

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GRAZIELE GALDINO DE SOUSA

**DIETA HIPERLIPÍDICA MATERNA DESREGULA O
METABOLISMO HEPÁTICO DA PROLE ADULTA F2**

OURO PRETO
MINAS GERAIS – BRASIL

2019

GRAZIELE GALDINO DE SOUSA

**DIETA HIPERLIPÍDICA MATERNA DESREGULA O
METABOLISMO HEPÁTICO DA PROLE ADULTA F2**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas na área de concentração Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Carvalho Alzamora

Coorientadora: Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota

OURO PRETO
MINAS GERAIS – BRASIL

2019

S725d

Sousa, Grazielle Galdino de.

Dieta hiperlipídica materna desregula o metabolismo hepático da prole adulta F2 [manuscrito] / Grazielle Galdino de Sousa. - 2019.

107f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréia Carvalho Alzamora.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Guerra de Sá Cota.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Dieta hiperlipídica. 2. Nutrição materna. 3. Ratos endogâmicos Fischer. I. Alzamora, Andréia Carvalho. II. Sá Cota, Renata Guerra de. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 612.015.3



ATA DE DEFESA DE DOUTORADO

Aos 31 dias do mês de maio do ano de 2019, às 09:00 horas, nas dependências do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (Iceb), foi instalada a sessão pública para a defesa de tese da doutoranda **Graziele Galdino de Sousa**, sendo a banca examinadora composta pela Profa. Dra. Andreia Carvalho Alzamora (Presidente - UFOP), pelo Prof. Dr. Elio Hideo Baba (Membro - Externo), pelo Prof. Dr. Marcelo Eustaquio Silva (Membro - UFOP), pela Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira (Membro - UFOP), pelo Prof. Dr. William Tadeu Lara Festuccia (Membro - Externo) e pela Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota (Co-Orientadora - UFOP). Dando início aos trabalhos, a presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de tese, concedeu à doutoranda 30 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Dieta Hiperlipídica Materna Desregula o Metabolismo Hepático da Prole Adulta F2", na área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica. Terminada a exposição, a presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo máximo de 45 minutos para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da tese. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, a presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a doutoranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da tese deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 6 (seis) meses à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela doutoranda. Ouro Preto, 31 de maio de 2019.

Profa. Dra. Andreia Carvalho Alzamora

Presidente

Profa. Dra. Renata Guerra de Sá
Cota

Prof. Dr. Elio Hideo Baba

Prof. Dr. Marcelo Eustaquio Silva

Profa. Dra. Paula Melo de Abreu
Vieira

Prof. Dr. William Tadeu Lara
Festuccia

Doutoranda

Trabalho desenvolvido no **Laboratório de Hipertensão** e no **Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular** da Universidade Federal de Ouro Preto com auxílio financeiro da CAPES, REDE TOXIFAR, INCT, FAPEMIG, CNPQ, PROPP, NUPEB, UFOP.

À Deus, por me ensinar a ser persistente e resiliente diante das adversidades da vida, ao meu pai Antonio Sousa e ao meu namorado Uberdan Castro, por me concederem todas as condições necessárias para que eu concluísse este trabalho, a minha irmã Iasmym Sousa, por me motivar a sempre ir mais longe, à Profa. Renata Guerra, por não ter permitido que eu fracassasse nesta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A minha trajetória até aqui não foi fácil, por muitas vezes pensei em desistir, por muitas vezes pensei que não fosse capaz de obter o meu título de doutora, mas sempre que isso acontecia, Deus colocava pessoas especiais ao meu lado, que me motivavam a seguir em frente, e sem as quais certamente não teria chegado até aqui. Agradeço a todas as pessoas especiais que permitiram a realização deste trabalho, em especial:

À Claudiane Barbosa, pela generosidade de ter compartilhado o seu projeto de doutorado comigo.

A minha orientadora, Profa. Dra. Andréia Alzamora, por ter me dado à oportunidade de trabalhar em sua equipe, permitindo a execução do presente estudo. Agradeço por ter contribuído muito para a minha formação acadêmica e pessoal através de seus ensinamentos e principalmente por ter me dado à liberdade de fazer minhas próprias escolhas. Agradeço pela paciência, dedicação e por todo o empenho em me orientar desde o meu segundo período de graduação, há exatos 11 anos atrás.

A minha coorientadora, Profa. Dra. Renata Guerra, por me ensinar a acreditar em mim mesmo, por não ter permitido que eu desistisse do meu sonho de ser doutora, por ter feito a minha vida ir para frente e por me incentivar a sempre ir mais longe. Agradeço pelo carinho, pela confiança e pelos ensinamentos que levarei por toda vida.

Ao Prof. Dr. Elísio Evangelista, pelo exemplo de história de superação que é para mim, pelos ensinamentos para concurso público e por todo apoio e carinho. Agradeço por ser meu espelho de profissional e por ter me ensinado a amar Bioquímica Metabólica através de sua paciência, dedicação, amor e paixão ao lecionar essa disciplina.

À Profa. Dra. Raquel do Pilar Machado, in memoriam, pela simpatia e exemplo de vida que foi para mim.

Ao Prof. Dr. Robson Santos pelo fornecimento da ciclodextrina [HP β CD/Ang-(1-7)] utilizada no meu segundo projeto de tese e pela grande colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Camila Carrião, Daniela Caldeira e William Festuccia por terem participado da minha banca examinadora de qualificação e pelas enormes contribuições que fizeram ao meu projeto de tese.

À Profa. Dra. Claudia Carneiro e a técnica Rosália Lopes, pela confecção das lâminas histológicas.

Ao meu pai Antonio Sousa, pelo grande exemplo de vida que é para mim, meu porto seguro, por tudo que me ensinou, por todo o sacrifício que teve para me educar, por me mostrar o caminho certo a seguir, pelo apoio pleno e por ter me concedido tudo que eu precisava para concluir este trabalho. Ao meu namorado, Uberdan Castro, não tenho palavras para agradecer tudo que já fez e faz por mim. Agradeço pelo imenso amor, por estar sempre ao meu lado, por me incentivar a sempre ir mais longe, por não me deixar desistir diante das adversidades e por ter me concedido tudo que eu precisava para concluir este trabalho. Sem vocês eu não teria chegado até aqui! Muito obrigada!

À minha mãe de coração Luciana Oliveira, pelo cuidado e carinho incondicional. Aos meus irmãos Iasmym, Iury, Marcos Vinícius e Marcos Victor pelo imenso amor. Aos meus familiares pela força e torcida, em especial, a tia Cláudia Oliveira pela enorme ajuda no início dos meus estudos. Aos meus sogros, Marly Castro e Clodoveu Castro, por me acolherem como filha e por me apoiarem nos momentos delicados durante a realização deste trabalho.

À Talita dos Santos pela confecção das fotomicrografias histológicas, pelos ensinamentos de pipetagem e qRT-PCR e pela amizade, carinho e apoio incondicional. À Daiane Oliveira pela correção da parte escrita da minha tese, pela enorme ajuda nos

experimentos de Folch e estresse oxidativo, nas eutanásias e nos cálculos de qRT-PCR. Agradeço pelo carinho, força, amizade e por me contagiar com a sua alegria constante. À Luciene dos Santos, pelo exemplo de força e sabedoria que é para mim e pelo imenso carinho, força e amizade. À Deborah Oliveira, Isabela Fernandes, Natália Barboza e Viviano Neves, pelo carinho, apoio, amizade e enorme ajuda nas eutanásias e rotinas laboratoriais. Agradeço por terem me acolhido no LBBM como irmã científica, por terem me ensinado a trabalhar em equipe e pelas conversas e risadas inesquecíveis.

À Ester Alves, France Anne, Pollyana Queiroz, Regina Assenço, Thales Paiva e Vitor Fernandes, pela enorme ajuda em situações cotidianas e pelo apoio, torcida e momentos descontraídos.

À Andréa Barbosa, pela enorme ajuda no manejo e tratamento dos animais durante os experimentos no Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

À Vivian Figueiredo pela enorme ajuda nas dosagens de insulina sérica e das enzimas ALT e AST.

À Taynara Lima pela enorme ajuda no experimento de TBARS.

À Dra. Luiza Perucci, técnica do Laboratório de Genômica, por toda competência, atenção, disponibilidade e enorme ajuda nos cálculos dos experimentos de qRT-PCR e na resolução de problemas de não amplificação de genes.

À Dra. Nívia Carolina, pela confecção das pranchas histológicas e pelos ensinamentos durante as análises histológicas.

À CAPES, CNPQ, FAPEMIG, INCT, NUPEB, PROPP, REDE TOXIFAR e UFOP pelo apoio financeiro que tornou este trabalho possível.

Finalmente, agradeço aos animais experimentais que com inocência sacrificam suas vidas pela ciência e pelo bem de nossa existência.

*“O desejo ardente apoiado pela fé não
conhece a palavra impossível.”*

(Napoleon Hill)

*“O triunfo dos que brilham é sempre
recomeçar.”*

*(Prof. Dr. Elísio Alberto Evangelista –
UFOP)*

RESUMO

O estado nutricional no início da vida está envolvido no fenótipo metabólico da prole. Dados anteriores de nosso laboratório demonstraram que o consumo de dieta hiperlipídica durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias) induziu distúrbios característicos da síndrome metabólica em progenitoras da geração zero (G0), que foram transmitidos aos seus descendentes da primeira (F1) e segunda geração (F2), apesar de terem sido alimentados com dieta controle por 13 semanas pós-desmame. No entanto, os mecanismos que levam à desregulação metabólica na prole ainda não estão claros. Dessa forma, o presente estudo avaliou o efeito do consumo materno de dieta hiperlipídica na expressão de genes envolvidos no metabolismo hepático de glicose, lipídeos e colesterol da G0 e F2, a fim de determinar se os distúrbios metabólicos da F2 foram desencadeados pela desregulação de vias metabólicas hepáticas da G0, que persistiu até a F2. Para isso, ratos foram acasalados com ratas, ambos da linhagem Fischer com 90 dias de idade, não consanguíneos, para geração da prole F1. Machos e fêmeas da prole F1 com 90 dias de idade, não consanguíneos, foram acasalados para geração da prole F2. As progenitoras foram alimentadas com dieta hiperlipídica (grupo G0-DH) ou controle (grupo G0-DC) durante o acasalamento, gestação e lactação (59 dias). As proles F1 e F2 receberam dieta controle após desmame até completar 90 dias de idade. A prole F2 foi dividida em dois grupos de acordo com alimentação da G0: prole F2 de progenitoras G0-DC (grupo F2-DC) e prole F2 de progenitoras G0-DH (grupo F2-DH). Nossos resultados revelaram que a dieta hiperlipídica materna induziu aumento da glicemia de jejum, dos níveis séricos de triglicérides e insulina, do HOMA-IR, da massa relativa do fígado, do conteúdo de triglicérides hepático e da peroxidação lipídica nos grupos G0-DH e F2-DH. As progenitoras G0-DH apresentaram ainda esteatose microvesicular intensa, aumento do conteúdo de colesterol hepático e da atividade da SOD. Também foi observado que a prole F2-DH apresentou esteatose microvesicular discreta e aumento dos níveis séricos das enzimas ALT e AST e do colesterol total e da AUC do TTOG. A análise da expressão de genes envolvidos no metabolismo hepático de glicose revelou que a dieta hiperlipídica materna induziu redução dos níveis de mRNA de *Insr*, *Irs1* e *Akt2* e aumento dos níveis de mRNA de *Fbp1* nos grupos G0-DH e F2-DH. Além disso, as progenitoras G0-DH apresentaram aumento da expressão gênica de *Gp*. Em relação ao metabolismo de lipídeos, foi observado que as progenitoras G0-DH apresentaram aumento dos níveis de mRNA de *Srebp1c* e níveis similares de mRNA de *Hadh*. No entanto, foi visto que a prole F2-DH apresentou níveis similares de mRNA de *Srebp1c* e aumento dos níveis de mRNA de *Hadh*. Em relação à expressão de genes envolvidos no metabolismo hepático de colesterol, foi observado que as progenitoras G0-DH apresentaram aumento da expressão de mRNA de *Hmgcr* e *Ldlr*. Em contrapartida, foi observado que a prole F2-DH apresentou redução dos níveis de mRNA de *Hmgcr* e níveis similares de mRNA de *Ldlr*. A análise da expressão gênica de sirtuínas mostrou que os grupos G0-DH e F2-DH apresentaram redução dos níveis de mRNA de *Sirt1*, *Sirt2*, *Sirt3* e *Sirt7*. Além disso, a prole F2-DH apresentou redução dos níveis de mRNA de *Sirt5* e *Sirt6*. Nossos achados sugerem que o consumo de dieta hiperlipídica durante o acasalamento, a gestação e a amamentação induziu desregulação no metabolismo hepático da G0, que levou a distúrbios metabólicos que persistiram até a F2, indicando que a dieta hiperlipídica materna atuou como um desregulador metabólico hepático transgeracional na F2. Nossos dados reforçam a importância da nutrição materna para a saúde da segunda geração de descendentes.

Palavras Chave: dieta hiperlipídica materna; prole F2; desregulação metabólica hepática; transgeracional.

