



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

Matheus Ajackson Barros Lima

**A suplementação materna de melatonina mitiga a doença hepática
gordurosa não alcoólica na prole de camundongos obesos**

Rio de Janeiro

2023

Matheus Ajackson Barros Lima

A suplementação materna de melatonina mitiga a doença hepática gordurosa não alcoólica na prole de camundongos obesos

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

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/ REDE SIRIUS/ CB/A

A312 Ajackson, Mathes BarrosLima (Matheus Ajackson)
A suplementação materna de melatonina mitiga a doença hepática
gordurosa não alcoólica na prole de camundongos obesos / Matheus
Barros Lima Ajackson– 2023.
53 f.

Orientador: Prof.^a Dra. Márcia BarbosaÁguila Mandarin de Lacerda

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

1. Dieta hiperlipídica. 2. Fígado gorduroso– Aspectos nutricionais
3. Melatonina. 4. Programação fetal. 5. Obesidade Materna.
6. Camundongos. I. Lacerda, Márcia Barbosa Águila Mandarin de. II.
Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto
Alcântara Gomes III. Título.

CDU 616.399

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira CRB-7/5302

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

Assinatura

Data

Matheus Ajackson Barros Lima

**A suplementação materna de melatonina mitiga a doença hepática gordurosa não
alcoólica na prole de camundongos obesos**

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 25 de janeiro de 2023.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Marcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane

Instituto de Nutrição - UERJ

Prof.^a Dra. Fernanda Ornellas Pinto da Cruz

Centro Universitário Augusto Motta

Rio de Janeiro

2023

DEDICATÓRIA

Aos meus primeiros educadores, meus pais, em ordem alfabética, Roberto Ajackson Barros Lima e Roseli Aparecida Barros Lima.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora e nutricionista Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda por ter me aceitado como um integrante do seu projeto e toda a disposição dos mais diversos recursos para a execução desse trabalho. Por toda a sua disponibilidade e diálogo, as reuniões de orientação e ensinamentos, estímulo constante à busca por conhecimento e aperfeiçoamento. Por compartilhar seus conhecimentos de Nutrição experimental, Anatomia e a oportunidade de participar das aulas e tutorias da disciplina de Anatomia Humana para Nutrição.

Ao coordenador geral do PPGBHEx, professor Dr. Carlos Alberto Mandarim de Lacerda, por dispor de recursos, sua disponibilidade e diálogo, seus ensinamentos, estímulos constantes ao aperfeiçoamento e conhecimento. Por compartilhar seus ensinamentos sobre Bioestatística, Anatomia, Microscopia e Estereologia e os mais variados tópicos das ciências morfológicas e metabolismo.

Aos professores do LMMC, Dra. Vanessa Souza Mello, Dr. Luiz E. M. Cardoso, Dra. Sandra Barbosa da Silva, e também aos demais que compõem o PPGBHEx, que me apresentaram e ensinaram os mais diversos temas dentro das ciências morfológicas e metabolismo, destaco aqui as reuniões semanais e os conhecimentos sobre tecido adiposo, proteoglicanos e experimentação animal.

À pós-doutoranda Dra. Fabiane F. Martins por ser uma inspiração profissional e, gentilmente, me ensinar sobre Histologia e Biologia celular.

À pós-doutoranda Dra. Thatiany S. Marinho por me ensinar sobre experimentação animal, diversas condutas no laboratório e processamento dos tecidos.

À nutricionista Esp. Brenda Akemi Nagagata Franklin de Mattos que, valendo-se de toda sua experiência na iniciação científica no LMMC, foi uma parceira de biotério, de racional, de análises, de disciplinas, de reuniões com graduandos, de discussões, de escrita, entre muitas outras coisas. Eu tive a sorte de estar bem muito bem acompanhado nessa trajetória por uma excelente amiga e parceira de pesquisa. Obrigado, minha dupla.

Ao nutricionista Esp. Illitch Aquino, que foi um parceiro desde o início do experimento e de racional, especialmente pelas ideias e discussões sobre as vias AMPK e mTOR. Um amigo do LMMC para a vida.

À técnica Dra. Aline Pena por, gentilmente, me ensinar e acompanhar técnicas moleculares e demais análises.

À técnica Andrea Bertoldo por realizar a microtomia do fígado.

Aos colegas do LMMC que, porventura, ajudaram de alguma forma nesse trabalho e na minha trajetória do mestrado.

Aos meus pais, em ordem alfabética, Roberto Ajackson Barros Lima e Roseli Aparecida Barros Lima que, dentre muitos outros feitos, não mediram esforços para me prover a melhor educação ao longo da vida, o que foi determinante para minha passagem pelo mestrado.

Ao meu amor, Rhuan Carlos Rodrigues da Silva, que esteve ao meu lado me apoiando durante todo esse tempo.

Aos professores, amigos e familiares que não são mencionados aqui, meramente por não estarem diretamente envolvidos no projeto, mas sabem que são especiais por me tornarem uma pessoa melhor a cada dia.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do RJ.

RESUMO

AJACKSON, Matheus Barros Lima. *A suplementação materna de melatonina mitiga a doença hepática gordurosa não alcoólica na prole de camundongos obesos*. 2023. 53 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Este estudo teve como objetivo investigar, no fígado da prole adulta do sexo masculino, os possíveis efeitos da suplementação de melatonina nas progenitoras obesas durante a gestação e lactação. A partir da 4ª semana de vida, fêmeas C57BL/6 foram alimentadas com dieta controle (C) ou *high-fat* (HF) e suplementadas com melatonina (Mel) na dose de 10 mg/Kg/dia (s.c.) durante a preconcepção, gestação e lactação, formando os grupos: C, CMel, HF e HFMel. Após o desmame até os três meses de idade, as proles receberam apenas a dieta C. As progenitoras HF e suas proles apresentaram maior massa corporal (MC) do que as progenitoras C e suas proles. No entanto, aos 3 meses de idade, a MC foi reduzida na prole HFMel vs. HF. Além disso, os marcadores plasmáticos e hepáticos do metabolismo de lipídeos aumentaram na prole HF vs. C, mas foram reduzidos na prole HFMel vs. HF. O conteúdo lipídico hepático foi reduzido em 50% na prole HFMel vs. HF. Além disso, os genes do metabolismo lipídico, pró-inflamatório e de estresse do retículo endoplasmático (RE), tais como *Il-6*, *Tnfa*, *Chop* e *Atf4*, foram mais expressos na prole HF vs. C, mas reduzidos na prole HFMel vs. HF. Contrariamente, os genes da beta-oxidação e das enzimas antioxidantes – *Ppara*, *Cpt-1b*, *Gpx*, *Gsr* e *Sod* – foram menos expressos na prole HF vs. C, mas melhoraram na prole HFMel vs. HF. Por fim, os genes da via AMPK/mTOR, inicialmente desregulados na HF, foram restaurados na prole HFMel. A progenitora obesa leva a alterações hepáticas na prole. Os achados atuais demonstraram os efeitos da suplementação de melatonina durante a gestação e lactação no fígado da prole adulta. Os efeitos observados foram a atenuação das vias da lipogênese, inflamação, estresse oxidativo e estresse do RE, e a restauração das vias AMPK beta-oxidação, o mitigou a doença hepática gordurosa não alcoólica na prole.

Palavras-chave: Obesidade materna. Programação fetal. Inflamação. Esteatose hepática.

ABSTRACT

AJACKSON, Matheus Barros Lima. *Maternal melatonin supplementation mitigates non-alcoholic fatty liver disease in the offspring of obese mice*. 2023. 53 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

This study aimed to investigate, in the liver of adult offspring, the possible effects of melatonin supplementation in the obese mother during pregnancy and lactation. C57BL/6 females were fed with a control (C) or a high-fat (HF) diet and supplemented with melatonin (Mel) at a dose of 10 mg/kg/day (s.c.) during the pregnancy and lactation, forming the groups: C, CMel, HF, and HFMel. After weaning until three months old, the offspring only received the C diet. The HF mothers and their offspring showed higher body weight (BW) than the C mothers and offspring. However, at 3-mo-old, BW was reduced in HFMel vs. HF offspring. Also, plasmatic and liver lipid markers increased in HF vs. C offspring but were reduced in HFMel vs. HF offspring. Liver lipid content was lessened in HFMel vs. HF offspring by 50 %. Also, lipid metabolism, pro-inflammatory and endoplasmic reticulum (ER) stress genes were higher expressed in HF vs. C offspring but reduced in HFMel vs. HF offspring. Contrarily, beta-oxidation and antioxidant enzyme genes were less expressed in HF vs. C offspring but improved in HFMel vs. HF offspring. Finally, AMPK/mTOR pathway genes, initially dysregulated in the HF, were restored in the HFMel offspring. The obese mother leads to liver alterations in the offspring. Current findings demonstrated the maternal melatonin supplementation during pregnancy and lactation in adult offspring's liver. Consequently, the effects were seen in mitigating the liver's AMPK/mTOR pathway genes, lipogenesis, beta-oxidation, inflammation, oxidative stress, and ER stress, preventing liver disease progression in the offspring.

Keywords: Maternal obesity. Fetal programming. Inflammation. Liver steatosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Linha do tempo do experimento.....	23
Figura 2 –	A suplementação de melatonina em progenitoras obesas reduziu a esteatose hepática nas proles adultas.....	32
Figura 3 –	A suplementação de melatonina em progenitoras obesas reduziu a expressão gênica de marcadores da lipogênese e aumentou a de marcadores da beta-oxidação no fígado das proles adultas.....	33
Figura 4 –	A suplementação de melatonina em progenitoras obesas reduziu a expressão gênica de marcadores pró-inflamatórios e do estresse do retículo endoplasmático no fígado das proles adultas.....	34
Figura 5 –	A suplementação de melatonina em progenitoras obesas aumentou a expressão gênica de enzimas antioxidantes no fígado das proles adultas.....	35
Figura 6 –	A suplementação de melatonina em progenitoras obesas regula a expressão gênica de marcadores da via AMPK no fígado das proles adultas.....	36
Figura 7 –	A suplementação de melatonina em progenitoras regula a expressão gênica de marcadores da via mTOR no fígado das proles adultas.....	38
Figura 8 –	Resumo gráfico	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Macronutrientes, valor energético e ingredientes das dietas experimentais de acordo com a AIN-93G (American Institute of Nutrition) para roedores em período de crescimento e desenvolvimento.....	21
Tabela 2 –	Sequência dos iniciadores senso e antisense utilizados para quantificar a expressão de RNAm e suas vias correspondentes.....	25
Tabela 3 –	Massa corporal, ingestão alimentar, dados plasmáticos e hepáticos das progenitoras.....	28
Tabela 4 –	Massa corporal, ingestão alimentar, dados plasmáticos e hepáticos das proles.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acacb	<i>Acetyl-coa carboxylase beta</i>
AGLs	Ácidos graxos livres
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
Akt1	<i>Protein kinase B 1</i>
ALT	Alanina transaminase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato transaminase
Atf4	<i>Activating transcription factor 4</i>
C	Grupo controle
Cat	Catalase
Chop	<i>CCAAT/-enhancer-binding protein homologous protein</i>
Chrebp	<i>Carbohydrate-responsive element-binding protein</i>
CMel	Grupo controle melatonina
Cpt1b	<i>Carnitine palmitoyltransferase-1b</i>
CT	Colesterol total
DCNT	Doença crônica não transmissível
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DOHaD	<i>Developmental Origins of Health and Disease</i>
Eef2	<i>Eukaryotic translation elongation factor 2</i>
Eif4ebp1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1</i>
Fas	<i>Fatty acid synthase</i>
Gadd45	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible protein</i>
Gpx	<i>Glutathione peroxidase</i>
Gsr	<i>Glutathione-disulfide reductase</i>
HF	Grupo high-fat
HFMel	Grupo high-fat melatonina
IA	Ingestão alimentar
IE	Ingestão energética

Il-1b	Interleucina-1b
Il-6	Interleucina-6
Ir	<i>Insulin receptor</i>
MC	Massa corporal
Mtorc1	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
Mtorc2	<i>Mammalian target of rapamycin complex 2</i>
Nr1h3	<i>Nuclear receptor subfamily 1 group H member 3</i>
Pik3c2a	<i>Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing alpha polypeptide</i>
Ppara	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
Prkag2	<i>Protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 2)</i>
RE	Retículo endoplasmático
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNA _m	RNA mensageiro
Rps6kb1	<i>Ribosomal protein s6 kinase B1</i>
RT-qPCR	Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction
s.c.	Subcutâneo
Sirt1	<i>Sirtuin 1</i>
Sod	<i>Superoxide dismutase</i>
Srebf1	<i>Sterol regulatory element binding transcription factor 1</i>
TAG	Triacilglicerol
Tbp	<i>TATA-box binding protein</i>
Tnfa	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Tsc2	<i>Tuberous sclerosis complex 2</i>
Ulk3	<i>Unc-51-like kinase 3</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

°	Grau
±	Mais ou menos
°C	Grau celcius
%	Porcentagem
h	Hora
Kcal	Quilocaloria
g	Gramma
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
µg	Micrograma
x g	Força centrífuga relativa
µm	Micrômetro
V _v _[esteatose, figado]	Densidade de volume da esteatose hepática
% (v/v)	Percentual de volume por 100 mL de solução
pH	Potencial hidrogeniônico
Δ	Delta
min	Minuto
s	Segundo
<	Menor que
dL	Decilitro
U	Unidade
mL	Mililitro
≠	Diferente
*	Asterisco
x	Multiplicação

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	OBJETIVOS	20
1.1	Geral	20
1.2	Específicos	20
2	MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1	Animais, dieta e melatonina	21
2.2	Sacrifício	24
2.3	Análises plasmáticas e hepáticas	24
2.4	Análise histológica do fígado	24
2.5	Expressão gênica	25
2.6	Análises estatísticas	27
3	RESULTADOS	28
3.1	Progenitoras	28
3.2	Proles	29
3.2.1	<u>A suplementação de melatonina nas progenitoras modula o ganho de massa corporal e ingestão alimentar das proles</u>	30
3.2.2	<u>A suplementação de melatonina nas progenitoras melhora o metabolismo lipídico e a função hepática das proles adultas</u>	31
3.2.3	<u>A suplementação de melatonina nas progenitoras reduz a esteatose hepática das proles adultas</u>	31
3.2.4	<u>A suplementação de melatonina nas progenitoras melhora a expressão gênica de marcadores do metabolismo lipídico no fígado das proles adultas</u>	32
3.2.5	<u>A suplementação de melatonina nas progenitoras melhora a expressão gênica de marcadores pró-inflamatórios e do estresse do retículo endoplasmático no fígado das proles adultas</u>	33
3.2.6	<u>A suplementação de melatonina nas progenitoras atenua o estresse oxidativo no fígado das proles adultas</u>	34
3.2.7	<u>A suplementação de melatonina nas progenitoras desempenha um papel regulador na via AMPK do fígado das proles adultas</u>	35
3.2.8	<u>A suplementação de melatonina nas progenitoras desempenha um papel regulador</u>	

	<u>na via mTOR do fígado das proles adultas</u>	37
4	DISCUSSÃO	39
	CONCLUSÕES	44
	REFERÊNCIAS	45
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética.....	52
	ANEXO B - Artigo científico publicado	53

INTRODUÇÃO

A influência da nutrição e do metabolismo materno sobre seus descendentes remontam os estudos iniciados por Barker, realizados nas décadas de 1980 e 1990, que incorporaram aos fatores de risco para doenças crônicas não-transmissíveis (DCNTs) a interação do metabolismo e o estado nutricional maternos com o feto em desenvolvimento (1–3). Nesse período, foram realizados uma série de estudos retrospectivos em diferentes regiões do continente europeu que sofreram com restrições dietéticas. No País de Gales e na Inglaterra, observou-se um aumento da incidência na mortalidade por doença cardíaca isquêmica em adultos durante os anos de 1968-78 e uma forte correlação geográfica foi estabelecida com a mortalidade infantil pela mesma causa em 1921-25 (2). Ambos os eventos foram atribuídos à má nutrição pré-natal, neonatal e pós-natal.

