co-authored. Please log in to <https://mc.manuscriptcentral.com/dohad> to update your account information via the edit account tab at the top right.

Thank you for your participation.

Sincerely,
 Journal of Developmental Origins of Health and Disease Editorial Office

Journal of Developmental Origins of Health and Disease CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS

Home Author Review

Author Dashboard

Submitted Manuscripts

1 Submitted Manuscripts

1 Manuscripts with Decisions

Start New Submission

3 Most Recent E-mails

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
ADN - Decided, Withdraw	DOH20-10-17-0A-0883	Liver metabolism in adult male mice offspring: consequences of maternal, paternal, or parental high-fructose diet	24-Oct-2017	24-Oct-2017
- Awaiting Reviewer Scores				
		View Submission		

SCHOLARONE™ THOMSON REUTERS™

© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2017. All Rights Reserved.
 ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
 ScholarOne Manuscripts Patent #7,257,707 and #7,303,670.