ABSTRACT

Early nutritional status is involved in the offspring metabolic phenotype. Previous data from our laboratory showed that consumption of hyperlipidic diet during mating, gestation and lactation (59 days) induced disorders characteristic of the metabolic syndrome in progenitors of zero generation (G0), which were transmitted to their descendants of the first (F1) and second generation (F2), although they were fed a control diet for 13 weeks after weaning. However, the mechanisms that lead to metabolic dysregulation in the offspring are still unclear. Thus, the present study evaluated the effect of maternal consumption of hyperlipidic diet on the expression of genes involved in the hepatic metabolism of glucose, lipids and cholesterol of G0 and F2, in order to determine if the metabolic disorders of F2 were triggered by deregulation of pathways hepatic metabolism of G0, which persisted up to F2. For this, rats were mated with rats, both of the Fischer lineage with 90 days of age, non-consanguineous, for F1 offspring generation. Males and females of F1 offspring, 90 days old, non-consanguineous, were mated to F2 offspring generation. The progenitors were fed hyperlipid diet (G0-DH group) or control (G0-DC group) during mating, gestation and lactation (59 days). The F1 and F2 offspring received control diet after weaning until 90 days of age. F2 offspring were divided into two groups according to G0 feeding: F2 offspring of G0-DC progenitors (F2-DC group) and F2 offspring of G0-DH progenitors (F2-DH group). Our results revealed that the maternal hyperlipidic diet induced an increase in fasting glycemia, triglyceride and insulin serum levels, HOMA-IR, liver relative mass, liver triglyceride content and lipid peroxidation in G0-DH and F2-DH groups. G0-DH progenitors also showed intense microvesicular steatosis, increased hepatic cholesterol content and SOD activity. It was also observed that the F2-DH offspring showed discrete microvesicular steatosis and increased serum levels of ALT and AST and total cholesterol and AUC of the TTOG. Analysis of the expression of genes involved in glucose hepatic metabolism revealed that maternal hyperlipidic diet reduced *Insr*, *Irs1* and *Akt2* mRNA levels and increased *Fbp1* mRNA levels in the G0-DH and F2-DH groups. Furthermore, the G0-DH progenitors showed increased *Gp* gene expression. Regarding lipid metabolism, it was observed that the G0-DH progenitors showed increased levels of *Srebp1c* mRNA and similar levels of *Hadh* mRNA. However, it was seen that F2-DH offspring showed similar levels of *Srebp1c* mRNA and increased levels of *Hadh* mRNA. Regarding the expression of genes involved in the hepatic metabolism of cholesterol, it was observed that the G0-DH progenitors showed increased mRNA expression of *Hmgcr* and *Ldlr*. In contrast, it was observed that the F2-DH offspring presented reduction in *Hmgcr* mRNA levels and similar levels of *Ldlr* mRNA. Analysis of the sirtuin gene expression showed that the G0-DH and F2-DH groups showed reduction of the mRNA levels of *Sirt1*, *Sirt2*, *Sirt3* and *Sirt7*. Furthermore, the F2-DH offspring presented reduction of the mRNA levels of *Sirt5* and *Sirt6*. Our findings suggest that consumption of hyperlipidic diet during mating, gestation, and lactation induced dysregulation in the hepatic metabolism of G0, which led to metabolic disorders that persisted up to F2, indicating that the maternal hyperlipidic diet acted as a transgenerational hepatic metabolic disregulator in F2. Our data reinforce the importance of maternal nutrition for the health of the second generation of descendants.

Keywords: maternal hyperlipidic diet; F2 offspring; hepatic metabolic dysregulation; transgenerational.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Regulação do metabolismo hepático de glicose e lipídeos via sinalização dependente de insulina.....	22
Figura 02: Progressão em forma de esquema da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD).....	26
Figura 03: Reação de desacetilação pela sirtuína (no caso SIRT1).....	31
Figura 04: Delineamento experimental utilizado para obtenção das progenitoras G0 e das proles F1 e F2.....	40
Figura 05: Gel de agarose a 1,2% representativo da qualidade do RNA total extraído do fígado das progenitoras G0 e das proles F2.....	49
Figura 06: Teste de tolerância oral à glicose e área sob a curva de progenitoras alimentadas com dieta controle (G0-DC) ou hiperlipídica (G0-DH) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias).....	55
Figura 07: Teste de tolerância oral à glicose e área sob a curva das proles F2 de progenitoras alimentadas com dieta controle (F2-DC) ou hiperlipídica (F2-DH) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias).....	57
Figura 08: Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de ratas (os) Fisher demonstrando o grau de esteatose microvesicular de progenitoras (G0) alimentadas com dieta controle (DC) ou hiperlipídica (DH) durante acasalamento, gestação e lactação e das proles F2 alimentadas com DC durante 13 semanas após o desmame.....	59
Figura 09: Grau de esteatose microvesicular hepática de progenitoras alimentadas com dieta controle (G0-DC) ou hiperlipídica (G0-DH) durante acasalamento, gestação e lactação e das proles F2-DC e F2-DH alimentadas com dieta controle durante 13 semanas após o desmame.....	60
Figura 10: Teor de triglicérides e colesterol no fígado de progenitoras alimentadas com dieta controle (G0-DC) ou hiperlipídica (G0-DH) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias).....	62

Figura 11: Teor de triglicérides e colesterol no fígado das proles F2 de progenitoras alimentadas com dieta controle (F2-DC) ou hiperlipídica (F2-DH) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias).....	63
Figura 12: Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), concentrações de proteína carbonilada e peroxidação lipídica avaliada pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado de progenitoras alimentadas com dieta controle (G0-DC) ou hiperlipídica (G0-DH) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias).....	65
Figura 13: Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), concentrações de proteína carbonilada e peroxidação lipídica avaliada pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado das proles F2 de progenitoras alimentadas com dieta controle (F2-DC) ou hiperlipídica (F2-DH) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias).....	66
Figura 14: Expressão de mRNA de <i>Insr</i> , <i>Irs1</i> e <i>Akt2</i> (qRT-PCR) no fígado de progenitoras alimentadas com dieta controle (G0-DC) ou hiperlipídica (G0-DH) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias).....	68
Figura 15: Expressão de mRNA de <i>Insr</i> , <i>Irs1</i> e <i>Akt2</i> (qRT-PCR) no fígado das proles F2 de progenitoras alimentadas com dieta controle (F2-DC) ou hiperlipídica (F2-DH) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias).....	69
Figura 16: Expressão de mRNA de <i>Fbp1</i> e <i>Gp</i> (qRT-PCR) no fígado de progenitoras alimentadas com dieta controle (G0-DC) ou hiperlipídica (G0-DH) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias).....	71
Figura 17: Expressão de mRNA de <i>Fbp1</i> e <i>Gp</i> (qRT-PCR) no fígado das proles F2 de progenitoras alimentadas com dieta controle (F2-DC) ou hiperlipídica (F2-DH) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias).....	72
Figura 18: Expressão de mRNA de <i>Hadh</i> e <i>Srebp1c</i> (qRT-PCR) no fígado de progenitoras alimentadas com dieta controle (G0-DC) ou hiperlipídica (G0-DH) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias).....	74

Figura 19: Expressão de <i>Hadh</i> e <i>Srebp1c</i> (qRT-PCR) no fígado das proles F2 de progenitoras alimentadas com dieta controle (F2-DC) ou hiperlipídica (F2-DH) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias).....	75
Figura 20: Expressão de mRNA de <i>Hmgcr</i> e <i>Ldlr</i> (qRT-PCR) no fígado de progenitoras alimentadas com dieta controle (G0-DC) ou hiperlipídica (G0-DH) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias).....	77
Figura 21: Expressão de mRNA de <i>Hmgcr</i> e <i>Ldlr</i> (qRT-PCR) no fígado das proles de progenitoras alimentadas com dieta controle (F2-DC) ou hiperlipídica (F2-DH) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias).....	78
Figura 22: Expressão de mRNA de <i>Sirt1-7</i> (qRT-PCR) no fígado de progenitoras alimentadas com dieta controle (G0-DC) ou hiperlipídica (G0-DH) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias).....	80
Figura 23: Expressão de mRNA de <i>Sirt1-7</i> (qRT-PCR) no fígado das proles F2 de progenitoras alimentadas com dieta controle (F2-DC) ou hiperlipídica (F2-DH) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias).....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Composição nutricional (g/Kg) e conteúdo energético da dieta controle (DC) e hiperlipídica (DH).....	37
Tabela II: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>).....	50
Tabela III: Valores de estabilidade dos genes gerados pela análise NormFinder.....	51
Tabela IV: Valores de <i>slope</i> e eficiências dos <i>primers</i> avaliados.....	52
Tabela V: Parâmetros bioquímicos e massa relativa do fígado de progenitoras alimentadas com dieta controle (G0-DC) ou hiperlipídica (G0-DH) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias).....	54
Tabela VI: Parâmetros bioquímicos e massa relativa do fígado das proles F2 de progenitoras alimentadas com dieta controle (F2-DC) ou hiperlipídica (F2-DH) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias).....	56
Tabela VII: Presença ou ausência da NAFLD em progenitoras alimentadas com dieta controle (G0-DC) ou hiperlipídica (G0-DH) durante acasalamento, gestação e lactação e nas proles F2-DC e F2-DH alimentadas com dieta controle durante 13 semanas após o desmame.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACC:** acetil-CoA carboxilase;
- Acetil CoA:** acetil coenzima A;
- AKT:** proteína quinase B;
- ALT:** alanina aminotransferase;
- AMPc:** adenosina monofosfato cíclico;
- AST:** aspartato aminotransferase;
- ATP:** adenosina trifosfato;
- AUC:** área sob a curva;
- BHT:** butilhidroxitolueno;
- BSA:** albumina de soro bovino;
- CCA:** Centro de Ciência Animal;
- cDNA:** DNA complementar;
- ChREBP:** proteína de ligação ao elemento de resposta ao carboidrato;
- CPT-1:** carnitina palmitoiltransferase 1;
- CREB:** proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc;
- DC:** dieta controle Nuvilab;
- DH:** dieta hiperlipídica;
- DMSO:** dimetilsulfóxido;
- DNA:** ácido desoxirribonucleico;
- DNPH:** 2,4-dinitrofenilhidrazina;
- DOHaD:** hipótese das Origens do Desenvolvimento da Saúde e Doença;
- F1:** primeira geração de descendentes;
- F1-DC:** prole F1 de progenitoras G0 alimentadas com dieta controle;
- F1-DH:** prole F1 de progenitoras G0 alimentadas com dieta hiperlipídica;
- F2:** segunda geração de descendentes;
- F2-DC:** prole F2 de progenitoras G0 alimentadas com dieta controle;
- F2-DH:** prole F2 de progenitoras G0 alimentadas com dieta hiperlipídica;
- FADH₂:** flavina adenina dinucleotídeo;
- FAS:** ácido graxo sintase;
- Fbp1:** frutose-1,6-bisfosfatase;
- FoxO1:** *forkhead box protein O1*;
- G0:** geração zero;

G0-DC: progenitoras G0 alimentadas com dieta controle durante o acasalamento, gestação e lactação;

G0-DH: progenitoras G0 alimentadas com dieta hiperlipídica durante o acasalamento, gestação e lactação;

G1: genitoras da primeira geração;

G1-DC: genitores e genitoras de progenitoras G0 alimentadas com dieta controle;

G1-DH: genitores e genitoras de progenitoras G0 alimentadas com dieta hiperlipídica;

G6Pase: glicose-6-fosfatase;

Gapdh: gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase;

GLUT2: transportador de glicose 2;

GP: glicogênio fosforilase;

GSK-3: glicogênio sintase quinase 3;

H₂O₂: peróxido de hidrogênio;

HADH: 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase;

HCl: ácido clorídrico;

HMGCR: 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase;

HOMA-IR: modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina;

HOMA-β: modelo de avaliação da homeostase da capacidade funcional das células β;

Hprt1: gene hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase;

INSR: receptor de insulina;

IRS-1: substrato do receptor de insulina 1;

IRS-2: substrato do receptor de insulina 2;

LCAD: acil CoA desidrogenase de cadeia longa;

LDL: lipoproteína de baixa densidade;

LDLr: receptor da lipoproteína de baixa densidade;

mTORC1: complexo 1 da proteína alvo de rapamicina em mamíferos;

MTT: brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio;

NaCl: cloreto de sódio;

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo;

NAFLD: doença hepática gordurosa não alcoólica;

NASH: esteato-hepatite não alcoólica;

ncRNAs: RNAs não codificantes;

O₂⁻: ânion superóxido;

PKD1: piruvato quinase dependente de PIP3;

PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinase;

PGC1 α : coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma;

PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase;

PIP3: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato;

PKA: proteína quinase A;

PP1: proteína fosfatase 1;

PPAR: receptor ativado por proliferadores de peroxissoma;

PPAR α : receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissoma;

Ppia: gene peptidilprolil isomerase A;

qRT-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real;

Rn18s: gene RNA ribossomal 18S;

RNA: ácido ribonucleico;

ROS: espécies reativas de oxigênio;

Rplp2: gene fosfoproteína ribossomal P2 da subunidade 60S;

SCAP: proteína ativadora da clivagem da SREBP;

SDS: dodecil sulfato de sódio;

SIRT: sirtuína;