Adicionalmente, em outro estudo, observou-se o efeito da desnutrição intrauterina e o risco para DCNTs na vida adulta, no contexto histórico da restrição da entrada de alimentos à Leningrado – atual São Petesburgo, Rússia – durante três anos, imposto pela Alemanha durante a Segunda Guerra Mundial (4). Esses indivíduos apresentaram risco maior de obesidade e hipertensão arterial sistêmica na vida adulta em comparação com os não expostos à desnutrição, ou ainda, os que foram expostos apenas no período pós-natal. Ainda nesse contexto histórico, durante a chamada fome holandesa, a população dos territórios invadidos na Holanda apresentou uma drástica redução da ingestão energética por uma duração de cinco meses e na libertação por tropas americanas tiveram um acesso de abundância alimentar (5).

Nos diferentes estudos supracitados, houve um insulto intrauterino por desnutrição energético-proteica, o que foi determinante para a concepção da hipótese do fenótipo poupador. Essa hipótese relaciona a fisiopatogenia do diabetes mellitus tipo 2 (DM2) com o baixo peso ao nascer (6), sugerindo que a desnutrição materna leva a um crescimento fetal insuficiente, adaptado ao ambiente intrauterino nutricionalmente depletado resultando, entre outras coisas, em uma disfunção da célula beta pancreática e a uma capacidade reduzida de responder à insulina que se estende para a vida adulta (7,8). Alternativamente, desenvolveu-se também a hipótese da insulina fetal, que propõe que o baixo peso ao nascer e o DM2 da vida adulta são diferentes fenótipos do mesmo genótipo (6). Nesta hipótese, foi proposto que a resistência à insulina, determinada geneticamente e expressa desde a concepção, afeta o crescimento intrauterino e explica as relações entre DM2 e baixo peso ao nascer observadas em estudos epidemiológicos (9).

Desde então, esses estudos têm sido conceitualmente expandidos para incluir os períodos de pré-concepção e periconcepção, outras exposições intrauterinas e desfechos após o nascimento – como a explorada neste trabalho, com a melatonina –, e foi desenvolvido o conceito chamado de Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença, do inglês *Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)* (10).

A obesidade materna nos períodos críticos do desenvolvimento tem se tornado um grande desafio, em vista da crescente incidência da doença e de seu caráter pandêmico (11). A obesidade é uma DCNT multifatorial que se origina de um balanço energético positivo capaz de prejudicar a homeostase do tecido adiposo, especialmente quando o acúmulo de triacilgliceróis (TAGs) no tecido adiposo visceral supera o próprio limite de armazenamento com a influência da resistência à insulina (12). Esse tecido passa a expressar um fenótipo mais lipolítico e pró-inflamatório do que lipogênico e anti-inflamatório, disponibilizando maior quantidade de ácidos graxos livres (AGLs) e adipocinas pró-inflamatórias na circulação sistêmica, podendo impactar na saúde do feto através da placenta (13).

A placenta é um órgão transitório composto por células epiteliais especializadas, regulada por citocinas e hormônios, que age como uma interface metabólica materno-fetal e responde a diferentes estímulos para manter a viabilidade fetal (14). O influxo de lipídeos das progenitoras para o feto é mediado pela placenta, após a interação de complexos de AGLs ligados à albumina e lipoproteínas com seus receptores de membrana nos microvilos placentários para serem hidrolisados e, em sequência, direcionados à circulação fetal (11). Esses mecanismos estão mais ativados em contextos de dislipidemia associada à obesidade, o que aumenta a adiposidade e a resistência à insulina fetal, predispondo-os à doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) na vida adulta (15).

A DHGNA é prevalente em aproximadamente um quarto de adultos ao redor do mundo e é estabelecida como o componente hepático da síndrome metabólica, apresentando estreita relação com a obesidade e DM2 (16). Em estudos experimentais, a dieta high-fat materna durante períodos críticos do desenvolvimento induz alterações morfológicas e moleculares no fígado de suas proles, o que pode culminar em prejuízo de sua função em longo prazo (17). Essas alterações envolvem aumento do tamanho do fígado e acúmulo de gotículas de gordura, configurando uma condição patológica análoga a esteatose hepática em humanos, o estágio inicial da DHGNA (18–20). A manutenção de insultos ao longo do tempo, como o estado pro-inflamatório sistêmico e a lipotoxicidade, podem suscetibilizar a progressão da esteatose para a esteatohepatite (21).

Pela complexidade de sua fisiopatologia, a DHGNA têm sido alvo de discussões em torno do seu diagnóstico, como o impacto do consumo de álcool, e a proposição da designação da doença como “doença hepática gordurosa associada à disfunção metabólica” (22). Adicionalmente, sua etiologia pode ser entendida a partir da hipótese dos múltiplos hits paralelos, que propõe que as adipocinas pro-inflamatórias oriundas do tecido adiposo metabolicamente estressado se associam com componentes derivados da dieta e sua interação com a microbiota intestinal como estressores da biologia celular do hepatócito (23).

Progenitoras obesas podem dispor de mitocôndrias disfuncionais para suas proles, contribuindo para o estabelecimento da esteatose e prejuízo da lipogênese e beta-oxidação (24,25). Além disso, a progressão da DHGNA é marcada por estresse oxidativo (26), estresse do retículo endoplasmático (RE) (27) e desregulação das vias mTOR-AMPK (28).

Portanto, reduzir os efeitos da obesidade materna no metabolismo da prole é de grande importância. O papel da melatonina na gravidez está emergindo, mas os efeitos a longo prazo da suplementação materna de melatonina não estão bem definidos (29). A melatonina (N-acetil-5-metoxi triptamina), um hormônio pleiotrópico secretado pela glândula pineal, que não está apenas implicada no ritmo circadiano, mas também tem propriedades bioativas anti-inflamatórias na regulação epigenética e no desenvolvimento fetal (30–32). Além de neutralizar diretamente as espécies reativas de oxigênio, a melatonina e seus metabólitos podem modular muitas enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), levando a uma redução no dano oxidativo às mitocôndrias e outras organelas (33,34).

A melatonina tem papel protetor na função hepática na DHGNA, DM2 e fibrose hepática. Com base em uma meta-análise, a suplementação de melatonina pode melhorar as enzimas hepáticas, como aspartato aminotransferase, em pacientes com DHGNA (35). A melatonina diminuiu atividade das enzimas lipogênicas hepáticas, incluindo o fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol 1 (SREBP1c) e ácido graxo sintase (FAS) (36). Além disso, a melatonina tem um papel protetor no estresse do retículo endoplasmático (37) e interage com a via mTOR/AMPK (38).

Essas evidências mostram que a suplementação de melatonina na gestação e lactação pode exercer um papel protetor para o fígado na prole de progenitoras com obesidade. A hipótese deste trabalho foi testar se a suplementação materna de melatonina durante a gestação e lactação em um modelo de obesidade induzida por dieta em camundongos preveniria o desenvolvimento esteatose hepática na prole masculina adulta.

1 OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da suplementação de melatonina em camundongas obesas durante os períodos críticos do desenvolvimento – preconcepção, gestação e lactação – na programação da esteatose hepática de suas proles do sexo masculino.

1.2. Objetivos específicos

- 1.2.1. Descrever a massa corporal, ingestão alimentar e energética das progenitoras e das proles masculinas;
- 1.2.2. Analisar as concentrações plasmáticas de marcadores de dano hepático e do metabolismo lipídico nas progenitoras e das proles masculinas;
- 1.2.3. Avaliar no fígado o remodelamento e dano hepático através de técnicas estereológicas, nas proles masculinas;
- 1.2.4. Determinar a expressão relativa de RNA mensageiro (RNAm) de marcadores de diferentes vias (lipogênese, beta-oxidação, inflamação, estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático) envolvidas na progressão da DHGNA.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais, dieta e melatonina

O experimento foi realizado após aprovação da comissão de ética para o cuidado e uso de animais experimentais da UERJ (Protocolo CEUA nº 003/2021; Anexo A) e conduzido de acordo com diretrizes para experimentação animal – *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition* e *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments* (39,40). Para isso, camundongos da linhagem C57BL/6 foram mantidos em caixas ventiladas de polipropileno sob condições controladas para experimentação (NexGen System, Allentown Inc., PA, EUA, 21±2 °C) em um ciclo claro/escuro de 12/12h e com livre acesso a água e dieta.

Camundongas fêmeas com quatro semanas de vida, nomeadas de progenitoras, foram agrupadas aleatoriamente de acordo com as dietas experimentais, um grupo recebeu dieta hiperlipídica (em inglês, *high-fat*, HF) para induzir a obesidade, e outro grupo recebeu dieta controle (C). Os camundongos machos de mesma idade, nomeados progenitores, foram alimentados com dieta controle. As dietas foram produzidas pela empresa Pragsoluções Biociências (<http://www.pragsolucoes.com.br/> Jaú, SP, Brasil) de acordo com as recomendações nutricionais para roedores em períodos de crescimento e desenvolvimento estabelecidas pelo *American Institute of Nutrition* (AIN-93G), conforme descrito na Tabela 1 (39, 40).

Tabela 1 - Macronutrientes, valor energético e ingredientes das dietas experimentais de acordo com a AIN-93G (*American Institute of Nutrition*) para roedores em período de crescimento e desenvolvimento.

Macronutrientes	Controle	High-fat
Proteínas (energia %)	19	19
Lipídeos (energia %)	17	49
Carboidratos (energia %)	64	32
Energia (kcal/g)	3,95	4,95
Ingredientes (g/Kg)		
Amido de milho	539,5	299,5
Antioxidantes	0,014	0,028
Banha de porco	-	200,0

Caseína	190	230
Cistina	3,0	3,0
Colina	2,5	2,5
Fibra	50,0	50,0
Mistura de minerais	35,0	35,0
Mistura de vitaminas	10,0	10,0
Óleo de soja	70,0	70,0
Sacarose	100,0	100,0
<hr/> Massa total (g)	1.000,0	1.000,0

Fonte: adaptada de (41).

Durante todo o experimento, a ingestão alimentar (IA) diária e a massa corporal (MC) semanal foram registradas e a ingestão energética (IE) foi calculada a partir do produto da IA e o valor energético da respectiva dieta. Após seis semanas de exposição às dietas, as progenitoras C e HF foram redivididas de acordo com a suplementação de melatonina (Mel) ou veículo, formando assim quatro grupos de estudo (n=10/grupo): Grupo C, as progenitoras receberam dieta controle e veículo; Grupo CMel, as progenitoras receberam dieta controle e melatonina; Grupo HF, as progenitoras receberam dieta HF e veículo; Grupo HFMel, as progenitoras receberam dieta HF e melatonina.

A melatonina (M5250, Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi administrada por via subcutânea, na dose de 10 mg/Kg/dia, uma hora após o início do ciclo escuro (42), em um veículo composto por uma solução alcoólica-salina (43), formando os grupos de progenitoras CMel e HFMel. As progenitoras dos grupos C e HF receberam apenas o veículo. Toda a manipulação e administração da melatonina foi realizada em ambiente com baixa luminosidade e em recipientes envolvidos com papel alumínio, devido a fotossensibilidade da melatonina (44). Durante esse período, a mensuração da massa corporal foi realizada diariamente, considerando as variações inerentes ao período gestacional, para cálculo da dose por cada animal.

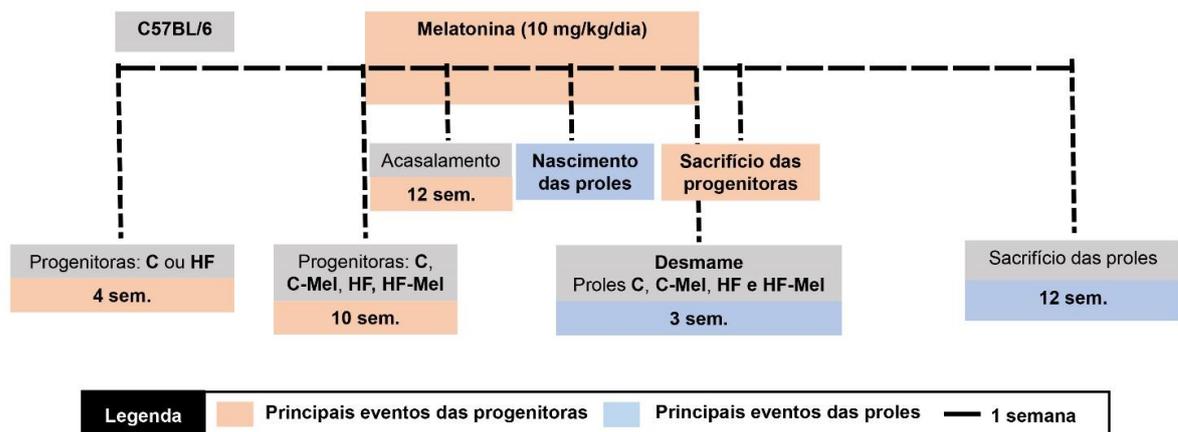
Na idade de 12 semanas, pares de camundongos, formados por uma progenitora e um progenitor, foram alocados em uma nova caixa para acasalarem. Após a confirmação da cópula por visualização do plugue vaginal e/ou ganho ponderal, as progenitoras foram alocadas individualmente em caixas com as respectivas dietas e com o esquema de suplementação de melatonina ou de veículo, para seguirem com a gestação de três semanas. Ao nascimento, o sexo das proles foi determinado pela distância ano-genital (45) e a massa

corporal (MC) foi mensurada. As proles foram mantidas com suas respectivas progenitoras em ninhadas de seis filhotes até o desmame.

A suplementação de melatonina foi realizada em um total de oito semanas: iniciada duas semanas antes do acasalamento e mantida durante a gestação e até o fim da lactação (o período de gestação e de lactação no roedor tem a duração de três semanas cada). Os progenitores e as progenitoras foram sacrificados uma semana após o desmame dos filhotes.

Um macho de cada ninhada foi removido para formar os grupos experimentais ($n = 10/\text{grupo}$). As proles foram identificadas de acordo com a dieta e a suplementação materna, da seguinte forma: C, CMel, HF e HFMel e receberam dieta controle até os três meses, idade em que foram sacrificados. As fêmeas foram desconsideradas neste estudo. A Figura 1 mostra a linha do tempo do experimento.

Figura 1 – Linha do tempo do experimento



Legenda: C, grupo controle; HF, grupo *high-fat*; Mel, suplementados com melatonina.

Nota: Progenitoras C57BL/6 foram agrupadas de acordo com as dietas C ou HF na 4ª semana de vida.

Na 10ª semana de vida, iniciou-se a suplementação de melatonina (10mg/Kg/dia) ou de veículo nas progenitoras. As progenitoras foram então reagrupadas da seguinte maneira: C, CMel, HF e HFMel. A suplementação contemplou os períodos de precepção, gestação e lactação. Na 12ª semana de vida, as progenitoras foram submetidas ao acasalamento. As proles nasceram após 3 semanas de gestação e pelas 3 semanas seguintes, ocorreu a lactação. Ao desmame, os filhotes machos foram aleatoriamente agrupados de acordo com as respectivas dietas e tratamento de suas progenitoras. Os filhotes na 12ª semana de vida foram sacrificados.

Fonte: O Autor, 2022.

2.2 Sacrifício

As progenitoras e os progenitores foram sacrificados uma semana após o desmame da prole. Os filhotes foram sacrificados na 12ª semana de vida. Após 6 horas de jejum, os animais foram submetidos a sobredose anestésica intraperitoneal de Ketamina (240 µg/g) e Xilazina (15 µg/g). Após a ausência de resposta a estímulos dolorosos, a cavidade torácica foi exposta para coleta de sangue através de punção cardíaca do ventrículo direito. As amostras de sangue foram heparinizadas, o plasma foi separado por centrifugação em 712 x g por 15 min e então congelado a -80°C. Os fígados foram dissecados, fragmentados e fixados em formalina neutra tamponada 4 % (v/v; tampão fosfato pH 7,2) em temperatura ambiente para análise histológica ou congelados a -80°C para RT-qPCR.

2.3 Análises plasmáticas e hepáticas

As concentrações plasmáticas de alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) foram quantificadas pelo método cinético UV através de um espectrofotômetro semiautomático (Kits K048 e K049, Bioclin System II, Quibasa Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil). Da mesma forma, as concentrações plasmáticas e hepáticas de colesterol total (CT) e triacilgliceróis (TAG) foram determinadas (Kits K083 e K117). As concentrações de IL-6 foram determinadas por imunoenensaio multiplex (HMHEMAG-34K, Millipore, Billerica, MA, EUA).

2.4 Análise histológica do fígado

Os fragmentos de fígado previamente fixados em formalina neutra tamponada foram incluídos em Paraplast plus (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA). A secção do material foi realizada com espessura de 5µm e a coloração feita com hematoxilina-eosina (HE). A estereologia em imagens digitais, capturadas por uma câmera digital (Infinity 1, Lumenera, Ottawa, ON, Canadá) acoplada ao microscópio de luz (Leica DMRBE, Wetzlar, Germany),

foi utilizada para quantificar, através de um sistema-teste de 64 pontos sobrepostos às fotomicrografias (n = 10/grupo), a densidade de volume de esteatose hepática ($V_{V[\text{esteatose, fígado}]}$) determinada pela razão entre os pontos parciais que tocaram as gotículas de gordura e os pontos totais da grade (Equação 1).

$$V_{V[\text{Esteatose, fígado}]} = P_P/P_T \quad (1)$$

2.5 Expressão gênica

Para análise quantitativa da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), a extração de RNA do fígado foi realizada a partir do método orgânico utilizando-se do TRIzol (Invitrogen, Waltham, MA, EUA). A concentração de RNA foi determinada por espectroscopia através do Nanovue (GE Life Sciences, Boston, MA, EUA) e 1 µg de RNA foi tratado com 1 µl DNase I (Invitrogen, Waltham, MA, EUA). A síntese de cDNA foi realizada a partir de primers Oligo dTs. Para realizar o protocolo do RT-qPCR, foi utilizado o equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA) e SYBR Green mix (Invitrogen, Waltham, MA, EUA). A *tata-box protein* (Tbp) foi o controle endógeno usado para normalizar a expressão dos genes selecionados. Os padrões de termociclagem foram: pré-desnaturação de 50° C por 2 min e 95° C por 2 min, seguidos por ciclos de 95° C por 15s e 60° C por 1 min, seguindo um programa de curva de fusão de 50° C a 95° C com taxa de aquecimento de 0,5° C por 10 s. Os controles negativos consistiram em poços em que o cDNA foram substituídos por água deionizada. A razão entre a expressão de RNAm relativa (RQ) foi calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta CT}$, na qual $-\Delta CT$ representa a diferença entre o número de ciclos dos genes alvo e o controle endógeno (46,47). Os iniciadores estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Sequência dos iniciadores senso e antisenso utilizados para quantificar a expressão de RNAm e suas vias correspondentes.

Iniciadores	Sentido (5' à 3')	Antisenso (3' à 5')
Gene constitutivo		
<i>Tbp</i>	CAAACCTCTGACCACTGCACC	CTGCGGTACAATTCCAGAGC
Lipogênese		
<i>Fas</i>	TCGAGGAAGGCACTACACCT	CACCCACTGGAAGCTGGTAT

<i>Srebf1</i>	GCAGTGGTGGTAGTGACTCT	TCAGACACAGAAAGGCCAGT
Beta-oxidação		
<i>Cpt1b</i>	GTCGCTTCTTCAAGGTCTGG	CGAGGATTCTCTGGAAGTGC
<i>Ppara</i>	TCGGACTCGGTCTTCTTGAT	TCTTCCCAAAGCTCCTTCAA
Inflamação		
<i>Il-1b</i>	TGTAATGAAAGACGGCACACC	TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG
<i>Il-6</i>	TTCTTGGGACTGATGCTGGT	CAGGTCTGTTGGGAGTGGTA
<i>Tnfa</i>	CCACCACGCTCTTCTGTCTA	CTGATGAGAGGGAGGCCATT
Estresse do RE		
<i>Atf4</i>	CCGAGATGAGCTTCCTGAAC	ACCCATGAGGTTTCAAGTGC
<i>Chop</i>	CTGCCTTTCACCTTGGAGAC	CGTTTCCTGGGGATGAGATA
<i>Gadd45</i>	GCGAGAACGACATCAACATC	GTTCGTCAACCAGCACACAGT
Estresse oxidativo		
<i>Cat</i>	ACATGGTCTGGGACTTCTGG	CAAGTTTTTGGATGCCCTGGT
<i>Gpx</i>	GTCCACCGTGTATGCCTTCT	TCTGCAGATCGTTCATCTCG
<i>Gsr</i>	CACGACCATGATTCCAGATG	CAGCATAGACGCCTTTGACA
<i>Sod</i>	AACCATCCACTTCGAGCAGA	GGTCTCCAACATGCCTCTCT
Via AMPK		
<i>Acacb</i>	GTATACGGTGGAGGACGAG	CGCTTGATGTACTTCACCG
<i>Chrebp</i>	CACTGAGTGTCCACCTGTCT	ACGTCGGTTCTCCATCTTGT
<i>Nr1h3</i>	TAGAGAGGCTGCAACACACA	TGAATGGACGCTGCTCAAAG
<i>Prkag2</i>	TCACCCAGACACTCCCATC	CTCATCCACCACAGGCAAG
<i>Sirt1</i>	TCCACGGTGTGAGGTATAC	GCCACTGTCACTGTTACTGC
<i>Tsc2</i>	ATGGTGTACTGCCTGGAACA	TGGCAGAAATGTGTGTGAGC
<i>Ulk3</i>	GCCTCCAGATCGTTCTCAGA	GCTCTAGAAGTCGCTGCAAC
Via mTOR		
<i>Akt1</i>	GCTGCTCAAGAAGGACCCT	CATACACATCCTGCCACACG
<i>Eef2</i>	GTGTTTCGACGCCATCATGAA	TCCTTGTCTTTGTCTCGCT
<i>Eif4ebp1</i>	TCTGATGGAGTGTGCGAACT	CTAGTGACCCAGGAATGGC
<i>Ir</i>	CAGGAATGGCTTGTGTTGGTCTTA	TGCAGTGCTATGGCACATTTGA
<i>Mtorc1</i>	CTCTTTGGCCTGGTGAACAC	AGTTGGTGGACAGAGGGATG
<i>Mtorc2</i>	ACAGCCAAGTCCTTCAGCAT	CACAAACCTGTGCAACTGCT
<i>Pik3c2a</i>	ATGGGACCAGTAGTTTGCCA	GCCTGGATTTGTGCAGTGAT
<i>Rps6kb1</i>	TGGATTGGTGGAGTTTGGGA	TCGAGCTTCTTGTGTGAGGT

Legenda: *Acacb*, Acetil-coa carboxilase beta; *Akt1*, Proteína quinase B 1; *Atf4*, Fator 4 ativador da transcrição; *Cat*, Catalase; *Chop*, Proteína homóloga à proteína ligadora do CCAAT/potenciador; *Cpt1b*, Carnitina palmitoil transferase-1b; *Chrebp*, Proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidratos; *Eef2*, Fator de alongamento eucariótico 2; *Eif4ebp1*, Proteína 1 de ligação ao fator de iniciação da tradução eucariótica 4E; *Fas*, Ácido graxo sintase; *Gadd45*, Genes de parada de crescimento e dano ao DNA; *Gpx*, Glutaciona peroxidase; *Gsr*, Glutaciona redutase; *Il-1b*, Interleucina-1b; *Il-6*, Interleucina-6; *Ir*, Receptor de insulina; *Mtorc1*, Complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos; *Mtorc2*, Complexo 2 do alvo da rapamicina em mamíferos; *Nr1h3*, Receptor nuclear subfamília 1 grupo H membro 3; *Pik3c2a*, Polipeptídeo alfa contendo o domínio

C2 de fosfatidilinositol-4-fosfato 3-quinase; *Ppara*, Receptor ativador da proliferação peroxissomal alfa; *Prkag2*, Proteína quinase ativada por AMP não-catalítico subunidade gama-2; *Rps6kb1*, Proteína ribossômica s6 quinase B1; *Sirt1*, Sirtuína 1; *Sod*, Superóxido dismutase; *Srebf1*, Fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol 1; *Tbp*, Proteína de ligação TATA; *Tnfa*, Fator de necrose tumoral alfa; *Tsc2*, Hamartina; *Ulk3*, Quinase 3 semelhante à unc-51.

Fonte: O autor, 2022.

2.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism v. 9.4.0 para Windows (San Diego, CA, EUA). Os dados foram testados para normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk para pequenas amostras e para homoscedasticidade das variâncias pelo teste de Bartlett. Em seguida, os dados foram apresentados em média e desvio padrão e as diferenças foram analisadas por teste T de Welch (em comparação de dois grupos) ou ANOVA de dois fatores (em comparações de quatro grupos), seguida pelo pós-teste Tukey de comparações múltiplas. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando o P valor < 0,05 (48).

3 RESULTADOS

3.1 Progenitoras

Para descrição dos dados relativos às progenitoras na Tabela 3, os marcos temporais foram descritos a partir dos seguintes momentos: o início das dietas experimentais, na 4ª semana de vida; o início da administração de melatonina, que ocorreu na 10ª semana de vida; e o acasalamento, que ocorreu na 12ª semana de vida.

Tabela 3 - Massa corporal, ingestão alimentar, dados plasmáticos e hepáticos das progenitoras.