SOD: superóxido dismutase;

SOD2: superóxido dismutase 2;

SREBP: proteínas de ligação aos elementos reguladores de esterol;

SREBP-1c: proteína-1c de ligação ao elemento regulador de esterol;

SREBP-2: proteína-2 de ligação ao elemento regulador de esterol;

TBA: ácido tiobarbitúrico;

TBARS: ácido tiobarbitúrico;

TCA: ácido tricloroacético;

TSC: complexo tuberosose esclerose;

TTOG: teste de tolerância oral à glicose;

UFOP: Universidade Federal de Ouro Preto;

VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Visão geral do metabolismo hepático	19
1.2. Desregulação do metabolismo hepático	24
1.3. Efeitos transgeracionais da dieta hiperlipídica materna	27
1.4. Mecanismos moleculares envolvidos na transmissão transgeracional em resposta a dieta hiperlipídica materna	30
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo geral	35
3.2. Objetivos específicos	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. Animais	36
4.2. Dietas	36
4.3. Protocolo Experimental	38
4.4. Descrição dos Procedimentos Experimentais	41
4.4.1. Avaliação da Massa Relativa do Fígado	41
4.4.2. Análises Bioquímicas	42
4.4.3. Dosagem da Insulina por ELISA	42
4.4.4. Cálculo HOMA IR e HOMA β	42
4.4.5. Glicemia de Jejum e Teste de Tolerância Oral à Glicose	42
4.4.6. Análises Histopatológicas	43
4.4.7. Extração e Quantificação de Lipídeos Hepáticos	43
4.4.8. Determinação da Defesa Antioxidante e de Biomarcadores de Estresse Oxidativo no Fígado	44
4.4.8.1. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	44

4.4.8.2. Proteína Carbonilada	46
4.4.8.3. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	47
4.4.9. Expressão de mRNAs por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR).....	48
4.4.9.1. Extração de RNA Total	48
4.4.9.2. Síntese de DNA Complementar (cDNA)	49
4.4.9.3. Quantificação da Expressão Gênica por qRT-PCR	49
4.4.9.4. Seleção do Controle Endógeno	51
4.4.9.5. Curva de Eficiência e Amplificação dos <i>Primers</i>	52
5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	53
6. RESULTADOS	54
6.1. Parâmetros do Metabolismo de Glicose e Lipídeos de Progenitoras G0 e das Proles F2	54
6.2. Histologia do Fígado e Parâmetros Bioquímicos Hepáticos de Progenitoras G0 e das Proles F2.....	58
6.3. Avaliação da Atividade Antioxidante e do Estresse Oxidativo no Fígado de Progenitoras G0 e das Proles F2.....	64
6.4. Expressão de mRNAs do Metabolismo de Glicose e Lipídeos no Fígado de Progenitoras G0 e das Proles F2 por qRT-PCR.....	67
6.5. Expressão de mRNAs de Sirtuínas no Fígado de Progenitoras G0 e das Proles F2 por qRT-PCR.....	79
7. DISCUSSÃO	83
8. CONCLUSÃO	95
9. PERSPECTIVAS.....	95
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
11. ANEXO I	107

1. INTRODUÇÃO

1.1. Visão geral do metabolismo hepático

O fígado é um órgão metabólico importante na regulação da homeostase energética corporal, sendo que a disfunção hepática está associada a desequilíbrios metabólicos sistêmicos e vice-versa (Rui, 2014; Vacca *et al.*, 2015). A função metabólica do fígado é regulada pela insulina, glucagon e outros hormônios metabólicos (Rui, 2014). No estado pós-prandial, a diminuição dos níveis de glucagon e o aumento dos níveis de insulina sinalizam para o fígado aumentar o catabolismo da glicose (glicólise), parar a produção de glicose e armazenar o excesso de nutrientes na forma de glicogênio (glicogênese) e lipídeos (lipogênese de novo) (Lin e Accili, 2011). Sob condições de jejum, a diminuição dos níveis de insulina e o aumento dos níveis de glucagon inibem a glicólise e promovem a produção de glicose hepática, primeiro a partir da degradação dos estoques de glicogênio (glicogenólise) e depois a partir de precursores gliconeogênicos (gliconeogênese) (Ramnanan *et al.*, 2011).

O fígado produz glicose principalmente por meio da glicogenólise durante o jejum de curto prazo. Durante o jejum prolongado, o glicogênio hepático é depletado, e os hepatócitos sintetizam a glicose através da gliconeogênese hepática ou síntese de glicose de novo a partir de precursores não-carboidratos (Rui, 2014). Essa via inicia-se a partir da conversão de piruvato em oxaloacetato pela piruvato carboxilase na mitocôndria e termina a partir da conversão de glicose-6-fosfato em glicose pela glicose-6-fosfatase (G6Pase) depois de múltiplas reações bioquímicas no citosol (Pilkis *et al.*, 1988; Pilkis e Claus, 1991). Os substratos gliconeogênicos são gerados no fígado ou transportados para o fígado a partir de tecidos extra-hepáticos por meio da circulação (Rui, 2014). Entre os substratos para a gliconeogênese estão os aminoácidos, que podem ser convertidos em piruvato ou intermediários do ciclo de Krebs; lactato, que pode ser convertido em piruvato pela lactato desidrogenase; e glicerol (a partir da lipólise do tecido adiposo branco), que pode ser convertido em diidroxiacetona fosfato, um intermediário gliconeogênico (processo de dois passos que é catalisado pela glicerol quinase e glicerol-3-fosfato desidrogenase). As principais enzimas reguladoras da gliconeogênese são: a G6Pase, a frutose-1,6-bisfosfatase (Fbpase1 ou Fbp1), a piruvato carboxilase e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) (Han *et al.*, 2016). A Fbp1 catalisa a hidrólise da frutose-1,6-bifosfato em frutose-6-fosfato e fosfato inorgânico, penúltima etapa da gliconeogênese (Lin e Accili, 2011). É uma enzima limitante da

velocidade da via gliconeogênica, sendo responsável pelo controle do metabolismo energético e homeostase da glicose (Benkovic e Demaine, 1982).

A ativação crônica da gliconeogênese é induzida através de fatores de transcrição gliconeogênicos, incluindo a proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB) e *forkhead box protein O1* (FoxO1) (Oh *et al.*, 2013). CREB é ativado pela fosforilação mediada pela proteína quinase A (PKA) e induz a expressão de PEPCK (citoplasmática), G6Pase e coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 α) (Herzig *et al.*, 2001). A proteína FoxO1 é um alvo a jusante da via de sinalização da insulina/proteína quinase B (AKT), e a sua atividade é regulada pela localização subcelular dependente de fosforilação. Após a fosforilação mediada pela AKT em seus resíduos de serina e treonina, a FoxO1 move-se para o citosol, onde é degradada pela via dependente de ubiquitina/proteassoma (Biggs *et al.*, 1999; Nakae *et al.*, 1999). A FoxO1 hepática regula a gliconeogênese por meio da regulação transcricional de genes chave da via, como PEPCK e G6Pase, e é considerada um importante alvo regulatório para a supressão da gliconeogênese hepática mediada pela insulina (Haeusler *et al.*, 2010).

No estado alimentado, a glicose entra nos hepatócitos via transportador de glicose 2 (GLUT2) e é fosforilada pela glicocinase para produzir glicose-6-fosfato. A glicose-6-fosfato é usada para sintetizar o glicogênio pela glicogênio sintase (glicogênese) (Agius, 2008). No estado de jejum, o glicogênio é hidrolisado pela glicogênio fosforilase (GP) para produzir glicose (glicogenólise). A glicose-6-fosfato é um inibidor alostérico da GP e um ativador alostérico da glicogênio sintase, aumentando os níveis de glicogênio hepático (Agius, 2008). Tanto a atividade da glicogênio sintase como da GP é regulada por modificações pós-traducionais. A fosforilação da glicogênio sintase pela glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3), inibe sua atividade, enquanto, a fosforilação da GP ativa sua atividade (Rui, 2014).

A glicogênio sintase é uma enzima chave da síntese de glicogênio que catalisa a transferência do resíduo de glicose da UDP-glicose para a extremidade não redutora de uma cadeia de glicogênio pré-existente, para produzir uma nova ligação glicosídica $\alpha 1 \rightarrow 4$, facilitando o alongamento das cadeias de glicogênio (Han *et al.*, 2016). A GP é uma das principais enzimas envolvidas na glicogenólise que catalisa a remoção de um resíduo de glicose da extremidade não redutora de uma cadeia de glicogênio, levando a produção de glicose-1-fosfato (Agius, 2015). A glicose-1-fosfato pode ser convertida em glicose-6-fosfato pela fosfoglicomutase, e a glicose-6-fosfato pode ser incorporada

na glicólise ou convertida em glicose pela G6Pase, dependendo do estado energético do organismo (Han *et al.*, 2016).

A fosforilação e ativação da GP é realizada por um mecanismo dependente de epinefrina e glucagon no fígado. No estado de jejum, a ligação dos hormônios aos seus receptores acoplados à proteína G na superfície celular (receptor beta-adrenérgico ou receptor de glucagon) ativa a adenilato ciclase para produzir adenosina monofosfato cíclico (AMPC), levando a ativação da PKA. A PKA é então responsável pela fosforilação e ativação da fosforilase quinase, que por sua vez fosforila e ativa a GP para catalisar a degradação do glicogênio. No estado alimentado, o aumento dos níveis de insulina inibe a glicogenólise via ativação da proteína fosfatase 1 (PP1), que desfosforila e inativa a GP. A insulina promove a glicogênese via ativação da PP1, que desfosforila e ativa a glicogênio sintase, e via ativação da AKT, que fosforila e inativa a GSK-3, resultando na ativação da glicogênio sintase (Han *et al.*, 2016).

Os efeitos anabólicos da insulina no metabolismo hepático são mediados pela via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/AKT (Santoleri e Titchenell, 2019). Quando a insulina se liga ao seu receptor (INSR), este sofre autofosforilação em múltiplos resíduos de tirosina. Isto culmina com a ativação da função quinase do receptor, o qual propaga este sinal, fosforilando conseqüentemente seus substratos [substratos do receptor de insulina 1 (IRS-1) e 2 (IRS-2)] em seus resíduos de tirosina. O IRS-1 e IRS-2 fosforilados recrutam e ativam a PI3K gerando fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP3) (Gual *et al.*, 2005; Hubbard, 2013). O PIP3 promove o recrutamento da piruvato quinase dependente de PIP3 (PDK1) e AKT, levando a subsequente fosforilação de AKT pela PDK1 no resíduo de treonina (Thr308) (Taniguchi *et al.*, 2006). A AKT ativa, fosforila múltiplas vias a jusante para controlar vias metabólicas no fígado, como a síntese de glicogênio, a gliconeogênese, a glicólise e a síntese de lipídeos (Gross *et al.*, 2009; Huang e Manning, 2009). A AKT fosforila e inativa a GSK-3 e FoxO1 para inibir a glicogenólise e a expressão de genes gliconeogênicos, respectivamente (Lin e Accili, 2011). A AKT também promove a síntese de proteínas por ativar o complexo 1 da proteína alvo de rapamicina em mamíferos (mTORC1) via fosforilação e inibição do complexo tuberose esclerose (TSC). Ao ativar a mTORC1 e inibir o FoxO1, a AKT promove a síntese de lipídeos por ativar o programa de genes lipogênicos via proteína-1c de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP-1c) (Titchenell *et al.*, 2017) (figura 01).

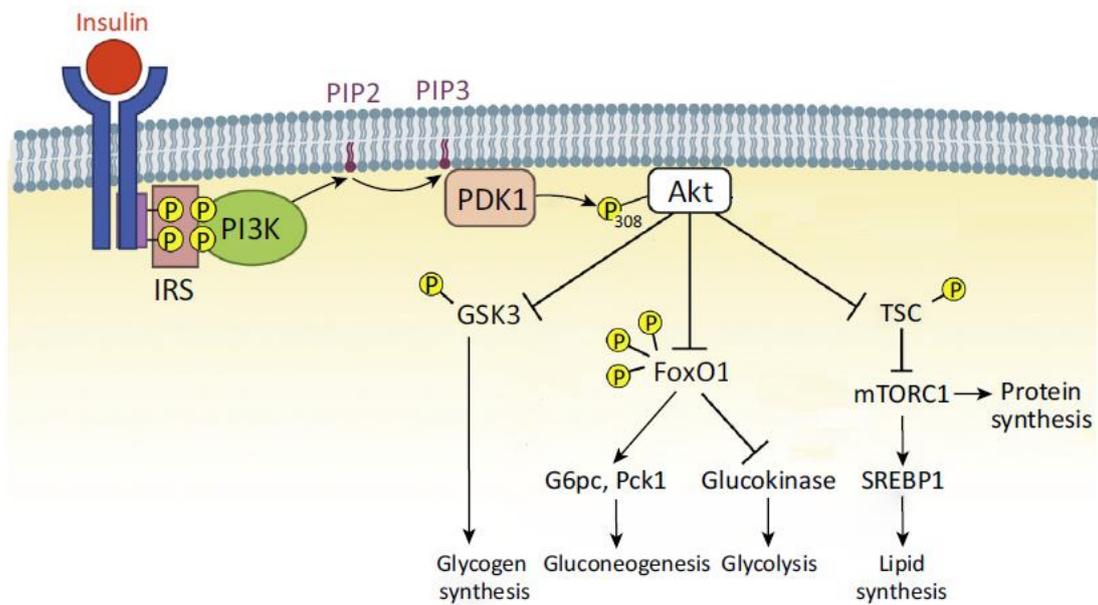


Figura 01: Regulação do metabolismo hepático de glicose e lipídeos via sinalização dependente de insulina. No estado alimentado, o fígado regula o metabolismo hepático de glicose e lipídeos em resposta ao aumento das concentrações de insulina. A ligação da insulina ao seu receptor resulta em autofosforilação e subsequente recrutamento e fosforilação de seus substratos (substratos do receptor de insulina - IRSs). IRSs recrutam e ativam fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), que fosforila fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) gerando fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP3). PIP3, então, ativa a piruvato de hidrogenase quinase 1 (PDK1), que fosforila e ativa a proteína quinase B (AKT) no resíduo de treonina (Thr308). A ativação da AKT sinaliza via fosforilação para controlar vários processos metabólicos no fígado, incluindo síntese de glicogênio, gliconeogênese, glicólise e síntese de lipídeos. P=fosforilação. Adaptado de Titchenell e colaboradores (2017) (Titchenell *et al.*, 2017).

A β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos desempenha um importante papel na manutenção da homeostase energética durante o jejum pelo fornecimento de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) e corpos cetônicos (β -hidroxibutirato, acetoacetato e acetona), que são exportados para os tecidos extra-hepáticos pela circulação (Lopaschuk *et al.*, 2010; Rui, 2014). Quando os níveis de glicose e glicogênio são baixos, os triglicérides do tecido adiposo são hidrolisados e os ácidos graxos livres são mobilizados na corrente sanguínea para outros tecidos, incluindo o fígado (Lopaschuk *et al.*, 2010; Knottnerus *et al.*, 2018). Os ácidos graxos livres entram na célula por meio de sistemas de transporte de ácidos graxos (Rui, 2014). O primeiro passo da β -oxidação é a ativação de ácidos graxos produzindo acil-CoA de cadeia longa catalisada pela acil-CoA sintetase de cadeia longa (Yan *et al.*, 2015). A translocação de acil-CoA de cadeia longa para a mitocôndria é mediada pela carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT-1), que é o passo limitante para a entrada de ácidos graxos nas mitocôndrias (Rui, 2014).

O acil-CoA de cadeia longa mitocondrial é subsequentemente degradado por quatro etapas enzimáticas [acil-CoA desidrogenase, 2-enoil-CoA hidratase, 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HADH) e 3-cetoacil-CoA tiolase] (Schreurs *et al.*, 2010), que resultam no encurtamento do ácido graxo em dois carbonos por ciclo. A HADH realiza a penúltima etapa na via de oxidação e catalisa a oxidação de L-3-hidroxiacil-CoAs de comprimentos de cadeia variável em 3-cetoacil-CoAs. Nesta reação, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) é o aceptor de elétrons e NADH é o produto de redução (He *et al.*, 1989; Vredendaal *et al.*, 1996). As reações da β -oxidação geram NADH, flavina adenina dinucleotídeo (FADH₂) e acetil coenzima A (acetil CoA) em cada ciclo, até o último ciclo, quando duas moléculas de acetil-CoA são produzidas a partir do catabolismo de um ácido graxo de quatro carbonos. Os produtos da β -oxidação são direcionados para o ciclo de Krebs (acetil CoA) e para a cadeia respiratória (NADH e FADH₂), sendo utilizados para a produção de energia na célula (Carracedo *et al.*, 2013; Knottnerus *et al.*, 2018). O acetil-CoA pode também ser direcionado para via de síntese de corpos cetônicos no fígado (Knottnerus *et al.*, 2018).

A β -oxidação mitocondrial é regulada pelas enzimas CPT-1 e acetil-CoA carboxilase (ACC) através do intermediário malonil-CoA (Mcgarry *et al.*, 1977; Rui, 2014). No estado alimentado, quando a síntese de ácidos graxos é alta, altos níveis de malonil-CoA impedem a oxidação de ácidos graxos recém-sintetizados pela inibição da CPT-1. No estado de jejum, quando os níveis de acetil-CoA são reduzidos ou quando a atividade da ACC é diminuída, baixos níveis de malonil-CoA promovem a β -oxidação pela ativação da CPT-1 (Ronnett *et al.*, 2005).

O fígado sob condições de excesso de carboidratos, além de utilizar a glicose como principal fonte de energia, também converte a glicose em ácidos graxos (lipogênese de novo). Os ácidos graxos podem ser incorporados em triglicérides para armazenamento de energia no tecido adiposo (Rui, 2014). Inicialmente, a glicose é hidrolisada em piruvato pela glicólise. O piruvato é transportado para a mitocôndria e metabolizado até a formação de citrato, que é exportado para o citoplasma (Rui, 2014). O primeiro passo da lipogênese de novo é a conversão de citrato em acetil-CoA pela ATP-citrato liase. O acetil-CoA é convertido em malonil-CoA pela ACC. A ácido graxo sintase (FAS) é a enzima limitante da velocidade da via que promove a conversão de malonil-CoA em palmitato. Após uma série de reações, o palmitato é posteriormente convertido em ácidos graxos de cadeia longa (Ameer *et al.*, 2014). A lipogênese de novo é regulada a nível transcricional principalmente pelos fatores de transcrição:

SREBP-1c e proteína de ligação ao elemento de resposta ao carboidrato (ChREBP). Esses fatores de transcrição são ativados pela insulina e glicose, respectivamente, e promovem a expressão de enzimas chave para a lipogênese de novo (ATP citrato liase, ACC, FAS) (Denechaud *et al.*, 2008; Postic e Girard, 2008). Os membros da família de proteínas de ligação aos elementos reguladores de esterol (SREBP -1a, -1c e -2) são os principais reguladores do metabolismo de lipídeos (Horton *et al.*, 2002). O SREBP-1c e a proteína-2 de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP-2) são abundantemente expressos no fígado (Horton *et al.*, 2002). O SREBP1-c ativa genes que controlam a síntese de ácidos graxos e triglicérides, enquanto o SREBP-2 ativa genes que controlam a biossíntese do colesterol (Horton *et al.*, 2002).

O fígado exerce um importante papel na regulação da homeostase do colesterol, controlando tanto a captação de colesterol quanto a síntese de novo. A síntese de colesterol endógeno está sob o controle da via da proteína ativadora da clivagem da SREBP (SCAP)|SREBP-2|3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGCR) (Horton *et al.*, 2002; Eberlé *et al.*, 2004). O SREBP-2 estimula a expressão da enzima HMGCR e do receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDLr) quando os níveis de colesterol intracelular estão baixos (Goharkhay *et al.*, 2008). A HMGCR é a enzima limitante da velocidade de síntese de colesterol que catalisa a conversão de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA em mevalonato (Corcos e Le Jossic-Corcos, 2013). O LDLr é responsável pela ligação e internalização da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e pela regulação do nível de LDL no plasma (Hu *et al.*, 2008).

1.2. Desregulação do metabolismo hepático

O metabolismo energético hepático é regulado pela insulina, glucagon e outros hormônios metabólicos que agem de forma coordenada, aditiva e/ou antagonista para controlar a gliconeogênese, a β -oxidação e a lipogênese no fígado. A desregulação do metabolismo energético do fígado é um dos principais contribuintes para a resistência à insulina, doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) e diabetes mellitus tipo 2 (Rui, 2014).

No estado patológico, como obesidade e diabetes tipo 2, a insulina falha em regular adequadamente o metabolismo hepático, levando a elevada produção de glicose, apesar da elevada síntese lipídica, uma condição referida como resistência à insulina hepática (Brown e Goldstein, 2008). Indivíduos resistentes à insulina apresentam aumento da lipogênese de novo e reesterificação, apesar da incapacidade da insulina de

suprimir a produção hepática de glicose. Em adição, indivíduos resistentes à insulina apresentam aumento da exportação e diminuição da hidrólise de triglicérides, que leva ao aumento dos níveis de lipídeos plasmáticos (Petersen *et al.*, 2007; Lambert *et al.*, 2014). Assim, durante a progressão da resistência à insulina, os efeitos no metabolismo de lipídeos induzidos pela insulina são mantidos, mas o controle da produção de glicose hepática pela insulina é defeituoso, levando à hiperglicemia e hipertrigliceridemia (Brown e Goldstein, 2008). Como consequência, a resistência à insulina hepática está implicada no desenvolvimento da NAFLD (Bugianesi *et al.*, 2005; Fabbrini *et al.*, 2010), um distúrbio que pode levar à disfunção hepática (James e Day, 1998).

A NAFLD é considerada uma manifestação hepática da síndrome metabólica (Ashraf e Altaf, 2018), e é uma das causas mais comuns de doença hepática crônica no mundo (Chao *et al.*, 2019). Por definição, a NAFLD é uma condição clinicopatológica caracterizada pelo acúmulo intracelular de lipídeos na ausência de consumo excessivo de álcool (Ashraf e Sheikh, 2015). O primeiro estágio da doença é a esteatose hepática, que é caracterizada pela deposição de triglicérides como gotículas lipídicas no citoplasma de hepatócitos, e definida pelo acúmulo de mais de 5% de gordura no fígado (Szczepaniak *et al.*, 2005). A esteatose hepática pode progredir para esteato-hepatite não alcoólica (NASH), que se distingue do primeiro estágio da doença pela presença de lesão hepatocelular (balonamento de hepatócitos e morte celular), infiltrado inflamatório e/ou deposição de colágeno (fibrose). A NASH, por sua vez, pode evoluir para cirrose (Argo *et al.*, 2009), que é caracterizada por hepatócitos encarcerados por tecido cicatricial composto principalmente de colágeno tipo 1. A cirrose pode evoluir para carcinoma hepatocelular (Starley *et al.*, 2010) (figura 02).

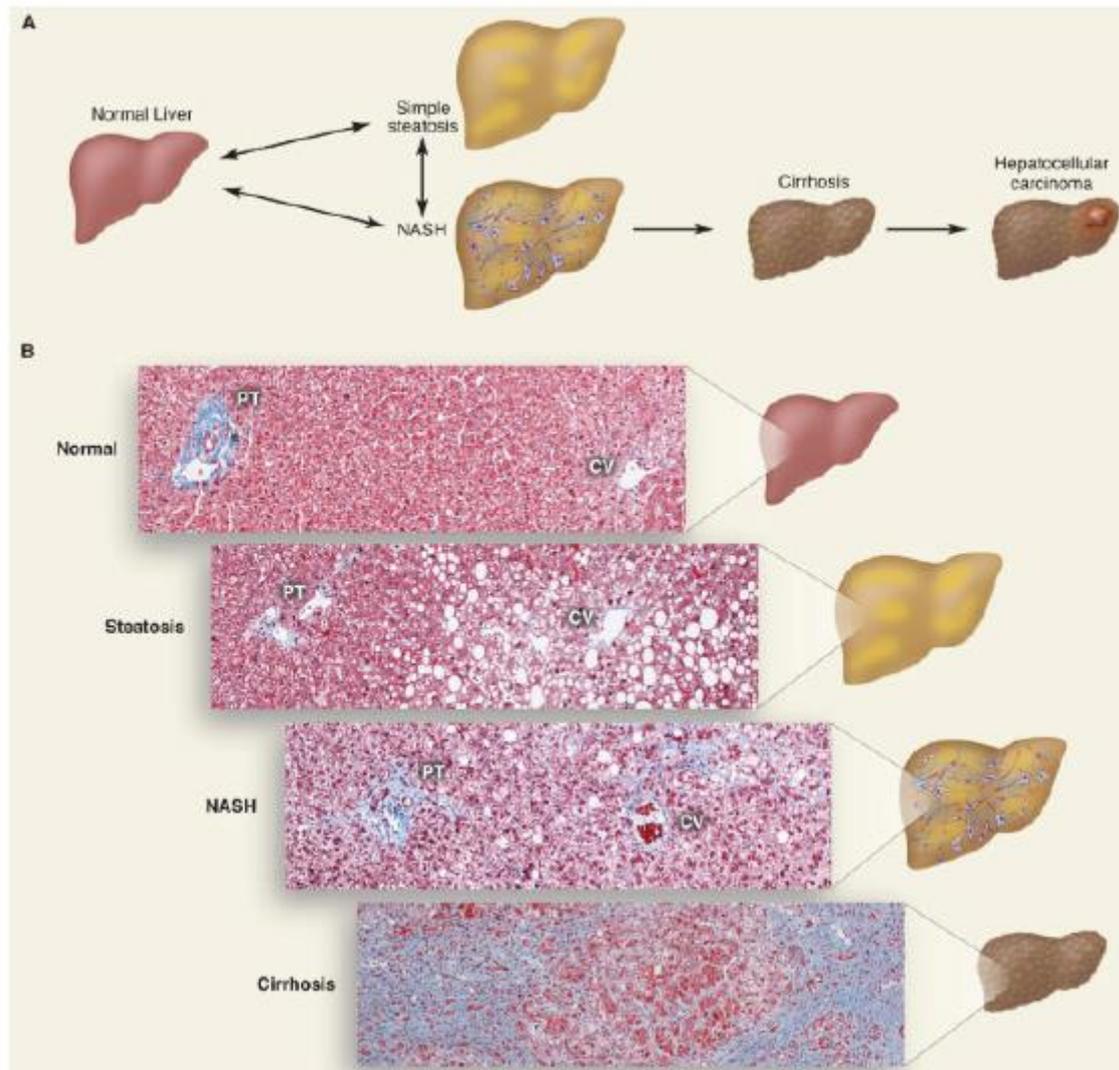


Figura 02: Progressão em forma de esquema da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD). (A) A NAFLD engloba um amplo espectro de distúrbios hepáticos, variando de simples esteatose a forma mais grave, esteato-hepatite não alcoólica (NASH), que pode evoluir para cirrose ou carcinoma hepatocelular. (B) Secções histológicas ilustrando fígado normal, esteatose, NASH e cirrose. PT=tríade portal (artéria hepática, veia porta e ducto biliar) e CV=veia central (Cohen *et al.*, 2011).