Dados	Grupos			
	C	CMel	HF	HFMel
Antes do acasalamento				
<u>Antes da administração de melatonina</u>				
MC (g, n=20)	17,6±0,85		18,9±0,78 a	
IA (g/animal/dia, n=20)	1,4±0,17		1,4±0,14	
IE (kJ/animal/dia, n=20)	23,5±2,86		28,9±2,90 a	
<u>Após a administração de melatonina</u>				
MC (g, n=10)	19,4±0,72	19,9±1,39	21,5±0,79 a	20,5±0,45
Após o acasalamento				
MC (g, n=10)	21,6±0,73	21,9±0,93	23,9±0,70 a	22,3±0,80 b
TAG hepático (mg/dL/g, n=5)	1,8±0,21	2,1±0,22	2,5±0,62 a	1,6±0,24 b
TAG plasmático (mg/dL, n=5)	54,9±3,00	56,9±1,51	61,8±1,61 a	60,1±2,15
CT hepático (mg/dL/g, n=5)	0,97±0,01	0,95±0,03	1,02±0,02 a	0,96±0,02 b
CT plasmático (mg/dL, n=5)	99,7±1,10	102,4±2,14	113,4±2,61 a	111,3±1,10

Legenda: Dados apresentados como média ± desvio padrão, analisados pelo teste t de Welch ou ANOVA de dois fatores, e pós-teste de Tuckey. $P < 0.05$, onde, a ≠ C; b ≠ HF. C, grupo controle; CT, colesterol total; HF, grupo *high-fat*; IA, ingestão alimentar; IE, ingestão energética; MC, massa corporal; Mel, suplementados com melatonina; TAG, triacilglicerol.

Fonte: O autor, 2022.

Antes do acasalamento e do início da administração de melatonina, a massa corporal aumentou +7% na comparação HF vs. C. Adicionalmente, apesar de não haver diferença na ingestão alimentar entre as progenitoras, a ingestão energética aumentou +23% na comparação HF vs. C, devido ao maior valor energético atribuído à dieta *high-fat*. Após o início da administração de melatonina, a massa corporal das progenitoras manteve-se maior

(+11%) na comparação HF vs. C. Contudo, não houve diferença da massa corporal na comparação HFMel vs. HF.

Após o acasalamento, a massa corporal foi maior no grupo HF em comparação com o grupo C (+11%) e menor no grupo HFMel em comparação com o grupo HF (-7%). Além disso, marcadores do metabolismo de lipídeos das progenitoras HF apresentaram-se aumentados tanto a níveis plasmáticos (TAG +13%; CT: +14%) quanto hepáticos (TAG: +39%; CT: +5%). Entretanto, nas progenitoras HFMel comparadas às HF, as concentrações hepáticas de TAG e CT se apresentaram diminuídas (TAG: -30%; CT: -10%), enquanto que o TAG e TC plasmáticos não foram alterados.

3.2 Proles

A partir deste parágrafo e até o final desta seção, todos os resultados descritos são relativos às proles machos. A massa corporal, ingestão alimentar, dados plasmáticos e hepáticos relativos às proles estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Massa corporal, ingestão alimentar, dados plasmáticos e hepáticos das proles.

Dados	Grupos			
	C	CMel	HF	HFMel
MC ao nascer (g, n=10)	1,20±0,03	1,40±0,04 a	1,50±0,05 a	1,40±0,03
MC ao desmame (g, n=10)	6,40±0,32	7,10±0,21 a	8,70±3,4 a	8,20±0,10
MC três meses (g, n=10)	20,5±0,40	20,7±0,42	22,6±0,32 a	20,7±0,45 b
IA (g/animal/dia, n=10)	1,50±0,04	1,50±0,07	1,70±0,02 a	1,50±0,05 b
IE (kJ/animal/dia, n=10)	24,20±0,70	24,30±1,10	27,80±0,30 a	25,0±0,81 b
Massa hepática (g, n=10)	0,70±0,02	0,70±0,06	0,80±0,04 a	0,70±0,02 b
Massa hepática/MC (% , n=10)	3,40±0,21	3,40±0,30	3,60±0,17	3,50±0,16
TAG hepático (mg/dL/g, n=5)	1,8±0,4	1,8±0,5	3,70±0,32 a	2,60±0,45 b
CT hepático (mg/dL/g, n=5)	0,90±0,02	0,90±0,01	1,0±0,05 a	0,90±0,03 b
TAG plasmático (mg/dL, n=5)	62,50±2,21	60,30±7,45	75,70±1,44 a	60,6±2,2 b
CT plasmático (mg/dL, n=5)	99,80±1,46	101,50±1,15	120,0±3,8 a	100,10±0,72 b
AST plasmática (U/L, n = 5)	98,6±16,0	129,8±43,5	206,2±18,6 a	130,5±22,7 b

ALT plasmática (U/L, n = 5)	23,4±4,1	19,40±3,64	34,4±2,7 a	25,80±3,03 b
IL-6 plasmática (pg/mL, n = 5)	7,10±1,20	8,50±2,00	13,60±2,00 a	7,60±1,17 b

Legenda: Dados apresentados como média ± desvio padrão, analisados pelo ANOVA de dois fatores e pós-teste de Tuckey. $P < 0.05$, onde, $a \neq C$; $b \neq HF$. ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; C, grupo controle; CT, colesterol total; HF, grupo *high-fat*; IA, ingestão alimentar; IE, ingestão energética; IL, interleucina; Mel, suplementados com melatonina; MC, massa corporal; TAG, triacilglicerol.

Fonte: O autor, 2022.

3.2.1 A suplementação de melatonina nas progenitoras modula o ganho de massa corporal e ingestão alimentar das proles

Foram apresentadas as mensurações de massa corporal nos seguintes momentos: ao nascer, ao desmame e aos três meses de idade. Ao nascer, a massa corporal foi ligeiramente maior na comparação do grupo CMel vs. grupo C (+17%) e acentuadamente maior na comparação do grupo HF vs. Grupo C (+25%). Ao desmame, este padrão da massa corporal se manteve tanto na comparação do grupo CMel vs. grupo C (+11%), como na comparação do grupo HF vs. grupo C (+36%). Entretanto, aos três meses de idade, não houve diferença na massa corporal das proles CMel vs. C. Além disso, apesar de não ter havido diferença na massa corporal na comparação do grupo HFMel vs. grupo HF ao nascer e nem ao desmame, no terceiro mês de idade, entretanto, houve uma redução de -8% na massa corporal no grupo HFMel em comparação com o grupo HF.

A ingestão alimentar foi aumentada (+13%) na comparação do grupo HF vs. grupo C e reduzida (-12%) na comparação do grupo HFMel vs. grupo HF. A ingestão energética foi maior (+15%) na comparação dos grupos HF vs. C, e menor (-10%) no grupo HFMel vs. grupo HF.

Foi notório o aumento da massa hepática (+14%) na comparação do grupo HF vs. grupo C e houve redução (-13%) da massa hepática no grupo HFMel vs. grupo HF. Entretanto, quando foi considerada a razão entre a massa hepática e a massa corporal, não houve diferenças entre os grupos estudados.

3.2.2 A suplementação de melatonina nas progenitoras melhora o metabolismo lipídico e a função hepática das proles adultas

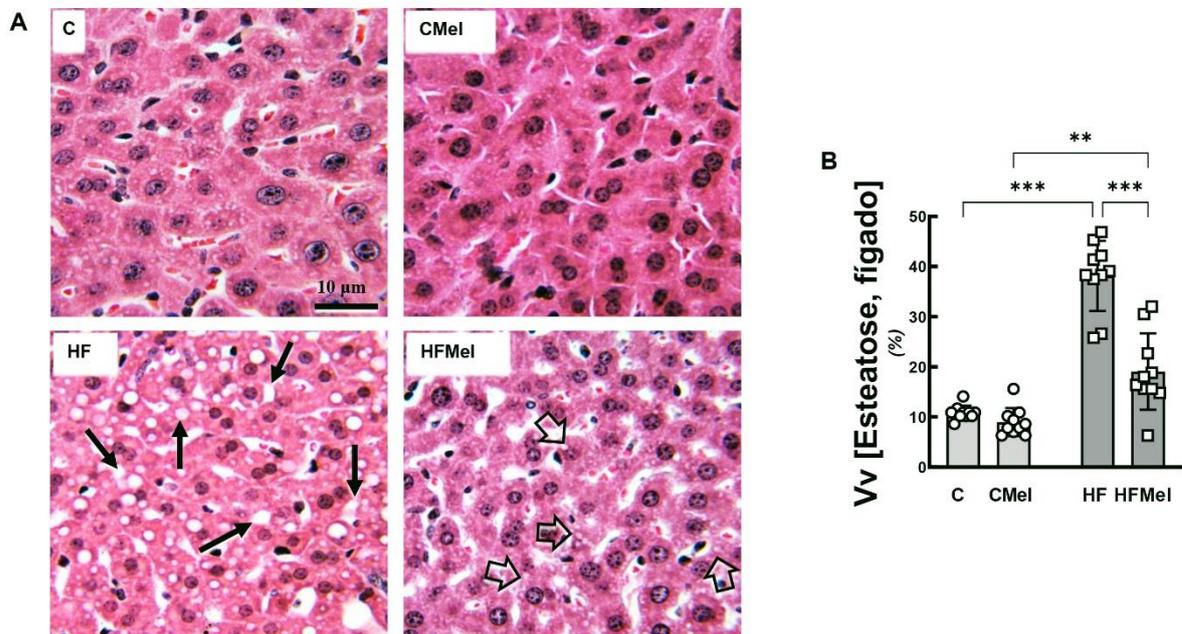
Em relação ao metabolismo lipídico, foram determinadas as respectivas concentrações hepáticas e plasmáticas de TAG e CT. No fígado, comparando o grupo HF vs. grupo C, ambos se apresentaram aumentados (TAG: +106%; CT: +11%) e, comparando o grupo HFMel vs. grupo HF, esses valores foram reduzidos (TAG: -30%; CT: -10%). No plasma, o TAG e CT, comparando HF vs. C, ambos se apresentaram aumentados (TAG: +21%; CT: +20%) e, comparando o grupo HFMel vs. grupo HF, esses valores foram reduzidos (TAG: -20%; CT: -17%).

Para avaliar a função hepática, foram determinadas as respectivas concentrações de AST e ALT no plasma. Ambas se apresentaram aumentadas (AST: +109%; ALT: +47%) na comparação do grupo HF vs. grupo C e reduzidas (AST: -37%; ALT: -25%) no grupo HFMel vs. grupo HF. Adicionalmente, a IL-6 plasmática se apresentou aumentada (+92%) na comparação do grupo HF vs. grupo C e reduzida (-44%) no grupo HFMel vs. grupo HF.

3.2.3 A suplementação de melatonina nas progenitoras reduz a esteatose hepática das proles adultas

Não foi observada esteatose hepática significativa nos grupos C e CMel. Entretanto, na comparação entre os grupos HF vs. C, houve um aumento de +215% na densidade de esteatose hepática, $V_{V[\text{esteatose}]}$ no grupo HF. Houve também uma redução de -50% na densidade de volume de esteatose hepática no grupo HFMel em comparação com o grupo HF (Figura 2).

Figura 2 - A suplementação de melatonina em progenitoras obesas reduziu a esteatose hepática nas proles adultas.



Legenda: C, grupo controle; HF, grupo *high-fat*; Mel, suplementados com melatonina; V_v, densidade de volume da esteatose hepática.

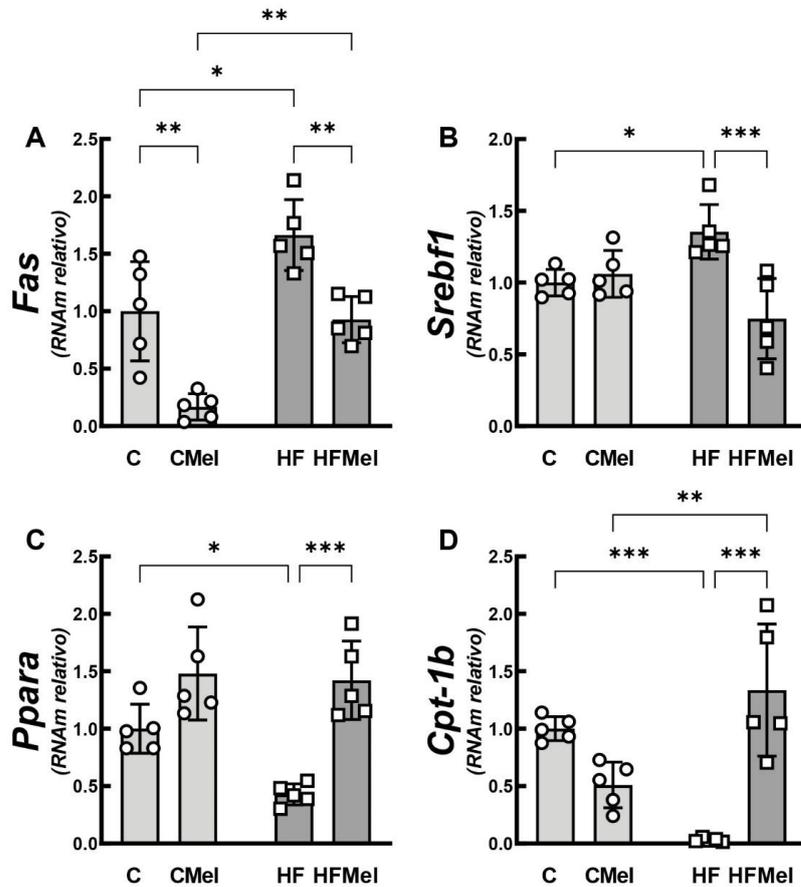
Nota: A – Fotomicrografias do fígado das proles adultas. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina e as imagens foram capturadas com o mesmo aumento (40x). Os grupos estão identificados no canto superior esquerdo. O grupo HF apresenta esteatose bem pronunciada (indicado pelas setas pretas), que foi reduzido no grupo HFMel (setas abertas). B – Estimativa da densidade de volume da esteatose hepática (média ± DP). Significância estatística: **P<0,01; ***P<0,001.

Fonte: O Autor, 2022.