A patogênese da NAFLD é baseada na "teoria dos múltiplos *hits*". De acordo com essa teoria, a resistência à insulina é considerada como o "primeiro *hit*" que desencadeia a doença e leva ao aumento dos níveis hepáticos de ácidos graxos livres, resultando em esteatose. O acúmulo de gordura no fígado ocorre quando o influxo de lipídeos para o fígado excede a eliminação de lipídeos hepáticos (por oxidação de ácidos graxos e secreção de triglicérides como partículas de lipoproteínas) (Stefan *et al.*, 2008), e se origina do aumento da lipólise como resultado da resistência à insulina no tecido adiposo, e do aumento da lipogênese de novo devido à hiperinsulinemia. "O primeiro *hit*" torna o fígado mais sensível aos "múltiplos *hits*", como estresse oxidativo,

peroxidação lipídica, disfunção mitocondrial, inflamação, fibrose, necrose e/ou apoptose, que desencadeiam a progressão para os estágios mais avançados da doença (Arab *et al.*, 2018; Bessone *et al.*, 2019).

O elevado consumo de dieta rica em gordura e o sedentarismo são fatores determinantes no desenvolvimento da NAFLD (Sahini e Borlak, 2014; Huang, Y. *et al.*, 2017; Stefan *et al.*, 2019). Além disso, é muito comum em humanos, o consumo de dieta rica em gordura apenas durante a gestação e a amamentação (Zheng *et al.*, 2014), o que pode ser prejudicial para o desenvolvimento de suas descendências (Huang, Y. *et al.*, 2017).

1.3. Efeitos transgeracionais da dieta hiperlipídica materna

A gestação e o início da vida pós-natal são períodos de tempo críticos que podem afetar o crescimento e o desenvolvimento da prole, e a nutrição materna e pós-natal tem sido descrita como um fator determinante para a saúde da prole (Skogen e Overland, 2012; Wallack e Thornburg, 2016). A hipótese das Origens do Desenvolvimento da Saúde e Doença (DOHaD), referida como programação fetal, propõe que as exposições adversas *in utero* ou durante o início da vida, incluindo a má nutrição, podem programar o desenvolvimento de vários tecidos e determinar respostas fisiológicas permanentes, que levam ao desenvolvimento de doenças metabólicas na vida adulta (Lecoutre *et al.*, 2018).

David Barker foi o primeiro a fornecer evidências para essa teoria com base em seus estudos epidemiológicos em crianças britânicas nascidas na década de 1920. Este pesquisador identificou associações entre taxas de isquemia cardíaca e mortalidade devido à doença coronariana na vida adulta de filhos com baixo peso ao nascer e expostos à desnutrição durante a gestação (Barker *et al.*, 1993; Barker, 1997; 2007). Além desses estudos, a fome holandesa de 1944-1945 forneceu mais evidências apoiando a teoria DOHaD. Resumidamente, a Holanda sofreu embargo ao fornecimento de alimentos durante a Segunda Guerra Mundial. E, após a guerra, a disponibilidade de alimentos voltou ao normal (Ravelli *et al.*, 1976). Estes estudos descobriram que as crianças nascidas durante a fome apresentaram restrição do crescimento fetal, intolerância à glicose, obesidade, dislipidemia e risco elevado de desenvolver diabetes tipo 2 e doença arterial coronariana em relação às crianças nascidas após a fome (Ravelli *et al.*, 1976; Van Abeelen *et al.*, 2012).

Estudos mais recentes também apoiam a teoria DOHaD. Foi demonstrado em humanos (Modi *et al.*, 2011; Brumbaugh e Friedman, 2014), primatas não humanos (Mccurdy *et al.*, 2009; Puppala *et al.*, 2018) e roedores (Pereira *et al.*, 2015; Seet *et al.*, 2015; Wankhade *et al.*, 2017), que o consumo de dieta hiperlipídica materna durante o desenvolvimento fetal afeta a saúde em longo prazo da primeira geração de descendentes (F1) e predispõe a F1 ao desenvolvimento de NAFLD. De forma complementar, foi demonstrado em modelos animais de ratos que a dieta hiperlipídica materna durante a gestação e lactação resulta em obesidade, intolerância à glicose, dislipidemia e NAFLD no início da vida da prole F1, indicando que a dieta hiperlipídica materna tornou-se um fator de risco para anormalidades metabólicas na F1 (Dos Santos Perez *et al.*, 2015; Ohta *et al.*, 2017). Além disso, um recente estudo (Huang, Y. H. *et al.*, 2017) demonstrou que a exposição à dieta hiperlipídica durante a pré-gestação, a gestação e a lactação induziu aumento da massa corporal e intolerância à glicose em ratas da geração zero (G0), que foram transmitidos aos seus descendentes da segunda geração (F2), apesar da exposição à dieta hiperlipídica ter sido somente *in utero* e no aleitamento materno da F1, sugerindo que a dieta hiperlipídica materna pode resultar em anormalidades transgeracionais que persistem por várias gerações (Huang, Y. H. *et al.*, 2017).

Conforme revisado por Kereliuk e colaboradores (2017) (Kereliuk *et al.*, 2017), muitos estudos têm sido realizados a fim de desvendar os mecanismos envolvidos entre a má nutrição materna (pré e pós-natal) e o desenvolvimento de doenças metabólicas na vida das próximas gerações de descendentes. Evidências indicam que a nutrição materna induz alterações na programação da expressão gênica de principais vias metabólicas na prole (Ashino *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2014; Kim e Kwon, 2016; Huang, Y. *et al.*, 2017; Lomas-Soria *et al.*, 2018). Lomas-soria e colaboradores (2018) (Lomas-Soria *et al.*, 2018) demonstraram que a obesidade materna induzida pelo consumo de dieta hipercalórica desde o desmame até o início da idade adulta e durante a gestação e lactação alterou o programa da expressão de genes envolvidos no metabolismo hepático de glicose e lipídeos, incluindo as vias de sinalização da insulina, glicólise, gliconeogênese e do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR), levando a disfunção metabólica, resistência à insulina hepática e NAFLD na prole adulta F1 de ratos, apesar de ter sido alimentada com dieta controle após o desmame.

De forma complementar, Zheng e colaboradores (2014) e Huang e colaboradores (2017) (Zheng *et al.*, 2014; Huang, Y. *et al.*, 2017) relataram que a dieta hiperlipídica durante a pré-gestação e/ou gestação e lactação alterou o programa da expressão de genes envolvidos nas vias de síntese de ácidos graxos, β -oxidação de ácidos graxos e de sinalização do receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR α), levando a obesidade, intolerância à glicose, hipercolesterolemia e esteatose hepática na prole F1 recém-desmamada. Ashino e colaboradores (2012) (Ashino *et al.*, 2012) demonstraram que a dieta hiperlipídica durante a pré-gestação, gestação e lactação desregulou o metabolismo hepático de glicose e lipídeos, levando a resistência molecular à insulina, deposição ectópica de lipídeos no fígado e aumento da massa corporal na prole adulta F1, independente da dieta controle pós-natal. Kim e Kwon (2016) (Kim e Kwon, 2016) mostraram que o consumo materno de dieta hiperlipídica antes da gestação e durante a gestação e lactação alterou o programa da expressão de genes envolvidos no metabolismo hepático de colesterol, induzindo disfunção metabólica, incluindo estresse oxidativo no início da vida da prole F1. Esses dados da literatura, em conjunto, indicam que o consumo materno de dieta hiperlipídica antes e durante a gestação e a lactação pode desregular o metabolismo hepático de glicose, lipídeos e colesterol, levando a disfunção metabólica hepática e ao desenvolvimento de doenças metabólicas na prole F1. Esses estudos reforçam a importância da nutrição materna durante períodos críticos de desenvolvimento.

Até o momento, não há estudos na literatura que avaliaram o impacto da dieta hiperlipídica materna somente durante o acasalamento, gestação e lactação na prole F2. No entanto, estudo prévio de nosso laboratório (Barbosa, 2018) mostrou que progenitoras alimentadas com dieta hiperlipídica durante o acasalamento, gestação e lactação (G0-DH) apresentaram distúrbios característicos da síndrome metabólica, incluindo hiperglicemia de jejum, dislipidemia, aumento do índice de adiposidade e da pressão arterial, que foram transmitidos aos seus descendentes F1 e F2, apesar de terem sido alimentados com dieta controle desde o desmame até completarem 90 dias de idade. Além disso, as proles F1 e F2 também apresentaram aumento da ingesta da dieta, de água e calórica e dos níveis séricos de leptina, indicando que a dieta hiperlipídica materna da G0 induz anormalidades metabólicas transgeracionais que persistem até a idade adulta da F2, apesar da exposição à dieta hiperlipídica ter sido somente *in utero* e durante o aleitamento materno da F1.

1.4. Mecanismos moleculares envolvidos na transmissão transgeracional em resposta a dieta hiperlipídica materna

Até hoje, pouco se sabe sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na transmissão transgeracional de distúrbios metabólicos em resposta a exposição adversa durante períodos críticos do desenvolvimento. Evidências emergentes destacam o papel dos mecanismos epigenéticos na mediação desse fenômeno, que pode exibir transmissão transgeracional mesmo na ausência de exposição nas gerações futuras (Waterland, 2005; Zeisel, 2009; Kereliuk *et al.*, 2017; Lecoutre *et al.*, 2018).

A epigenética é definida como um fenômeno hereditário que afeta a expressão gênica sem alterar a sequência do ácido desoxirribonucleico (DNA) (Camióñ *et al.*, 2010; Christensen e Marsit, 2011). Os mecanismos epigenéticos regulam a expressão gênica e a sua desregulação resulta em várias doenças, incluindo câncer, distúrbios neurológicos e síndrome metabólica (Christensen *et al.*, 2009; Christensen e Marsit, 2011). Esses mecanismos incluem: metilação do DNA (predominantemente no carbono 5 da citosina); modificações de histonas (metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação e sumoilação); remodelamento da cromatina e mecanismos baseados no ácido ribonucleico (RNA) que incluem RNAs não codificantes (ncRNAs) (Kim *et al.*, 2009).

Originalmente identificadas como histona deacetilases de classe III (Kurylowicz, 2016), as sirtuínas são desacetilases dependentes de NAD^+ que regulam proteínas histonas em resíduos específicos de lisina, promovendo modificação pós-traducional, que resulta em silenciamento de cromatina e repressão transcricional (Haigis e Sinclair, 2010; Guarente, 2011). As proteínas não histonas também são alvos para desacetilação levando a modulação de suas atividades (Haigis e Sinclair, 2010; Guarente, 2011). A dependência das sirtuínas aos níveis celulares de NAD^+ liga a atividade da sirtuína ao metabolismo energético (Hershberger *et al.*, 2017). Quando os nutrientes são abundantes, o metabolismo celular depende principalmente da glicólise para produzir energia, levando a geração de ATP e conversão de NAD^+ em NADH. Baixos níveis de NAD^+ e altos níveis de NADH resultam na inativação da atividade enzimática de sirtuína (Chalkiadaki e Guarente, 2012).

Na reação de desacetilação, a enzima sirtuína hidrolisa NAD^+ em nicotinamida e ADP-ribose, em seguida, transfere o grupo acetil do substrato de proteína para o grupo 2'-OH do anel de ribose na molécula de ADP-ribose (Kelly, 2010). Os produtos finais

desta reação são nicotinamida, 2'-O-acetil-ADP-ribose e uma proteína desacetilada (figura 03).

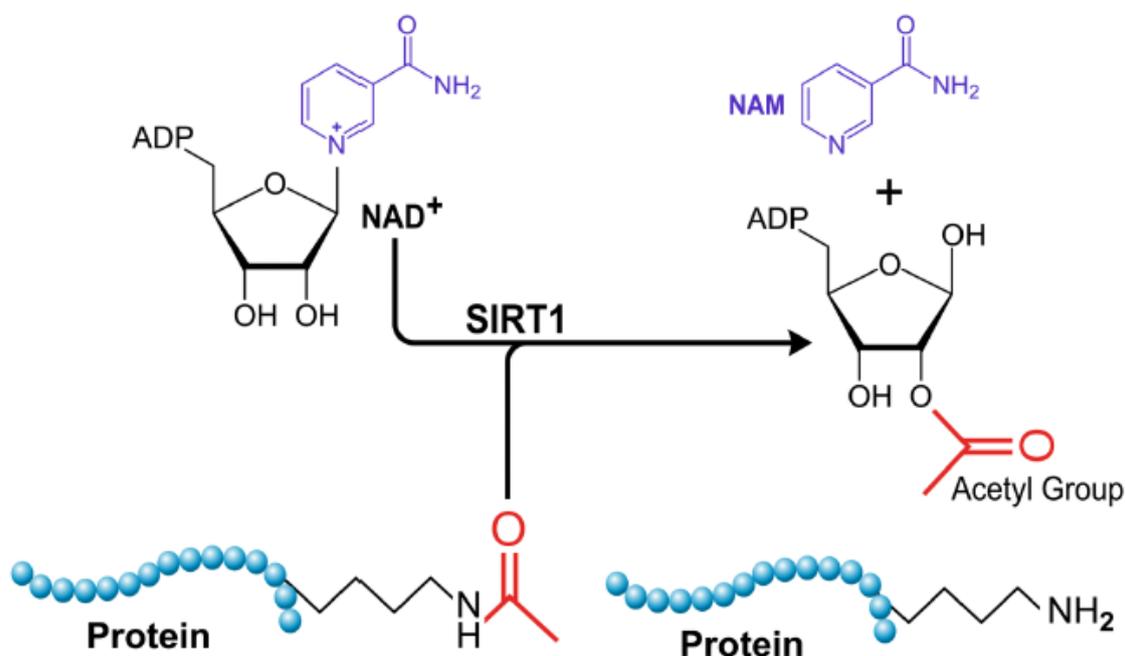


Figura 03: Reação de desacetilação pela sirtuína (no caso SIRT1). SIRT1 utiliza NAD^+ como um co-substrato para clivar grupos acetil de proteínas alvo (Schug e Li, 2011).

As sirtuínas regulam uma ampla variedade de processos celulares, como metabolismo, homeostase mitocondrial, estresse oxidativo, inflamação, autofagia e apoptose (Guarente, 2011). As sirtuínas também desempenham importantes papéis no envelhecimento e doenças relacionadas ao envelhecimento, como obesidade, diabetes tipo 2, doença cardiovascular, câncer e doenças neurodegenerativas (Herskovits e Guarente, 2013; Morris, 2013). Em mamíferos, foram identificados sete genes *Sirt* que codificam sete enzimas sirtuínas (SIRT-1-7) distintas que se diferenciam quanto à estrutura, localização celular e função. SIRT1, SIRT6 e SIRT7 estão predominantemente localizadas no núcleo, enquanto a SIRT2 está localizada no citoplasma. SIRT3, SIRT4 e SIRT5 estão localizadas nas mitocôndrias (Morigi *et al.*, 2018).

A SIRT1 é a sirtuína mais amplamente estudada, referida como “*Master Metabolic Regulator*” devido a sua capacidade de modular vários fatores de transcrição envolvidos na homeostase energética (Schug e Li, 2011). Por exemplo, o PGC-1 α , um coativador do PPAR α (fator de transcrição chave para a β -oxidação de ácidos graxos), é

um substrato da SIRT1, e a desacetilação pela SIRT1 leva à sua ativação, e a subsequente indução da β -oxidação hepática (You *et al.*, 2015; Ding *et al.*, 2017). A deleção hepática de SIRT1 em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica resulta em acúmulo hepático de lipídeos e no desenvolvimento de esteatose hepática (Purushotham *et al.*, 2009). Por outro lado, camundongos transgênicos que superexpressam a SIRT1 são protegidos da esteatose hepática induzida pela dieta hiperlipídica (Pfluger *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014). Além disso, a SIRT1 desacetila e inibe a atividade do SREBP-1c no fígado (Ponugoti *et al.*, 2010). Portanto, a SIRT1 hepática promove a oxidação de ácidos graxos e inibe a síntese de ácidos graxos.

A SIRT2 exerce papel na homeostase metabólica pela desacetilação da PEPCK, que previne sua degradação dependente de ubiquitilação (Jiang *et al.*, 2011). A SIRT3, principal desacetilase mitocondrial, tem como alvos: acil CoA desidrogenase de cadeia longa (LCAD), 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintase 2, isocitrato desidrogenase 2 e glutamato desidrogenase, que funcionam em conjunto para promover a produção de energia na célula. Além disso, a SIRT3 protege a célula de espécies reativas de oxigênio (ROS) ativando a superóxido dismutase 2 (SOD2) (Houtkooper *et al.*, 2012). A SIRT4 e SIRT5 desempenham atividades opostas a SIRT1 e SIRT3. A SIRT4 reprime o PPAR α para inibir a β -oxidação de ácidos graxos, e também reprime a malonil-CoA descarboxilase 1 para promover a síntese lipídica (Laurent *et al.*, 2013). A depleção de SIRT4 previne a esteatose hepática induzida pela dieta hiperlipídica (Nasrin *et al.*, 2010). A SIRT5 reprime a atividade da HADH resultando em inibição da β -oxidação de ácidos graxos (Park *et al.*, 2013).

Foi demonstrado que a SIRT6 regula negativamente a fosforilação da AKT através da inibição do INSR, IRS-1 e IRS-2, o que conseqüentemente leva à inibição da sinalização da AKT dependente de insulina, indicando que a SIRT6 está envolvida na resistência à insulina (Xiao *et al.*, 2010). A atividade enzimática da SIRT7 e o seu papel funcional no metabolismo são pouco elucidados até o momento. No entanto, prévio estudo da literatura relata que a deleção hepática de SIRT7 em camundongos previne o desenvolvimento de NAFLD induzida por dieta hiperlipídica, indicando que a SIRT7 também controla o metabolismo de lipídeos (Yoshizawa *et al.*, 2014). Em resumo, enquanto algumas sirtuínas promovem a β -oxidação (SIRT1 e SIRT3), outros membros da família de sirtuínas estimulam a lipogênese e inibem a β -oxidação (SIRT4, SIRT5 e SIRT7). Nesse sentido, as sirtuínas representam alvos potenciais para o tratamento de

doenças metabólicas, como obesidade e NAFLD devido ao papel que desempenham nas vias metabólicas (Kurylowicz, 2016).

Estudos também demonstraram o envolvimento das sirtuínas na transmissão transgeracional de distúrbios metabólicos em resposta a má nutrição durante períodos críticos do desenvolvimento (Borengasser *et al.*, 2011; Bruce *et al.*, 2016). Bruce e colaboradores (2016) (Bruce *et al.*, 2016) descreveram que o consumo de dieta hiperlipídica materna alterou o programa hepático da expressão gênica de SIRT1 e SIRT3 e de genes envolvidos no metabolismo lipídico, resultando em NASH no início da vida da prole F1. De forma similar, Borengasser e colaboradores (2011) (Borengasser *et al.*, 2011) relataram que a obesidade materna induzida por dieta hipercalórica alterou o programa hepático da expressão gênica e proteica de SIRT3 e da expressão proteica do seu alvo LCAD, envolvido na β -oxidação, levando ao desenvolvimento de NAFLD no início da vida da prole F1. Até o momento não há relatos na literatura sobre o efeito da dieta hiperlipídica materna na expressão hepática das sete sirtuínas na prole F2. Em adição, ainda não é compreendido, se a dieta hiperlipídica materna pode modular o metabolismo hepático de glicose, lipídeos e colesterol na vida adulta da prole F2.

Dessa forma, baseado nos achados da literatura, que a dieta hiperlipídica materna induziu disfunção metabólica hepática na prole F1, no estudo prévio de nosso laboratório, que a dieta hiperlipídica materna induziu distúrbios metabólicos na G0 que foram transmitidos à F2, bem como no papel desempenhado pelas sirtuínas na regulação do metabolismo energético, a nossa hipótese é que o consumo de dieta hiperlipídica somente durante o acasalamento, a gestação e a lactação desregula o metabolismo hepático da G0, induzindo distúrbios metabólicos que persistem até a vida adulta da F2. Nós também hipotetizamos que as sirtuínas estão envolvidas nos mecanismos transgeracionais que levam à desregulação metabólica hepática na prole F2. Nossos achados fornecerão importantes informações sobre os efeitos da má nutrição materna no metabolismo hepático da prole F2.

2. JUSTIFICATIVA

Estudos transgeracionais em humanos são limitados em sua capacidade de avaliar a contribuição da dieta materna ao fenótipo da prole, devido à dificuldade em separar os efeitos da exposição pré-natal de influências ambientais ao longo das gerações. Portanto, modelos experimentais de roedores com condições dietéticas e ambientais cuidadosamente controladas são úteis para examinar como a nutrição materna durante períodos críticos de desenvolvimento influencia o surgimento de fenótipos, como obesidade, resistência à insulina, doença cardiovascular e NAFLD na prole. Além disso, o longo período de tempo entre a exposição adversa *in utero* e o desenvolvimento de distúrbios metabólicos nas gerações futuras tem incentivado o desenvolvimento de vários modelos animais.

No entanto, a maioria dos estudos tem utilizado modelo de alimentação em longo prazo, onde, a dieta hiperlipídica materna é fornecida semanas antes da gestação até a idade adulta da prole F1 e/ou F2. Como consequência, a má nutrição antes dos períodos críticos de desenvolvimento e durante a vida da prole F1 pode interferir nos distúrbios metabólicos da prole. Neste sentido, foi desenvolvido em nosso laboratório um novo protocolo animal, no qual a exposição à dieta hiperlipídica materna limitou-se aos períodos de acasalamento, gestação e lactação (59 dias) das progenitoras G0. Ambas as proles F1 e F2 receberam dieta controle após o desmame até completarem 90 dias de idade. Dessa forma, os distúrbios metabólicos na prole F2-DH podem ser atribuídos ao efeito da dieta hiperlipídica materna da G0. Através do nosso protocolo animal, foi demonstrado que a dieta hiperlipídica materna da G0 induziu distúrbios característicos da síndrome metabólica nas proles F1 e F2, independente da nutrição pós-natal. Entretanto, como a dieta hiperlipídica materna da G0 desencadeou o desenvolvimento de distúrbios metabólicos na prole adulta F2 ainda precisa ser esclarecido. Nossos achados podem fornecer evidências para uma dieta materna saudável, a fim de reduzir o risco de doenças metabólicas na vida da prole.

A dieta hiperlipídica utilizada no presente estudo foi escolhida por ter sido a intervenção nutricional mais eficaz na indução da síndrome metabólica em ratos, conforme descrito por estudo prévio de nosso laboratório (De Castro *et al.*, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar se a dieta hiperlipídica materna da G0 desregula o metabolismo hepático da prole F2.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar em progenitoras G0 e nas proles F2, se a dieta hiperlipídica materna:

- 1) Induz intolerância à glicose, resistência à insulina, deslipidemia, esteatose hepática não alcoólica e estresse oxidativo;
- 2) Altera a expressão de genes (*Insr*, *Irs1* e *Akt2*) da via de sinalização da insulina hepática;
- 3) Altera a expressão de genes envolvidos no metabolismo hepático de glicose (*Fbp1* e *Gp*), lipídeos (*Srebp1c* e *Hadh*) e colesterol (*Hmgcr* e *Ldlr*);
- 4) Altera a expressão de sirtuínas (*Sirt-1-7*) envolvidas na regulação do metabolismo hepático de glicose e lipídeos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as Diretrizes de Ética em Cuidados de Animais Experimentais. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), sob o protocolo nº 2016/49 (anexo I). Ratos (290g \pm 10; n= 20) e ratas (220g \pm 10; n=20) Fisher, com 90 dias de idade, foram obtidos do Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP para o acasalamento e a geração das proles F1 e F2. No presente estudo foi utilizada somente a prole F2 de machos com 90 dias de idade. Todos os animais foram alojados em gaiolas individuais sob condições de luz (ciclo claro-escuro 12h – 12h) e temperatura (24,0 \pm 2,0 °C) controladas, com água e dietas fornecidas *ad libitum*. As progenitoras G0 e a prole F2 foram mantidas na sala de experimentação do CCA-UFOP por um período de 152 dias e 90 dias, respectivamente.

4.2. Dietas

As progenitoras G0 com 90 dias de idade foram alimentadas durante acasalamento (10 dias), gestação (28 dias) e lactação (21 dias), total de 59 dias, com a dieta controle (Nuvilab CR1, Colombo, Brasil) ou com a dieta hiperlipídica (De Castro *et al.*, 2013). Já, as genitoras da primeira geração (G1) com 90 dias de idade foram alimentadas durante acasalamento (10 dias), gestação (28 dias) e lactação (21 dias), total de 59 dias, somente com a dieta controle. As proles F1 e F2 também foram alimentadas somente com a dieta controle por um período de 90 dias. A dieta controle Nuvilab (DC) era composta de 45,5% de carboidratos, 22,0% de proteínas e 4,0% de lipídeos, apresentando um total de 3,06 kcal por 1 grama de dieta. A dieta hiperlipídica (DH) era constituída por 39,53% de lipídeos (37% de banha de porco), 20,68% de carboidratos e 20,26% de proteínas, apresentando um total de 5,19 kcal por 1 grama de dieta. A dieta controle foi proveniente do CCA-UFOP e a dieta hiperlipídica foi adquirida de *Domeneghetti & Corrêa Ltda* (Jaú, São Paulo, Brasil). A composição nutricional das dietas está descrito na tabela I abaixo:

Tabela I – Composição nutricional (g/Kg) e conteúdo energético da dieta controle (DC) e hiperlipídica (DH).