3.2.4 A suplementação de melatonina nas progenitoras melhora a expressão gênica de marcadores do metabolismo lipídico no fígado das proles adultas

A expressão de RNAm relacionados ao metabolismo lipídico no hepatócito estão mostrados na Figura 3. *Fas* é um gene relativo à uma enzima lipogênica regulado por *Srebf1*, e ambos se apresentaram respectivamente aumentados (+66%; +35%) na comparação do grupo HF vs. grupo C e reduzidos no grupo HFMel vs. grupo HF (-44%; -45%; Fig. 3A-B). Por outro lado, a expressão de RNAm do *Ppara* e *Cpt-1b*, envolvidos na beta-oxidação, se apresentaram respectivamente reduzidos (-57%; -97%) na comparação entre o grupo HF vs. grupo C e bastante aumentados no grupo HFMel vs. grupo HF (+232%; +4024%; Figura 3C-D).

Figura 3 - A suplementação de melatonina em progenitoras obesas reduziu a expressão gênica de marcadores da lipogênese e aumentou a de marcadores da beta-oxidação no fígado das proles adultas.



Legenda: C, grupo controle; *Cpt1*, Carnitine palmitoyltransferase-1b; *Fas*, Fatty acid synthase; HF, grupo high-fat; Mel, suplementados com melatonina; *Ppara*, Peroxisome proliferator-activated receptor; *Srebf1*, Sterol regulatory element binding transcription factor 1.

Nota: Expressão gênica de *Fas* (A), *Srebf1* (B), *Ppara* (C) e *Cpt1b* (D). Dados expressos em média ± DP. Significância estatística: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

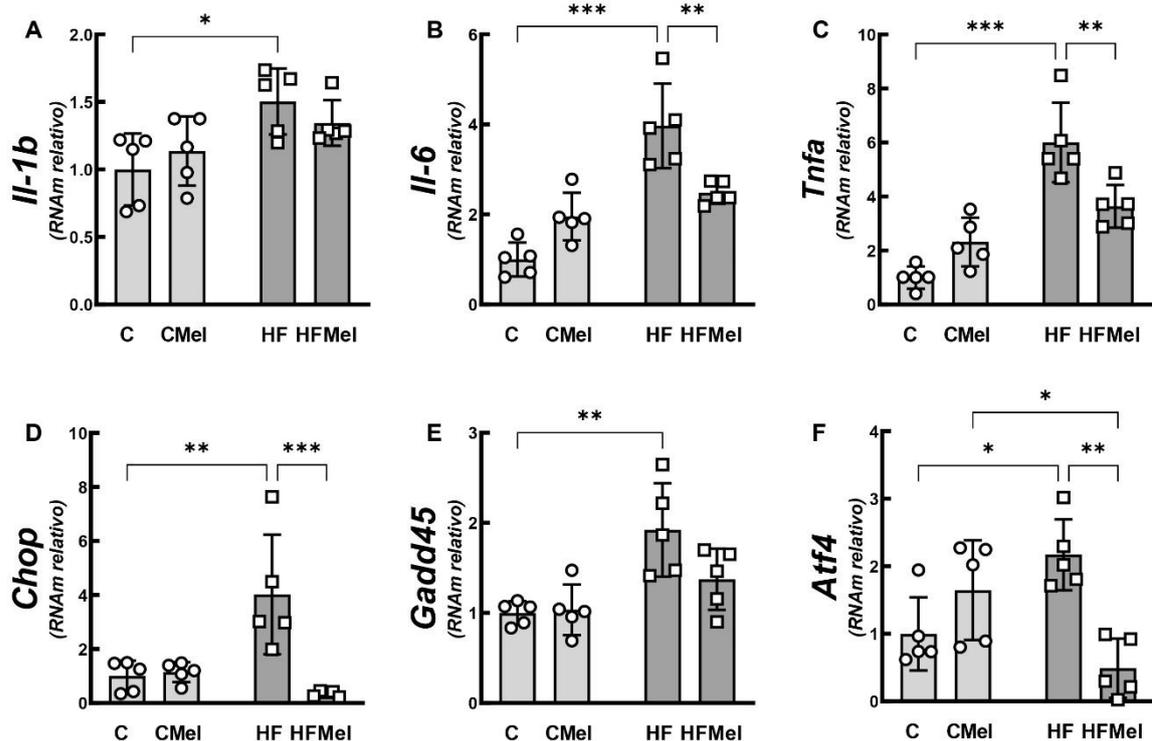
Fonte: O Autor, 2022.

3.2.5 A suplementação de melatonina nas progenitoras melhora a expressão gênica de marcadores pró-inflamatórios e do estresse do retículo endoplasmático no fígado das proles adultas

A expressão de RNAm de marcadores pró-inflamatórios, *Il-1b*, *Il-6* e *Tnfa*, se apresentaram aumentados no grupo HF vs. grupo C (+50%; +297%; +500%, respectivamente; Figura 4A-C). Por outro lado, a expressão de RNAm de *Il-6* e *Tnfa*, se apresentaram diminuídos no grupo HFMel (-37%; -39%, respectivamente) na comparação com o grupo HF.

Junto a isso, a expressão de RNAm relativas ao estresse do retículo endoplasmático, se apresentaram aumentadas no grupo HF vs. grupo C (*Chop*: +302%; *Gadd45*: +92%; *Atf4*: +117%; Figura 4D-F). Contrariamente, houve uma restauração da expressão de RNAm do *Chop* e *Atf4* no grupo HFMel vs. grupo HF (*Chop*: -91%; *Atf4*: -77%).

Figura 4 - A suplementação de melatonina em progenitoras obesas reduziu a expressão gênica de marcadores pró-inflamatórios e do estresse do retículo endoplasmático no fígado das proles adultas.



Legenda: *Atf4*, Activating transcription factor 4; C, grupo controle; *Chop*, CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein; *Gadd45*, growth arrest and DNA-damage-inducible protein; HF, grupo *high-fat*; Il, interleucina; Mel, suplementados com melatonina; *Tnfa*, tumor necrosis factor alpha;

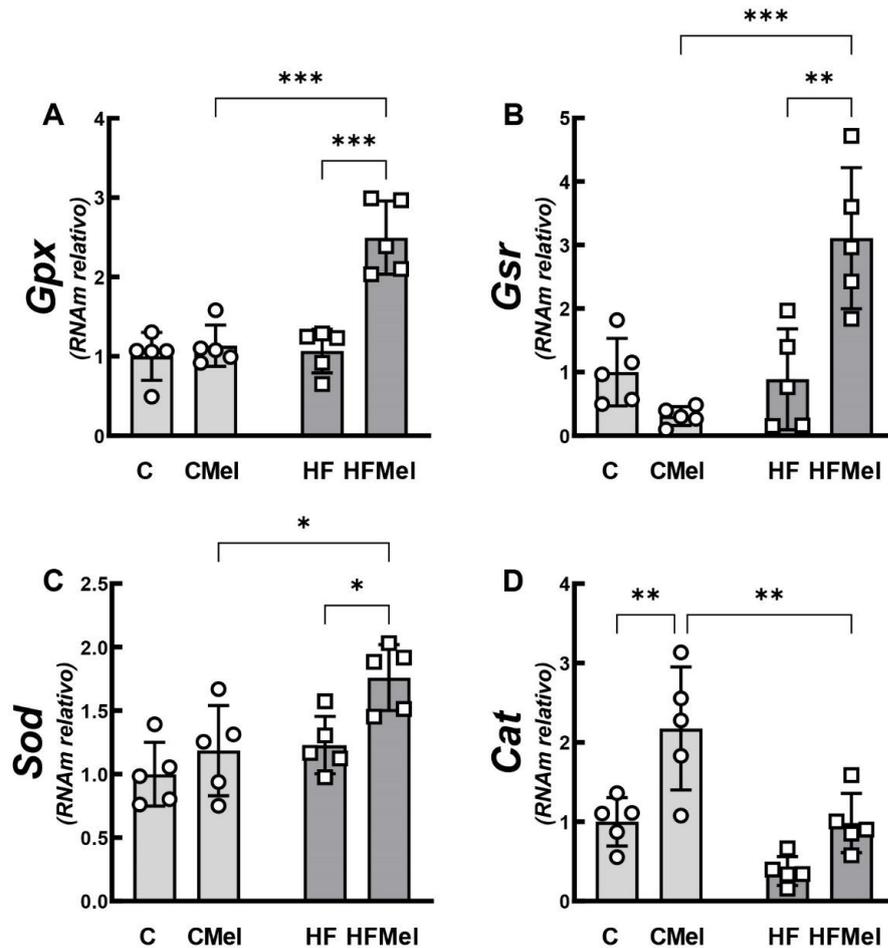
Nota: Expressão gênica de *Il-1b* (A), *Il-6* (B), *Tnfa* (C), *Chop* (D), *Gadd45* (E) e *Atf4* (F). Dados expressos em média \pm DP. Significância estatística: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Fonte: O Autor, 2022.

3.2.6 A suplementação de melatonina nas progenitoras atenua o estresse oxidativo no fígado das proles adultas

A expressão de RNAm das enzimas antioxidantes estava aumentada na comparação do grupo HFMel vs. grupo HF (*Sod*: +43%; *Gpx*: +134%; *Gsr*: +205%; Figuras 5A-C). Além disso, a expressão do *Cat* estava aumentada no grupo CMel vs. grupo C (Figura 5D).

Figura 5 - A suplementação de melatonina em progenitoras obesas aumentou a expressão gênica de enzimas antioxidantes no fígado das proles adultas.



Legenda: C, grupo controle; *Cat*, catalase; *Gpx*, glutathione peroxidase; *Gsr*, glutathione-disulfide reductase; HF, grupo high-fat; Mel, suplementados com melatonina; *Sod*, superoxide dismutase.

Nota: Expressão gênica de *Gpx* (A), *Gsr* (B), *Sod* (C) e *Cat* (D). Dados expressos em média ± DP.

Significância estatística: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

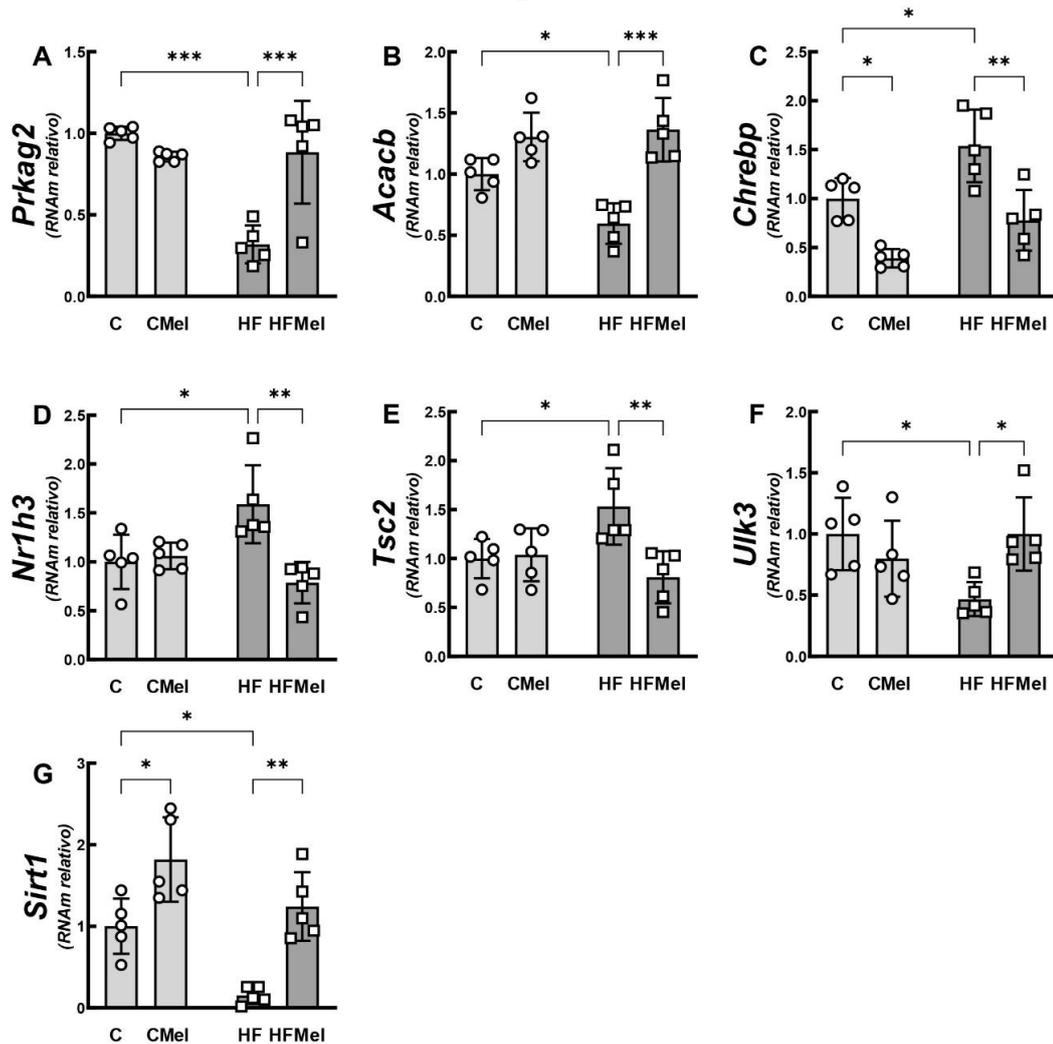
Fonte: O Autor, 2022.

3.2.7 A suplementação de melatonina nas progenitoras desempenha um papel regulador na via AMPK do fígado das proles adultas

A expressão de RNAm relativa à via da AMPK estava alterada na comparação entre os grupos HF vs. C: *Prkg2* (-70%, Figura 6A), *Acacb* (-40%, Figura 6B), *Chrebp* (+55%, Figura 6C), *Nr1h3* (+60, Figura 6D), *Tsc2* (+50%, Figura 6E), *Ulk3* (-50%, Figura 6F) e *Sirt1*

(-85%, Figura 6G). Entretanto, a suplementação materna de melatonina restaurou a expressão desses marcadores na comparação entre os grupos HFMel vs. HF: *Prkag2* (+180%), *Acacb* (+130%), *Chrebp* (-50%), *Nr1h3* (-50%), *Tsc2* (-50%), *Ulk3* (+120%) e *Sirt1* (+730%).

Figura 6 - A suplementação de melatonina em progenitoras obesas regula a expressão gênica de marcadores da via AMPK no fígado das proles adultas.



Legenda: *Acacb*, acetyl-coa carboxylase beta; C, grupo controle; *Chrebp*, carbohydrate-responsive element-binding protein; HF, grupo high-fat; Mel, suplementados com melatonina; *Nr1h3*, nuclear receptor subfamily 1 group H member; *Prkag2*, protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 2; *Sirt1*, sirtuin 1; *Tsc2*, tuberous sclerosis complex 2; *Ulk3*, unc-51-like kinase 3.

Nota: Expressão gênica de *Prkag2* (A), *Acacb* (B), *Chrebp* (C), *Nr1h3* (D), *Tsc2* (E), *Ulk3* (F) e *Sirt1* (G). Dados expressos em média \pm DP. Significância estatística: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

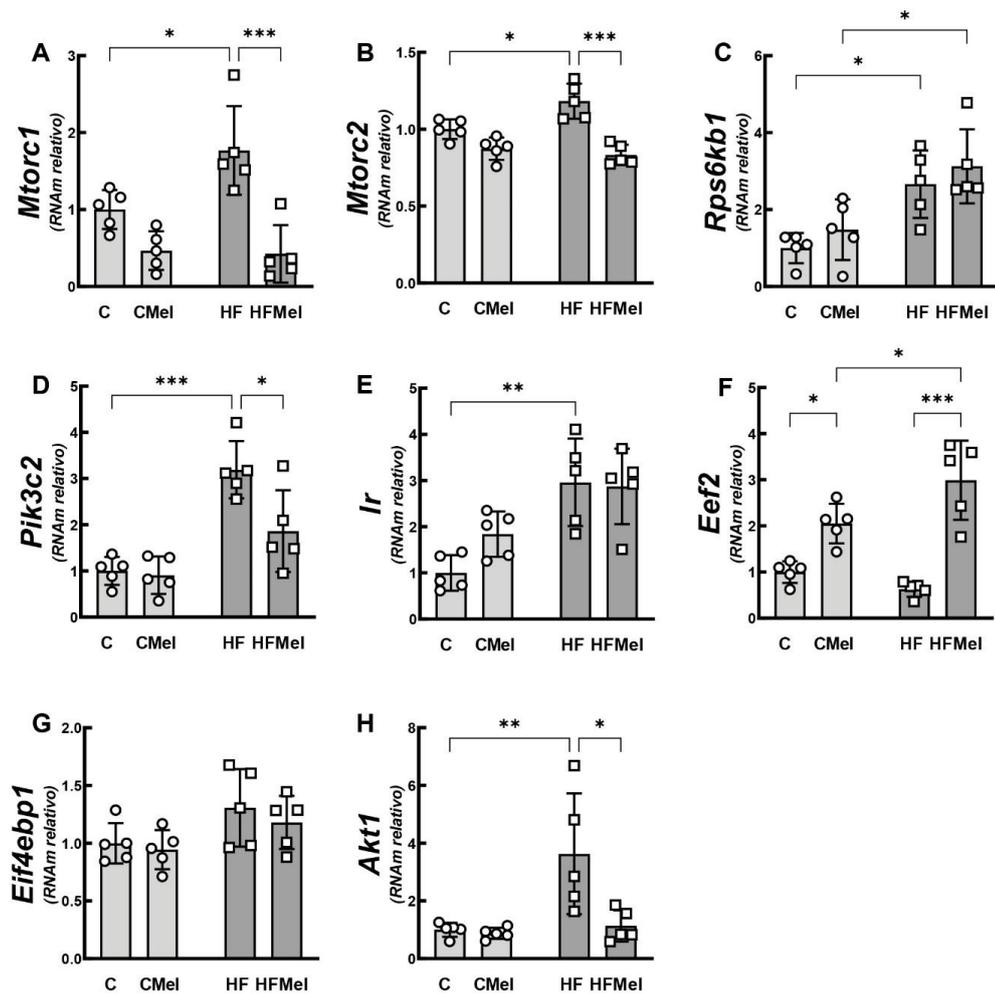
Fonte: O Autor, 2022.

3.2.8 A suplementação de melatonina nas progenitoras desempenha um papel regulador na via mTOR do fígado das proles adultas

A via mTOR desempenha funções antagônicas à AMPK, participando de processos anabólicos como a lipogênese. A expressão de RNAm da via mTOR aumentou no grupo HF vs. grupo C: *Mtorc1* (+77%, Figura 7A), *Mtorc2* (+18%, Figura 7B), *Rps6kb1* (+166%, Figura 7C), *Pik3c2a* (+219%, Figura 7D), *Ir* (+196%, Figura 7E) e *Akt* (+263%, Figura 7H). Por outro lado, a expressão gênica de *Eef2* (Figura 7F) estava aumentado nos grupos CMel (+105%) e HFMel (+375%) comparados aos seus respectivos grupos não tratados, C e HF. A expressão gênica do *Eif4ebp1* não apresentou diferença entre os grupos (Figura 7G).

A expressão gênica foi restaurada na comparação entre os grupos HFMel vs. HF: *Mtorc1* (-76%), *Mtorc2* (-30%), *Pik3c2a* (-42%) e *Akt* (-69%) (Figura 7A, 7B, 7D, 7H).

Figura 7 - A suplementação de melatonina em progenitoras regula a expressão gênica de marcadores da via mTOR no fígado das proles adultas



Legenda: *Akt1*, protein kinase B 1; C, grupo controle; *Eef2*, eukaryotic translation elongation factor 2; *Eif4ebp1*, eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1; HF, grupo high-fat; *Ir*, Insulin receptor; *Mtorc1*, mammalian target of rapamycin complex 1; *Mtorc2*, mammalian target of rapamycin complex 2; Mel, suplementados com melatonina; *Rps6kb1*, ribosomal protein s6 kinase B1; *Pik3c2a*, phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing alpha polypeptide.

Nota: Expressão gênica de *Mtorc1* (A), *Mtorc2* (B), *Rps6kb1* (C), *Pik3c2* (D), *Ir* (E), *Eef2* (F), *Eif4ebp1* (G) e *Akt1* (H). Dados expressos em média \pm DP. Significância estatística: *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

Fonte: O Autor, 2022.

4 DISCUSSÃO

Modelos experimentais estabeleceram a relação entre obesidade parental e alterações metabólicas de suas proles (49,50). Especificamente, progenitoras com obesidade induzida por dieta hiperlipídica podem apresentar resistência à insulina, intolerância à glicose, dislipidemia e inflamação de baixo grau, o que pode ser transmitido para as próximas gerações (51,52). Nesse contexto, intervenções em progenitoras durante os períodos críticos do desenvolvimento – concepção, gestação e lactação – podem apresentar-se como uma estratégia de proteção contra as alterações metabólicas e hepáticas na vida adulta de seus descendentes (53,54).

A obesidade materna afeta o metabolismo de machos e fêmeas de maneiras distintas, o que é conhecido por dimorfismo sexual (55). Os depósitos de tecido adiposo branco das fêmeas são predominantemente subcutâneos e produzem grandes quantidades de adiponectina, um hormônio sensibilizador da insulina. Contrariamente, os depósitos desse tecido nos machos são predominantemente viscerais e secretam citocinas pró-inflamatórias que são associadas com a DHGNA (56). Ao serem insultados pelo metabolismo deletério de suas progenitoras com obesidade, as proles de machos apresentaram alterações mais significativas e, por isso, os filhotes machos foram objeto do estudo deste trabalho.

A melatonina foi proposta como uma estratégia para prevenir DCNTs. No entanto, seu pico endógeno corresponde à fase de vigília em roedores noturnos e, contrariamente, à fase de sono em humanos diurnos. Além disso, a sensibilidade humana à insulina e a tolerância à glicose são mais altas no início da manhã e diminuem no início do sono, o que é o oposto do que acontece nos roedores noturnos (57). Apesar dessas diferenças, o modelo de roedor ainda é uma boa escolha para estudar experimentalmente o papel da melatonina em distúrbios metabólicos (29).

Os desfechos da suplementação materna de melatonina em proles adultas estão associados aos efeitos protetores presentes nos diferentes períodos críticos do desenvolvimento: 1) na concepção, por estar associada à maior qualidade da ovulação (58), contra o estresse oxidativo associado à resistência à insulina (59) e até na formação dos espermatozoides (60); 2) na gestação, por interagir com a placenta e a circulação materno-fetal (61); 3) na lactação, por interagir com as glândulas mamárias e fazer parte da composição do leite (38).

A melatonina tem sido investigada no tratamento de distúrbios metabólicos humanos com doses variando de 5 a 20 mg/dia em diferentes esquemas de duração (62). Neste estudo, a melatonina foi administrada nas progenitoras em uma dose de 10 mg/Kg/dia, indicada para garantir seus efeitos no período crítico de desenvolvimento em camundongos (29). A suplementação exógena de melatonina durante os períodos críticos do desenvolvimento pode beneficiar tanto a progenitora quanto o feto, principalmente por causa de seus efeitos antioxidantes e imunomoduladores (63). Além disso, o modelo utilizado reproduz o comprometimento do metabolismo da prole devido à obesidade da progenitora, causando, entre outros distúrbios, esteatose hepática na prole (25,49). É bem descrito na literatura que uma alta ingestão de gordura saturada pode levar, além da obesidade, à resistência à insulina, intolerância à glicose, dislipidemia e inflamação de baixo grau (64), que pode ser transmitida para as próximas gerações (51).

As progenitoras HF apresentaram aumento da ingestão energética e tornaram-se obesas. Consequentemente, suas proles HF apresentaram maior peso corporal do que as proles C. Além disso, a obesidade materna disponibiliza mais ácidos graxos e aumenta a expressão dos transportadores de glicose no tecido adiposo fetal, levando ao aumento da adiposidade e resistência à insulina na prole adulta (15). Esses fenômenos podem justificar como a hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e alto conteúdo de TAG e CT hepáticos foram observados nas proles HF. Por outro lado, a suplementação materna de melatonina atenuou o aumento da massa corporal da prole, através de um mecanismo ainda pouco claro.

O tecido adiposo visceral quando está acima de sua capacidade de armazenamento de lipídios, regula positivamente a lipólise, liberando ácidos graxos livres na veia porta e depositando-os nos hepatócitos (64). Além disso, o aumento das enzimas hepáticas e dos marcadores moleculares está relacionado à esteatose hepática com lesão tecidual (65,66). Portanto, a melatonina pode interagir com os hepatócitos, melhorando o metabolismo lipídico, uma vez que as enzimas lipogênicas e de beta-oxidação podem ser reguladas pela melatonina (67).

A suplementação materna de melatonina pode reduzir a esteatose hepática da prole, possivelmente devido à diminuição do conteúdo de TAG e melhora da função hepática (67,68). Além disso, a melatonina atenua a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo, preservando a função hepática (69). Consequentemente, as proles HFMel podem herdar uma oxidação do TAG mitocondrial mais eficiente (o colesterol total não está diretamente relacionado ao desempenho mitocondrial).

A melatonina parece interferir nas diferentes etapas do metabolismo do colesterol, reduzindo o colesterol extra e intracelular (70). Da mesma forma, roedores com hipercolesterolemia induzida por dieta e tratados com melatonina melhoram seu perfil de colesterol plasmático (71). Neste estudo, as proles HFMel apresentaram baixo TAG e CT plasmáticos. É importante ressaltar que não houve administração direta de melatonina à prole.

Nesse estudo, a melatonina regulou negativamente a expressão de RNAm de *Srebf1* e *Fas*, fatores de transcrição que regulam a expressão de enzimas lipogênicas, e regulou positivamente a expressão de RNAm de oxidação de ácidos graxos, o *Ppara*, e um catalisador da oxidação mitocondrial, *Cpt-1b* (24). Essas alterações sugerem um efeito anti-esteatótico induzido pela melatonina durante os períodos críticos de desenvolvimento, que é expresso tanto no nível tecidual quanto no sistêmico por atenuar a esteatose macro e microvesicular, diminuindo as transaminases séricas e a massa corporal.

O estresse oxidativo induzido por dieta hiperlipídica demanda muito do sistema antioxidante endógeno e da resposta imunológica, o que pode ser recuperado pelas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias da melatonina (72). Notavelmente, a melatonina é um poderoso antioxidante polivalente, por atuar como um eliminador de radicais livres e por estimular as enzimas antioxidantes endógenas (73).

Neste trabalho, a maior parte das enzimas antioxidantes, *Gpx*, *Gsr* e *Sod*, foram reguladas positivamente pela melatonina no fígado da prole HFMel. Particularmente, o dano oxidativo às biomoléculas associado à resistência à insulina relacionada à obesidade pode levar ao estresse do retículo endoplasmático nos hepatócitos (74), o que é demonstrado neste estudo pela regulação positiva de *Chop*, *Gadd45* e *Atf4* nas proles HF. Por consequência da administração de melatonina, a resposta às proteínas mal-dobradas pode ter sido melhorada, para então reduzir o estresse do retículo endoplasmático pela regulação negativa de *Chop* e *Atf4*. Além disso, a melatonina reduziu muitos dos marcadores pró-inflamatórios analisados e, combinado com a diminuição do estresse oxidativo e do estresse do retículo endoplasmático, houve uma melhora geral com a diminuição da esteatose hepática na prole HFMel.