Dieta Controle (DC)		Dieta Hiperlipídica (DH)	
Composição	(g/kg)	Composição	(g/kg)
Umidade	125,0	Frutose	33,0
Proteínas	220,0	Caseína	180,5
Carboidratos	455,0	Leite condensado	316,0
Lipídeos	40,0	Banha de porco	370,0
Mix mineral	90,0	Fibra (celulose)	50,0
Fibra bruta	70,0	Mix de minerais	35,0
		Mix de vitaminas	10,0
		DL-Metionina	3,0
		Cloridrato de colina	2,5
Macronutrientes	(% por peso)	Macronutrientes	(% por peso)
Carboidratos	45,5	Carboidratos	20,68
Proteínas	22,0	Proteínas	20,26
Lipídeos	4,0	Lipídeos	39,53
Macronutrientes	(% kcal)	Macronutrientes	(% kcal)
Carboidratos	59,48	Carboidratos	15,92
Proteínas	28,76	Proteínas	15,60
Lipídeos	11,76	Lipídeos	68,48
Kcal/g	3,06	Kcal/g	5,19

A porcentagem de Kcal foi calculada com base nas calorias fornecidas por cada macronutriente (4 kcal/1g de carboidrato, 4 Kcal/1g de proteína e 9 Kcal/1g de lipídeo) em relação ao total calórico (100g de dieta).

4.3. Protocolo Experimental

Antes do acasalamento, fêmeas e machos, recém-desmamados, foram separados por sexo em gaiolas coletivas (4 a 5 animais por gaiola) e receberam dieta controle e água *ad libitum*. Para o acasalamento da G0, uma fêmea e um macho, com 90 dias de idade, virgens, não consanguíneos, foram aleatoriamente alojados em gaiola plástica e alimentados com dieta controle ou hiperlipídica *ad libitum* por 10 dias. Após este tempo, os machos foram retirados das gaiolas e as fêmeas (progenitoras G0) continuaram sendo alimentadas com dieta controle (grupo G0-DC) ou hiperlipídica (grupo G0-DH) durante a gestação (28 dias) e a lactação (21 dias) por um período total de 59 dias.

As proles F1 foram divididas em dois grupos de acordo com alimentação materna: prole F1 de progenitoras G0 alimentadas com dieta controle (grupo F1-DC) e prole F1 de progenitoras G0 alimentadas com dieta hiperlipídica (grupo F1-DH). No primeiro dia após o nascimento, as ninhadas de ambos os grupos (F1-DC e F1-DH) foram ajustadas para oito filhotes por genitora a fim de garantir um crescimento homogêneo. Após 21 dias de amamentação, os filhotes foram separados por sexo em gaiolas coletivas (4 a 5 animais por gaiola) e alimentados somente com dieta controle por mais 69 dias. Após este período, uma parte da prole F1 de machos e fêmeas foi eutanasiada e a outra parte foi utilizada para acasalamento e geração da prole F2.

O acasalamento foi realizado alojando uma fêmea com um macho, ambos da geração F1, não consanguíneos, com 90 dias de idade, em gaiola individual por 10 dias. Os genitores e genitoras G1 continuaram recebendo a dieta controle e foram divididos em dois grupos de acordo com alimentação materna: machos e fêmeas de progenitoras G0 alimentadas com dieta controle (grupo G1-DC) e machos e fêmeas de progenitoras G0 alimentadas com dieta hiperlipídica (grupo G1-DH). Após o período de acasalamento, os machos foram retirados e as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais e permaneceram recebendo a dieta controle durante a gestação (28 dias) e a lactação (21 dias) por um período total de 59 dias.

No primeiro dia após o nascimento, as ninhadas foram ajustadas para oito filhotes por mãe a fim de garantir um crescimento homogêneo. Após o desmame, os filhotes foram separados por sexo em gaiolas coletivas (4 a 5 animais por gaiola) e divididos em dois grupos de acordo com alimentação materna da G0: prole F2 de progenitoras G0 alimentadas com dieta controle (grupo F2-DC) e prole F2 de

progenitoras G0 alimentadas com dieta hiperlipídica (grupo F2-DH). As proles F2 receberam dieta controle até completarem 90 dias de idade. Ao término do protocolo experimental de cada geração (G0, F1 e F2), os animais foram eutanasiados e amostras de: sangue, rins, fígado, coração, pâncreas, suprarrenais e depósitos de gordura (inguinal, retroperitoneal, epididimal e marrom) foram coletados para subsequentes análises. O delineamento experimental é esquematicamente representado a seguir (figura 04):

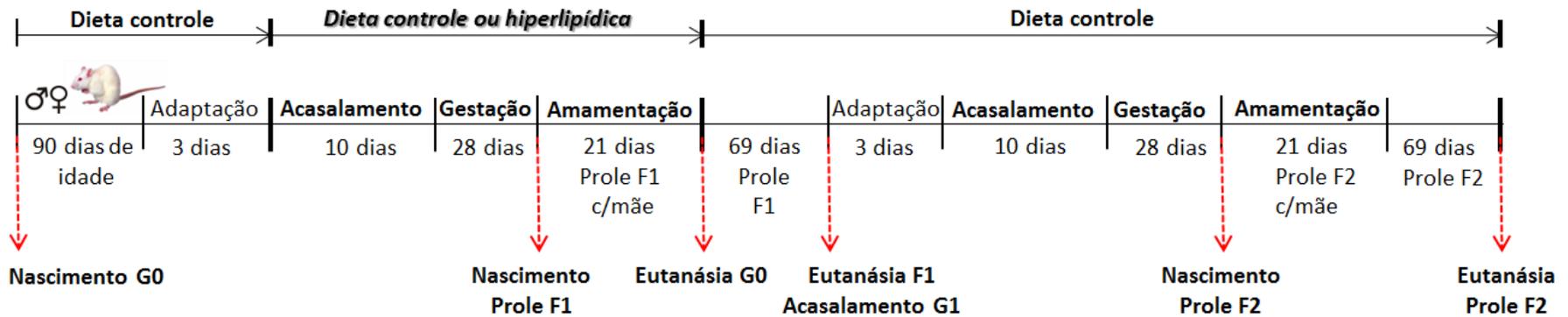


Figura 04: Delineamento experimental utilizado para obtenção das progenitoras G0 e das proles F1 e F2. A dieta hiperlipídica foi oferecida somente as progenitoras G0 durante o acasalamento, a gestação e a lactação. Ambas as proles F1 e F2 receberam dieta controle após o desmame até completarem 90 dias de idade.

O protocolo experimental explicitado anteriormente foi realizado por (Barbosa, 2018). No presente estudo, foram utilizadas amostras de sangue e do tecido hepático dos quatro grupos experimentais:

1. **G0-DC:** progenitoras G0 alimentadas com dieta controle durante acasalamento (10 dias), gestação (28 dias) e amamentação (21 dias), por um período total de 59 dias; n= 4.
2. **G0-DH:** progenitoras G0 alimentadas com dieta hiperlipídica durante acasalamento (10 dias), gestação (28 dias) e amamentação (21 dias), por um período total de 59 dias; n= 4 a 5.
3. **F2-DC:** prole de machos F2 de progenitoras G0 alimentadas com dieta controle durante acasalamento (10 dias), gestação (28 dias) e amamentação (21 dias), por um período total de 59 dias; n= 4 a 8.
4. **F2-DH:** prole de machos F2 de progenitoras G0 alimentadas com dieta hiperlipídica durante acasalamento (10 dias), gestação (28 dias) e amamentação (21 dias), por um período total de 59 dias; n= 4 a 8.

4.4. Descrição dos Procedimentos Experimentais

4.4.1. Avaliação da Massa Relativa do Fígado

Ao final do protocolo experimental, as progenitoras G0 e as proles F2 foram pesadas, eutanasiadas e seus fígados coletados, dissecados, pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para posteriores análises. A massa relativa do fígado foi utilizada para avaliar hepatomegalia e foi calculada pela fórmula: [massa absoluta do fígado (g) / 100g de massa corporal do rato (g)]. Pequenos fragmentos de fígado (cerca de 2 mm) foram coletados em cassetes histológicos e armazenados em solução de formol tamponado a 4% para posterior processamento e confecções de lâminas histológicas.

4.4.2. Análises Bioquímicas

Amostras de sangue (2 a 3 mL) de progenitoras G0 e proles F2 foram coletadas após jejum noturno e ao término de ambas as gerações. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas (4000 rpm; 4°C; 6 minutos) para a separação do plasma (sangue coletado com heparina) para dosagens de glicose de jejum, insulina, colesterol total, triglicérides e das transaminases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). O plasma foi aliquoteado, guardado a -80°C e utilizado posteriormente para a realização das análises bioquímicas, que foram feitas manualmente a partir de kits comerciais (Labtest, Lagoa Santa – MG, Brasil) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

4.4.3. Dosagem da Insulina por ELISA

Os níveis de insulina foram determinados pelo método de imunoenensaio do tipo Elisa sanduíche a partir do *Rat/Mouse Insulin Elisa Kit* (Millipore – EUA), conforme recomendações do fabricante. O princípio desta dosagem se baseia na captura da insulina presente no soro por anticorpos monoclonais de insulina de rato. A concentração de insulina foi determinada a partir dos valores de absorbância obtidos em leitor de microplacas (Epoch, Biotek, EUA) no comprimento de onda de 450 nm e foi calculada através da equação obtida pela curva padrão de função logarítmica representada pelo gráfico das concentrações dos padrões de insulina. As análises foram realizadas pelo *software SoftMax PRO* e os dados foram expressos em mU/L.

4.4.4. Cálculo HOMA IR e HOMA β

No presente estudo, o modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina (HOMA-IR) e o modelo de avaliação da homeostase da capacidade funcional das células β (HOMA- β), ambos variáveis que estimam a resistência à insulina, foram calculados a partir das seguintes fórmulas: [HOMA-IR = (IJ x GJ) / 22,5] e [HOMA- β = (20 x IJ) / (GJ - 3,5)]; onde: IJ = insulinemia de jejum em mU/L e GJ = glicemia de jejum em mmol/L (Matthews *et al.*, 1985).

4.4.5. Glicemia de Jejum e Teste de Tolerância Oral à Glicose

72 horas antes das eutanásias de cada geração estudada, foi realizado o teste de tolerância oral à glicose (TTOG) a partir da coleta de gotas de sangue da veia caudal do animal. Os grupos (G0-DC n=4; G0-DH n=4; F2-DC n=6 e F2-DH n=7) foram

submetidos ao jejum noturno de 8 horas. No dia seguinte, foi administrado aos animais acordados, via gavagem, uma solução de glicose 40%, na dosagem de 2g de glicose / kg de massa corporal do rato. As gotas de sangue foram retiradas da cauda dos animais antes e nos tempos 10, 20, 30 e 90 minutos após administração oral da solução de glicose, de acordo com Song e colaboradores (2004) (Song *et al.*, 2004). Os valores de glicose foram obtidos a partir da colocação da gota de sangue da cauda dos animais em fitas do glicosímetro do tipo Accu-chek active. Os dados foram analisados como a área sob a curva (AUC).

4.4.6. Análises Histopatológicas

Para análise histopatológica, fragmentos de fígado foram fixados em solução de formol tamponado a 4%. Após a fixação, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (70% a 100%), diafanizados em xilol, embebidos e incluídos em parafina, conforme métodos histológicos de rotina. Cortes histológicos de 5 µm de espessura foram obtidos por microtomia e então corados com hematoxilina e eosina. Por microscopia ótica, as lâminas histológicas foram visualizadas pela objetiva de 40x e 30 imagens aleatórias (campos) por lâmina (por animal) foram digitalizadas através da microcâmera *Leica DFC340FX* acoplada ao microscópio *Leica DM5000B*. Os procedimentos descritos acima foram realizados no Laboratório Multiusuários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da UFOP.

A presença de esteatose foi avaliada qualitativamente como descrito por (Brunt *et al.*, 1999). Foram digitalizadas 30 imagens aleatórias de cada lâmina histológica. As fotomicrografias foram então divididas em 10 quadrantes, e a esteatose foi quantificada como presente (valor 1) ou ausente (valor 0) em cada quadrante. Os resultados foram apresentados como *score* de 0-3 com base na mediana das fotomicrografias analisadas: *score* 0 = ausente (mediana no valor: 0); *score* 1 = discreto (mediana no valor: 1, 2 e 3); *score* 2 = moderado (mediana no valor: 4, 5, e 6) e *score* 3 = intenso (mediana no valor: 7, 8, 9 e 10).