Existe uma ligação estreita, embora não direta, entre a expressão do RNAm e a proteômica. Isso ocorre porque o RNAm reporta o genoma e reflete processos relacionados à atividade de fatores de transcrição, regulação epigenética e eventos de processamento do RNA (75). No entanto, a expressão de RNAm não reflete a ativação de proteínas de vias fosforiláveis, como a AMPK e mTOR (76). Trata-se, portanto, de uma limitação deste estudo a ausência das análises das proteínas pelo *Western Blotting*. Ainda que esta técnica seja um

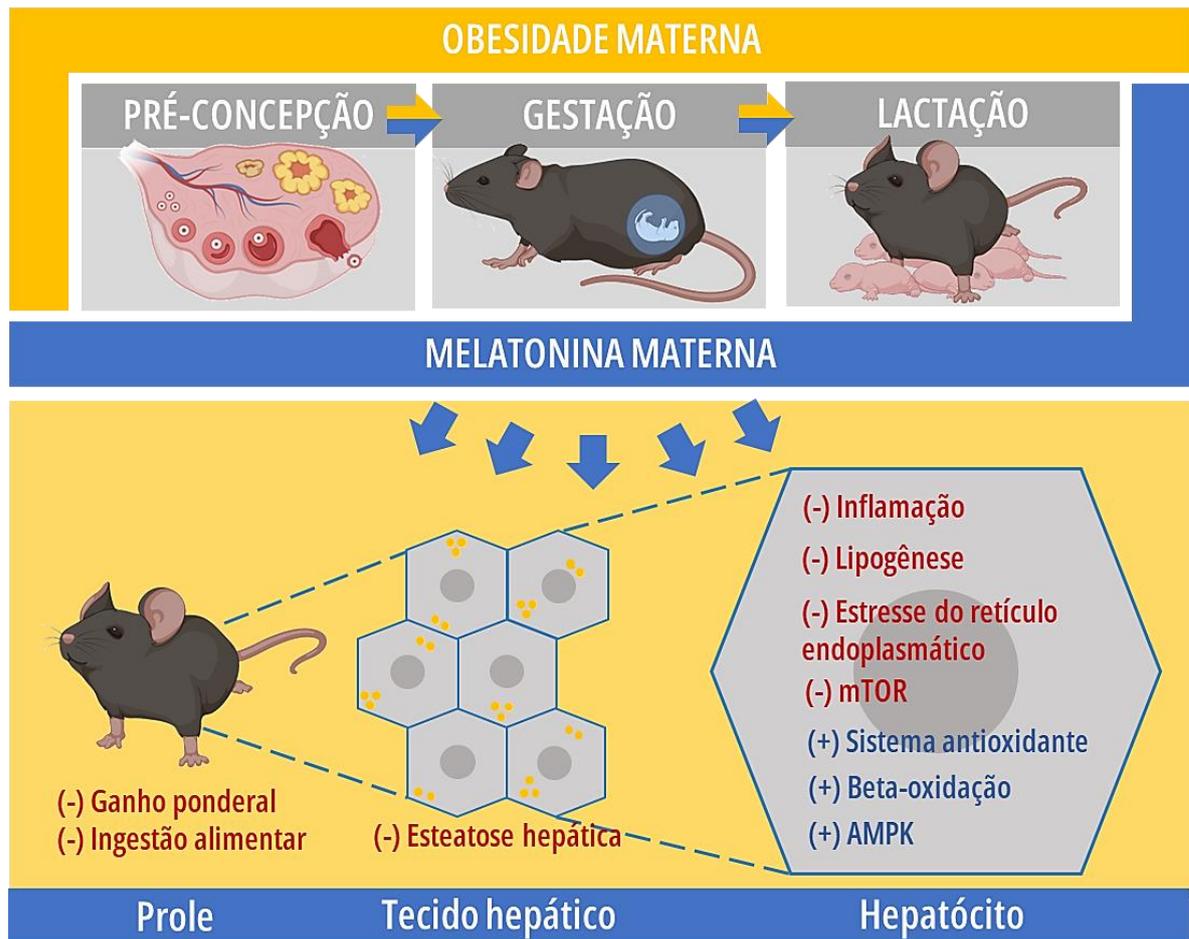
método de escolha para análise de proteínas, há limitações que muitas vezes a torna não reprodutível (77).

A desregulação da expressão do gênica da via mTOR pode estar associada à progressão da DHGNA por promover a lipogênese e inibir a autofagia e a lipofagia (78). Além disso, fatores de crescimento como a insulina estimulam o *Pik3c2* pelo *Ir*, que ativa o *Akt1* levando à inibição do *Tsc2* e ativação do mTORC1. Além disso, o mTORC1 regula negativamente a atividade do mTORC2 (79). A via da mTORC1 estimula a lipogênese pelo tráfego, processamento e transcrição de *Srebf1* e inibe o *Ulk3*, responsável por iniciar a autofagia, o que induz o estresse do retículo endoplasmático (80,81). Ainda, nesse estudo, a via da mTOR foi regulada positivamente na prole HF e atenuada na prole HFMel. No entanto, a AMPK – sua subunidade $\gamma 2$ é codificada pelo gene *Prkag2* – inibe mTOR por vários mecanismos, que incluem fosforilação e ativação do *Tsc2* (82).

Quando as concentrações de ATP intracelular reduzem, é essencial que a célula minimize o consumo de energia para evitar exaurir os recursos remanescentes, para isso as células eucariontes desenvolveram um sistema modulador baseado na disponibilidade de energia, onde o regulador chave é a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (83). Marcadores regulados por AMPK como a *Acacb*, *Sirt1* e o *Nr1h3* estão sendo investigados como alvos terapêuticos da NAFLD por estarem envolvidos na homeostase de lipídeos (84,85). Similarmente, o ChREBP, um regulador do metabolismo de glicose e a *Eef2*, um regulador negativo da elongação de proteínas, são regulados por AMPK (86,87).

De modo geral, a via da mTOR desempenha processos metabólicos a partir da disponibilidade de nutrientes, ou seja, no anabolismo, enquanto a AMPK predomina em processos de escassez, no catabolismo. Portanto, a desregulação desses processos pela dieta (comparação HF vs. C) foi recuperada pela melatonina (comparação HFMel vs. HF; Figura 8). Assim, uma melhora geral na expressão gênica da via AMPK/mTOR no fígado foi observada na prole adulta HFMel.

Figura 8 – Resumo gráfico



Nota: A melatonina interage com o ambiente obesogênico durante os períodos críticos do desenvolvimento (pré-concepção, gestação e lactação) diminuindo o ganho ponderal e a ingestão alimentar materna e atenua a progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) dos filhotes adultos, em níveis sistêmicos, teciduais e celulares.

Fonte: O Autor, 2022.

CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que suplementação de melatonina materna, durante a gestação e lactação, exerceu efeitos protetores no metabolismo hepático e na patogênese da esteatose hepática da prole na vida adulta. Nos hepatócitos, marcadores da lipogênese, beta-oxidação, inflamação, estresse oxidativo, estresse do RE e AMPK/mTOR foram afetados positivamente, o que retardou a progressão da DHGNA na prole. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos protetores exercidos pela melatonina sobre as origens desenvolvimentistas da DHGNA.

REFERÊNCIAS

1. Barker DJ. The Wellcome Foundation Lecture, 1994. The fetal origins of adult disease. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 23 de outubro de 1995;262(1363):37–43.
2. Barker D. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *The Lancet.* maio de 1986;327(8489):1077–81.
3. Barker DJP. Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutrition.* setembro de 1997;13(9):807–13.
4. Stanner SA, Bulmer K, Andres C, Lantseva OE, Borodina V, Poteen VV, et al. Does malnutrition in utero determine diabetes and coronary heart disease in adulthood? Results from the Leningrad siege study, a cross sectional study. *BMJ.* 22 de novembro de 1997;315(7119):1342–8.
5. 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.* novembro de 1999;70(5):811–6.
6. Hughes AE, Hattersley AT, Flanagan SE, Freathy RM. Two decades since the fetal insulin hypothesis: what have we learned from genetics? *Diabetologia.* abril de 2021;64(4):717–26.
7. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ.* 26 de outubro de 1991;303(6809):1019–22.
8. Hales CN, Barker DJP. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull.* 1º de novembro de 2001;60(1):5–20.
9. Hattersley AT, Tooke JE. The fetal insulin hypothesis: an alternative explanation of the association of low birthweight with diabetes and vascular disease. *The Lancet.* maio de 1999;353(9166):1789–92.
10. Gluckman PD, Hanson MA. Living with the Past: Evolution, Development, and Patterns of Disease. *Science.* 17 de setembro de 2004;305(5691):1733–6.
11. Parrettini S, Caroli A, Torlone E. Nutrition and Metabolic Adaptations in Physiological and Complicated Pregnancy: Focus on Obesity and Gestational Diabetes. *Front Endocrinol.* 30 de novembro de 2020;11:611929.
12. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, DeFuria J, Jick Z, et al. Adipocyte Death, Adipose Tissue Remodeling, and Obesity Complications. *Diabetes.* 1º de dezembro de 2007;56(12):2910–8.
13. Howell KR, Powell TL. Effects of maternal obesity on placental function and fetal development. *Reproduction.* março de 2017;153(3):R97–108.

14. Carrasco-Wong I, Moller A, Giachini FR, Lima VV, Toledo F, Stojanova J, et al. Placental structure in gestational diabetes mellitus. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* fevereiro de 2020;1866(2):165535.
15. Long NM, Rule DC, Zhu MJ, Nathanielsz PW, Ford SP. Maternal obesity upregulates fatty acid and glucose transporters and increases expression of enzymes mediating fatty acid biosynthesis in fetal adipose tissue depots¹. *J Anim Sci.* 1º de julho de 2012;90(7):2201–10.
16. Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health perspective. *J Hepatol.* março de 2019;70(3):531–44.
17. 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.* 1º de abril de 2010;151(4):1451–61.
18. Oben JA, Patel T, Muralidarane A, Samuelsson AM, Matthews P, Pombo J, et al. Maternal obesity programmes offspring development of non-alcoholic fatty pancreas disease. *Biochem Biophys Res Commun.* março de 2010;394(1):24–8.
19. Gregorio BM, Souza-Mello V, Carvalho JJ, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring. *Am J Obstet Gynecol.* novembro de 2010;203(5):495.e1-495.e8.
20. 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.* 1º de julho de 2014;307(1):R26–34.
21. Bettermann K, Hohensee T, Haybaeck J. Steatosis and Steatohepatitis: Complex Disorders. *Int J Mol Sci.* 3 de junho de 2014;15(6):9924–44.
22. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol.* julho de 2020;73(1):202–9.
23. Tilg H, Adolph TE, Moschen AR. Multiple Parallel Hits Hypothesis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Revisited After a Decade. *Hepatology.* fevereiro de 2021;73(2):833–42.
24. Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci.* setembro de 2018;75(18):3313–27.
25. Bruce KD, Cagampang FR, Argenton M, Zhang J, Ethirajan PL, Burdge GC, et al. Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology.* dezembro de 2009;50(6):1796–808.
26. Koek GH, Liedorp PR, Bast A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta.* julho de 2011;412(15–16):1297–305.

27. Lebeau-pin C, Vallée D, Hazari Y, Hetz C, Chevet E, Bailly-Maitre B. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* outubro de 2018;69(4):927–47.
28. Cho CS, Kowalsky AH, Lee JH. Pathological Consequences of Hepatic mTORC1 Dysregulation. *Genes.* 5 de agosto de 2020;11(8):896.
29. Tain YL, Huang LT, Hsu CN. Developmental Programming of Adult Disease: Reprogramming by Melatonin? *Int J Mol Sci.* 16 de fevereiro de 2017;18(2):426.
30. Voiculescu SE, Zygouropoulos N, Zahi CD, Zagrean AM. Role of melatonin in embryo fetal development. *J Med Life.* 2014;7(4):488–92.
31. Tain YL, Huang LT, Chan J. Transcriptional Regulation of Programmed Hypertension by Melatonin: An Epigenetic Perspective. *Int J Mol Sci.* 14 de outubro de 2014;15(10):18484–95.
32. Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res.* outubro de 2016;61(3):253–78.
33. Vives-Bauza C, Starkov A, Garcia-Arumi E. Measurements of the Antioxidant Enzyme Activities of Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase. Em: *Methods in Cell Biology* [Internet]. Elsevier; 2007 [citado 24 de junho de 2023]. p. 379–93. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X06800191>
34. Ndiaye MA, Nihal M, Wood GS, Ahmad N. Skin, reactive oxygen species, and circadian clocks. *Antioxid Redox Signal.* 20 de junho de 2014;20(18):2982–96.
35. Mansoori A, Salimi Z, Hosseini SA, Hormoznejad R, Jafarirad S, Bahrami M, et al. The effect of melatonin supplementation on liver indices in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Complement Ther Med.* agosto de 2020;52:102398.
36. Wang D, Wei Y, Wang T, Wan X, Yang CS, Reiter RJ, et al. Melatonin attenuates (-)-epigallocatechin-3-gallate-triggered hepatotoxicity without compromising its downregulation of hepatic gluconeogenic and lipogenic genes in mice. *J Pineal Res.* novembro de 2015;59(4):497–507.
37. Fernández A, Ordóñez R, Reiter RJ, González-Gallego J, Mauriz JL. Melatonin and endoplasmic reticulum stress: relation to autophagy and apoptosis. *J Pineal Res.* outubro de 2015;59(3):292–307.
38. Wang Y, Guo W, Xu H, Tang K, Zan L, Yang W. Melatonin suppresses milk fat synthesis by inhibiting the mTOR signaling pathway via the MT 1 receptor in bovine mammary epithelial cells. *J Pineal Res* [Internet]. outubro de 2019 [citado 24 de junho de 2023];67(3). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jpi.12593>
39. Katsnelson A. Arriving again: 10 years on, ARRIVE 2.0 offers a simplified set of reporting guidelines. *Lab Anim.* outubro de 2020;49(10):267–267.

40. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition [Internet]. Washington, D.C.: National Academies Press; 2011 [citado 24 de junho de 2023]. Disponível em: <http://www.nap.edu/catalog/12910>
41. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. 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.* novembro de 1993;123(11):1939–51.
42. Baydas G, Nedzvetsky VS, Nerush PA, Kirichenko SV, Demchenko HM, Reiter RJ. A novel role for melatonin: regulation of the expression of cell adhesion molecules in the rat hippocampus and cortex. *Neurosci Lett.* junho de 2002;326(2):109–12.
43. Tain YL, Leu S, Wu KLH, Lee WC, Chan JYH. Melatonin prevents maternal fructose intake-induced programmed hypertension in the offspring: roles of nitric oxide and arachidonic acid metabolites. *J Pineal Res.* agosto de 2014;57(1):80–9.
44. Baydas G, Koz ST, Tuzcu M, Nedzvetsky VS. Melatonin prevents gestational hyperhomocysteinemia-associated alterations in neurobehavioral developments in rats. *J Pineal Res.* março de 2008;44(2):181–8.
45. Hotchkiss AK, Vandenberg JG. The anogenital distance index of mice (*Mus musculus domesticus*): an analysis. *Contemp Top Lab Anim Sci.* julho de 2005;44(4):46–8.
46. Rao X, Lai D, Huang X. A New Method for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Data Analysis. *J Comput Biol.* setembro de 2013;20(9):703–11.
47. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods.* dezembro de 2001;25(4):402–8.
48. Mandarim-de-Lacerda CA, Del-Sol M. Tips for Studies with Quantitative Morphology (Morphometry and Stereology). *Int J Morphol.* dezembro de 2017;35(4):1482–94.
49. Ornellas F, Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Programming of Obesity and Comorbidities in the Progeny: Lessons from a Model of Diet-Induced Obese Parents. Luque RM, organizador. *PLOS ONE.* 16 de abril de 2015;10(4):e0124737.
50. Portha B, Grandjean V, Movassat J. Mother or Father: Who Is in the Front Line? Mechanisms Underlying the Non-Genomic Transmission of Obesity/Diabetes via the Maternal or the Paternal Line. *Nutrients.* 22 de janeiro de 2019;11(2):233.
51. Li J, Wu H, Liu Y, Yang L. High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR. *Exp Anim.* 2020;69(3):326–35.
52. Aguila MB, Ornellas F, Mandarim-de-Lacerda CA. Nutritional Research and Fetal Programming: Parental Nutrition Influences the Structure and Function of the Organs. *Int J Morphol.* fevereiro de 2021;39(1):327–34.
53. Tarevnic R, Ornellas F, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Beneficial effects of maternal swimming during pregnancy on offspring metabolism when the father is obese. *J Dev Orig Health Dis.* agosto de 2019;10(4):502–6.

54. Tarevnic R, Ornellas F, Mandarin-de-Lacerda CA, Aguila MB. Maternal swimming mitigates liver damage caused by paternal obesity. *Nutrition*. junho de 2021;86:111168.
55. Ornellas F, Mello VS, Mandarin-de-Lacerda CA, Aguila MB. Sexual dimorphism in fat distribution and metabolic profile in mice offspring from diet-induced obese mothers. *Life Sci*. outubro de 2013;93(12–14):454–63.
56. Lefebvre P, Staels B. Hepatic sexual dimorphism — implications for non-alcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Endocrinol*. novembro de 2021;17(11):662–70.
57. Ben-Dyke R. Diurnal variation of oral glucose tolerance in volunteers and laboratory animals. *Diabetologia*. junho de 1971;7(3):156–9.
58. Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res*. abril de 2008;44(3):280–7.
59. Ou XH, Li S, Wang ZB, Li M, Quan S, Xing F, et al. Maternal insulin resistance causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction in mouse oocytes. *Hum Reprod*. 1º de julho de 2012;27(7):2130–45.
60. Xu D, Liu L, Zhao Y, Yang L, Cheng J, Hua R, et al. Melatonin protects mouse testes from palmitic acid-induced lipotoxicity by attenuating oxidative stress and DNA damage in a SIRT1-dependent manner. *J Pineal Res* [Internet]. novembro de 2020 [citado 24 de junho de 2023];69(4). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jpi.12690>
61. De Almeida Chuffa LG, Lupi LA, Cuciello MS, Silveira HS, Reiter RJ, Seiva FRF. Melatonin Promotes Uterine and Placental Health: Potential Molecular Mechanisms. *Int J Mol Sci*. 31 de dezembro de 2019;21(1):300.
62. Karamitri A, Jockers R. Melatonin in type 2 diabetes mellitus and obesity. *Nat Rev Endocrinol*. fevereiro de 2019;15(2):105–25.
63. Chitimus DM, Popescu MR, Voiculescu SE, Panaitescu AM, Pavel B, Zagrean L, et al. Melatonin's Impact on Antioxidative and Anti-Inflammatory Reprogramming in Homeostasis and Disease. *Biomolecules*. 20 de agosto de 2020;10(9):1211.
64. Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr*. 2010;46(3):212–23.
65. Hall A, Covelli C, Manuguerra R, Luong TV, Buzzetti E, Tsochatzis E, et al. Transaminase abnormalities and adaptations of the liver lobule manifest at specific cut-offs of steatosis. *Sci Rep*. 20 de janeiro de 2017;7(1):40977.
66. Brunt EM, Wong VWS, Nobili V, Day CP, Sookoian S, Maher JJ, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Primer*. 17 de dezembro de 2015;1(1):15080.
67. Ou TH, Tung YT, Yang TH, Chien YW. Melatonin Improves Fatty Liver Syndrome by Inhibiting the Lipogenesis Pathway in Hamsters with High-Fat Diet-Induced Hyperlipidemia. *Nutrients*. 30 de março de 2019;11(4):748.

68. Sun H, Wang X, Chen J, Song K, Gusdon AM, Li L, et al. Melatonin improves non-alcoholic fatty liver disease via MAPK-JNK/P38 signaling in high-fat-diet-induced obese mice. *Lipids Health Dis.* dezembro de 2016;15(1):202.
69. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Protective role of melatonin in mitochondrial dysfunction and related disorders. *Arch Toxicol.* junho de 2015;89(6):923–39.
70. Karolczak K, Watala C. The Mystery behind the Pineal Gland: Melatonin Affects the Metabolism of Cholesterol. *Oxid Med Cell Longev.* 10 de julho de 2019;2019:1–8.
71. Hussain SAR. Effect of melatonin on cholesterol absorption in rats. *J Pineal Res.* abril de 2007;42(3):267–71.
72. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res.* janeiro de 2004;36(1):1–9.
73. Galano A, Reiter RJ. Melatonin and its metabolites vs oxidative stress: From individual actions to collective protection. *J Pineal Res.* agosto de 2018;65(1):e12514.
74. Zhao M, Zang B, Cheng M, Ma Y, Yang Y, Yang N. Differential Responses of Hepatic Endoplasmic Reticulum Stress and Inflammation in Diet-Induced Obese Rats with High-Fat Diet Rich in Lard Oil or Soybean Oil. Miele C, organizador. *PLoS ONE.* 6 de novembro de 2013;8(11):e78620.
75. Buccitelli C, Selbach M. mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nat Rev Genet.* outubro de 2020;21(10):630–44.
76. Kaelin WG. Proline hydroxylation and gene expression. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:115–28.
77. Gorr TA, Vogel J. Western blotting revisited: Critical perusal of underappreciated technical issues. *PROTEOMICS - Clin Appl.* abril de 2015;9(3–4):396–405.
78. Gao Y, Zhang W, Zeng LQ, Bai H, Li J, Zhou J, et al. Exercise and dietary intervention ameliorate high-fat diet-induced NAFLD and liver aging by inducing lipophagy. *Redox Biol.* setembro de 2020;36:101635.
79. Han J, Wang Y. mTORC1 signaling in hepatic lipid metabolism. *Protein Cell.* fevereiro de 2018;9(2):145–51.
80. Reis-Barbosa PH, Marcondes-de-Castro IA, Marinho TDS, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. The mTORC1/AMPK pathway plays a role in the beneficial effects of semaglutide (GLP-1 receptor agonist) on the liver of obese mice. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* junho de 2022;46(6):101922.
81. Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest.* janeiro de 2015;125(1):25–32.
82. Inoki K, Kim J, Guan KL. AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2012;52:381–400.

83. Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* fevereiro de 2018;19(2):121–35.
84. Fullerton MD, Galic S, Marcinko K, Sikkema S, Pulinilkunnil T, Chen ZP, et al. Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nat Med.* dezembro de 2013;19(12):1649–54.
85. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature.* abril de 2009;458(7241):1056–60.
86. Kawaguchi T, Osatomi K, Yamashita H, Kabashima T, Uyeda K. Mechanism for Fatty Acid “Sparing” Effect on Glucose-induced Transcription. *J Biol Chem.* fevereiro de 2002;277(6):3829–35.
87. Leprivier G, Remke M, Rotblat B, Dubuc A, Mateo ARF, Kool M, et al. The eEF2 Kinase Confers Resistance to Nutrient Deprivation by Blocking Translation Elongation. *Cell.* maio de 2013;153(5):1064–79.

ANEXO A – Aprovação pelo comitê de ética

Universidade do Estado do Rio de Janeiro
 Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
 Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "**Programação fetal, obesidade e melatonina**", registrado com o nº 003/2021, sob a responsabilidade de **Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) / IBRAG / UERJ, em reunião de 02/02/2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/02/2025
Espécie / linhagem / raça	Camundongo C57BL/6
Nº de animais	320
Peso / Idade	20 gramas / 3 meses
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 02 de fevereiro de 2021.

Dr. Alex C. Manhães
 Professor Associado
 Matr. 33303-9
 Coordenador
 CEUA/IBRAG/UERJ

Dra. Patricia C. Lisboa
 Professora Associada
 Matr. 34765-8
 Vice-Coordenadora
 CEUA/IBRAG/UERJ



Adult mice offspring of obese mothers supplemented with melatonin show lessened liver steatosis, inflammation, oxidative stress, and endoplasmic reticulum stress

Matheus Ajackson, Brenda A. Nagagata, Ilitch A. Marcondes-de-Castro, Carlos A. Mandarin-de-Lacerda*, Marcia Barbosa Aguilã

Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Disease, Biomedical Center, Institute of Biology, The University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Maternal obesity
Fetal programming
Inflammation
Liver steatosis
Epigenetics

ABSTRACT

Aims: To investigate, in the liver of adult offspring, the possible effects of melatonin supplementation in the obese mother during pregnancy and lactation.

Main methods: C57BL/6 females were fed with a control (C) or a high-fat (HF) diet and supplemented with melatonin (Mel) during the pregnancy and lactation, forming the groups: C, CMel, HF, and HFMel. After weaning until three months old, the offspring only received the C diet.

Key findings: The HF mothers and their offspring showed higher body weight (BW) than the C mothers and offspring. However, at 3-mo-old, BW was reduced in HFMel vs. HF offspring. Also, plasmatic and liver lipid markers increased in HF vs. C offspring but were reduced in HFMel vs. HF offspring. Liver lipid content was lessened in HFMel vs. HF offspring by 50 %. Also, lipid metabolism, pro-inflammatory and endoplasmic reticulum (ER) stress genes were higher expressed in HF vs. C offspring but reduced in HFMel vs. HF offspring. Contrarily, beta-oxidation and antioxidant enzyme genes were less expressed in HF vs. C offspring but improved in HFMel vs. HF offspring. Finally, AMPK/mTOR pathway genes, initially dysregulated in the HF, were restored in the HFMel offspring.

Significance: The obese mother leads to liver alterations in the offspring. Current findings demonstrated the maternal melatonin supplementation during pregnancy and lactation in adult offspring's liver. Consequently, the effects were seen in mitigating the liver's AMPK/mTOR pathway genes, lipogenesis, beta-oxidation, inflammation, oxidative stress, and ER stress, preventing liver disease progression in the offspring.

1. Introduction

A significant challenge in people's health is the growing prevalence of obesity and its comorbidities, which limits the quality of life and has a high cost for the health system. In addition, the obese mother changes

her offspring's phenotype, with changes that persist into adulthood [1–3]. Therefore, we must fight with all possible strategies against obesity [4,5].

Maternal obesity strongly predicts offspring obesity in humans [6] and mice [1]. Thus, early life corresponds to a critical developmental

Abbreviations: Acac, Acetyl-Coa Carboxylase Alpha; Akt1, Protein Kinase B; ALT, Alanine transaminase; AMPK, 5' AMP-activated protein kinase; AST, Aspartate transaminase; Atf4, Activating Transcription Factor 4; BW, Body weight; Cat, Catalase; Chop, C/EBP Homologous Protein; Chrebp, Carbohydrate-responsive Element-binding Protein; Cpt1b, Carnitine Palmitoyltransferase-1b; Eef2, Eukaryotic Translation Elongation Factor 2; El, Energy intake; Eif4ebp1, Eukaryotic Translation Initiation Factor 4e Binding Protein 1; ER, Endoplasmic reticulum; Fas, Fatty Acid Synthase; Fi, Food intake; Gadd45, Growth Arrest and DNA-damage-inducible Protein; Gpx, Glutathione peroxidase; Gr, Glutathione reductase; Il, Interleukin; Ir, Insulin receptor; LW, Liver weight; Mtorc, Mechanistic Target of Rapamycin Complex; NAFLD, Nonalcoholic fatty liver disease; Nr1h3, Nuclear Receptor Subfamily 1 Group H Member 3; Pik3c2a, Phosphoinositide 3-Kinase; Ppara, Peroxisome Proliferator-activated Receptor; Prkag2, 5' AMP-activated Protein Kinase Subunit Gamma-2; Rps6kb1, Ribosomal Protein S6 Kinase Polypeptide 1; Sirt1, Sirtuin 1; Sod, Superoxide dismutase; Srebf1, Sterol-regulatory Element Binding Protein-1; TAG, Triacylglycerol; Tbp, TATA-box Binding Protein; TC, Total cholesterol; Tnfa, Tumor Necrosis Factor Alpha; Tsc2, Tuberous Sclerosis Complex 2; Ulk3, Unc-51-like kinase 3

* Corresponding author at: Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular, Centro Biomédico, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av 28 de Setembro 87 fds, 20551-030 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail addresses: mandarim@uerj.br (C.A. Mandarin-de-Lacerda), mbaguila@uerj.br (M.B. Aguilã).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121253>

Received 15 October 2022; Received in revised form 23 November 2022; Accepted 26 November 2022
0024-3205/© 20XX

Note: Low-resolution images were used to create this PDF. The original images will be used in the final composition.