4.4.7. Extração e Quantificação de Lipídeos Hepáticos

A extração de lipídeos hepáticos foi feita a partir de solução de clorofórmio-metanol (2:1), segundo protocolo adaptado de (Folch *et al.*, 1957). Cerca de 100 mg de fígado foram homogeneizados em 1900 µL de clorofórmio-metanol (2:1) com o auxílio de um politron (Homogeneizador Ultra 80). Após homogeneização vigorosa por 3

minutos em vórtex, o homogenato foi transferido para tubo de ensaio cônico, seguido pela adição de 400 µL de metanol. Todas as amostras ficaram em repouso com leves agitações por 30 a 60 minutos. Após centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo cônico (pesado previamente) e foi adicionado 800 µL de clorofórmio e 640 µL de solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,73%, seguido de homogeneização vigorosa por 1 minuto em vórtex. Após centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos e completa separação de fases, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e a parede interna do tubo lavada com 600 µL de solução de Folch (3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água destilada e 2% de NaCl a 0,29%). Todos os tubos foram delicadamente lavados por três vezes e deixados em estufa semiaberta a 40° C até completa evaporação do solvente. Após a pesagem dos tubos com resíduos secos, o conteúdo lipídico presente no fundo dos tubos foi ressuspendido em 500 µL de isopropanol e armazenado a -80 °C para posteriores dosagens de colesterol total e triglicerídeos hepáticos.

A quantidade de lipídeos extraídos foi calculada em porcentagem conforme a fórmula: lipídeos (%) = [massa final do tubo (g) - massa inicial do tubo (g)] x 100 / massa do tecido (g). O teor de colesterol total e triglicerídeos hepáticos foi quantificado manualmente por meio de kits comerciais (Labtest, Lagoa Santa – MG, Brasil) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

4.4.8. Determinação da Defesa Antioxidante e de Biomarcadores de Estresse Oxidativo no Fígado

4.4.8.1. ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi mensurada pelo ensaio colorimétrico descrito por (Madesh e Balasubramanian, 1998). Este ensaio determina a atividade da SOD tecidual de forma indireta através da capacidade dessa enzima em converter o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), produto gerado pela auto-oxidação de pirogalol, a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e conseqüentemente em inibir a geração de formazan através da inibição da reação de redução dependente de $O_2^{\cdot-}$ do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) a formazan (medido por espectrofotometria em 570 nm e correlacionado inversamente com a atividade da SOD tecidual).

Para a realização da dosagem, cerca de 100 mg de tecido foram homogeneizados em 1000 µL de tampão fosfato pH 7,5 (0,1M) com o auxílio de um politron

(Homogeneizador Ultra 80) em *eppendorfs* de 2 mL. Após centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e transferido para *eppendorfs* de 1,5 mL. Em seguida, foi realizada a diluição da amostra 20x (1,5 µL de amostra mais 28,5 µL de tampão fosfato). Em placa de 96 poços, foram adicionados 30 µL da amostra diluída 20x, mais 99 µL de tampão fosfato, 6 µL de MTT (1,25 mM) e 15 µL de pirogalol (1000 µM). Para o branco, foram adicionados 144 µL de tampão e 6 µL de MTT (1,25 mM). Para o padrão, foram adicionados 129 µL de tampão, 6 µL de MTT (1,25 mM) e 15 µL de pirogalol (1000 µM). Posteriormente, a placa foi incubada em estufa a 37 °C por 5 minutos, seguido pela adição de 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para parar a reação. Os valores de absorbância foram determinados em leitor de microplacas (Epoch, Biotek, EUA) no comprimento de onda de 570 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da formação do formazan. A atividade da SOD foi expressa em unidades de enzima por mg de proteínas (U/mg de proteína) e foi calculada pela seguinte fórmula: atividade SOD (U/mg de proteína) = (absorbância da amostra – absorbância do branco) / (absorbância padrão - absorbância branco) * o fator de diluição / concentração de proteínas.

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). O ensaio foi realizado em placa de ELISA de 96 poços, em um volume final de 200 µL para cada poço da placa. Nos poços referentes às amostras, foram adicionados 10 µL de amostra diluída 50x mais 190 µL de Reagente de Bradford (1:4) (*Dye Reagent Concentrate – Bio-Rad Protein Assay*). Foram utilizadas cinco concentrações diferentes de solução padrão para a construção da curva padrão. As soluções-padrão foram preparadas a partir de uma solução padrão estoque de 1 mg/mL de albumina de soro bovino (BSA). Nos poços referentes à curva padrão, foram adicionados 10 µL de cada solução padrão mais 190 µL de Reagente de Bradford. Nos poços referentes ao branco, foram adicionados 10 µL de água Milli-Q mais 190 µL de Reagente de Bradford. Em seguida, a placa foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Os valores de absorbância foram determinados em leitor de microplacas (Epoch – Biotek – EUA) no comprimento de onda de 595 nm. Posteriormente, foi realizada a regressão linear das concentrações dos padrões (eixo Y) *versus* as absorbâncias dos padrões (eixo X). A concentração proteica de cada amostra foi calculada através da equação da reta ($y = ax + b$) obtida pela curva padrão e foi expressa em mg/mL.

4.4.8.2. PROTEÍNA CARBONILADA

O conteúdo de proteína carbonilada foi determinado de acordo com o método proposto por (Levine *et al.*, 1990). O ensaio consiste na reação de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) com grupos carbonila e a subsequente geração do derivado hidrazona, que pode ser analisado espectrofotometricamente, conforme descrito por (Levine *et al.*, 1994).

Cerca de 200 mg de tecido foram homogeneizados em 1000 μ L de tampão fosfato pH 6,7 (50 mM) com o auxílio de um politron (Homogeneizador Ultra 80) em *ependorfs* de 2 mL. Após centrifugação a 10000 xg por 10 minutos a 4 °C, 400 μ L de sobrenadante foram transferidos para dois tubos previamente nomeados de A (amostra) e C (controle). Para a precipitação de proteínas, foram adicionados 400 μ l de ácido tricloroacético (TCA) a 10% em cada tubo. Após homogeneização em vórtex e centrifugação a 5000 xg por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e 500 μ l de DNPH (solução 0,1% em HCl 2M) foram adicionados ao tubo A e 500 μ l de ácido clorídrico (HCl) (2 M) ao tubo C. Ambos foram mantidos no escuro à temperatura ambiente por 30 minutos, e a cada 15 minutos foram homogeneizados no vórtex. Após o período de 30 minutos, foram adicionados 500 μ l de TCA a 10% em cada tubo, seguido de agitação no vórtex e centrifugação a 5000 xg por 10 minutos a 4 °C. Em seguida, descartou-se o sobrenadante dos tubos A e C e o precipitado de ambos os tubos foi lavado com 1 mL de solução de etanol/ acetato de etila (1:1), seguido de agitação no vórtex e centrifugação a 5000 xg por 10 minutos a 4 °C. Este procedimento de lavagem foi repetido por mais uma vez. Logo após, foi adicionado 1 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 6% em ambos os tubos, seguido de agitação no vórtex e centrifugação a 1000 xg por 10 minutos a 4 °C. Após o sobrenadante ter sido cuidadosamente transferido para uma cubeta, os valores de absorvância foram quantificados em espectrofotômetro no comprimento de onda de 370 nm. Como branco foi utilizada a solução de SDS.

Para o cálculo da concentração de proteína carbonilada foi utilizado à equação de Lambert Berr: $A = b \cdot c \cdot \epsilon$, onde **A** é a subtração da absorvância do tubo A pela absorvância do tubo C, **b** é o caminho óptico, **c** é a concentração em nmol/mL e ϵ é o coeficiente de extinção molar que corresponde a 22000 $M^{-1}cm^{-1}$. O conteúdo de proteína carbonilada foi expresso em relação à concentração de proteínas totais, que foi

determinada pelo kit comercial de BCA (*QuantiPro™ BCA Assay Kit* – Sigma-Aldrich) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

4.4.8.3. SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinados pelo ensaio descrito por (Buege e Aust, 1978). Este método baseia-se na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em se ligar a lipídeos oxidados.

Para a construção da curva padrão de 1,1,3,3-tetrametoxipropano foi preparada uma solução estoque de 500 mol/L de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Aldrich Chemistry). Esta solução foi diluída em série para a obtenção de soluções-padrão com diferentes concentrações finais (50 mol/L; 25 mol/L; 12,5 mol/L; 6,25 mol/L; 3,125 mol/L; 1,562 mol/L; 0,781 mol/L e 0,39 mol/L). Foi utilizado 250 µL de cada solução-padrão. Para análise das amostras, cerca de 100 mg de tecido foram homogeneizados em 1000 µL de tampão Tris-HCl pH 7,4 (20 mM) com o auxílio de um politron (Homogeneizador Ultra 80) em *eppendorfs* de 2 mL. Após centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos a 4 °C, 250 µL de sobrenadante foram transferidos para *eppendorfs* de 1,5 mL e foram adicionados 125 µL de TCA (28% p/v em HCl 0,25 N), 125 µL de TBA (1% em ácido acético 0,25 M) e 62,5 µL de butilhidroxitolueno (BHT) (5 mM em etanol) em cada *eppendorf*, incluindo os da curva padrão. Após agitação em vórtex, todas as amostras foram incubadas por 15 minutos a 95 °C e 5 minutos no gelo, seguido de centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Em seguida, 200 µL do sobrenadante foram transferidos para placa de 96 poços e os valores de absorbância foram determinados em leitor de microplacas (Epoch, Biotek, EUA) no comprimento de onda de 535 nm. Foi utilizada água destilada como branco.

Após a leitura da absorbância, foi realizada a regressão linear das concentrações dos padrões (eixo Y) *versus* as absorbâncias dos padrões (eixo X). Os níveis de TBARS de cada amostra foram calculados através da equação da reta ($y = ax + b$) obtida pela curva padrão e foram expressos em relação à concentração de proteínas totais (mmol/mg de proteína). A concentração de proteínas totais foi determinada pelo kit comercial de BCA (*Pierce™ BCA Protein Assay Kit* – Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

4.4.9. Expressão de mRNAs por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)

4.4.9.1. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

A extração de RNA total do fígado foi realizada conforme o protocolo do kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega). Cerca de 20 mg de tecido foram homogeneizados em 1 mL de trizol® *Reagent* (Invitrogen) com auxílio de um homogeneizador tipo Politron (Homogeneizador Ultra 80) em 3 pulsos de 30 segundos com intervalo de 1 minuto no gelo. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, 400 µl de clorofórmio (Sigma-Aldrich) foram adicionados em cada amostra e a mistura foi homogeneizada vigorosamente por 1 minuto em vórtex, seguido de incubação por 25 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação a 12000 *xg* por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e homogeneizado com 600 µl de etanol 95% (Sigma-Aldrich) por inversão do tubo. Logo após, o conteúdo dos tubos foi transferido para a coluna de retenção de ácidos nucleicos proveniente do kit. Em seguida, o RNA foi purificado conforme instruções do fabricante e quantificado por meio de espectrofotometria no aparelho *NanoDrop Lite* (Thermo Scientific). A relação 260/280 nm foi avaliada como indicativo da pureza da amostra. As razões acima de 1,8 foram aceitas como adequadas para quantificação da expressão gênica. O RNA total purificado foi mantido a -80°C até o uso.

A integridade do RNA total extraído foi avaliada em gel de agarose a 1,2% (figura 05). Nos géis foi analisado a intensidade luminosa das bandas do RNA ribossomal 28s e 18s e a ausência de arraste (degradação).

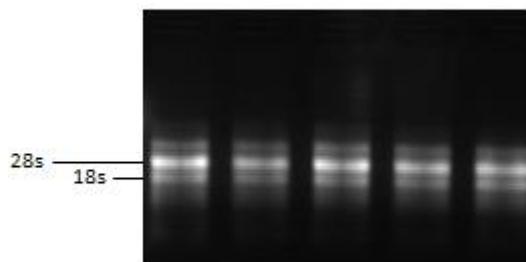


Figura 05: Gel de agarose a 1,2% representativo da qualidade do RNA total extraído do fígado de progenitoras G0 e das proles F2.

4.4.9.2. SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

A primeira fita do cDNA foi sintetizada a partir de 1 µg de RNA total extraído através do kit *High Capacity RT-PCR System* (Applied Biosystems), seguindo a recomendação do fabricante. Para cada 1 µg de RNA total foram utilizados 2 µL de tampão (*10x RT Buffer*), 2 µL de *primers* randômicos (*10x RT Random Primer*), 0,8 µL de dNTPs (*25x dNTP Mix*), 1 µL de transcriptase reversa (*MultiScribe Reverse Transcriptase*) e água livre de RNase para um volume final de 20 µL. A mistura foi incubada em um termociclador (*Biocycler, version 3.2*) por 10 minutos a 25°C, seguido por 120 minutos a 37°C, 5 minutos a 85°C e 4°C por tempo indeterminado. As amostras de cDNA foram dosadas em espectrofotômetro (*NanoDrop Lite – Thermo Scientific*) e armazenadas a -80°C até o uso.

4.4.9.3. QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR QRT-PCR

Para análise da expressão dos genes em estudo foi utilizada a técnica de qRT-PCR. As reações foram realizadas pelo kit *SYBR[®] Select Master Mix* (Applied Biosystems) em placas de 96 poços (*MicroAmp[®] Optical 96 Well Reaction Plate*-Applied Biosystems) que foram seladas com adesivo óptico (*MicroAmp[®] Optical Adhesive Film* - Applied Biosystems) ao final do procedimento. Cada reação continha 3 µL de *primers* específicos (*mix forward* e *reverse* a 2,5 µM cada) (tabela II), 2µL de cDNA (50 ng/ µL) e 5 µL de *SYBR[®] Select Master Mix*, totalizando um volume final de reação de 10 µL. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica para cada gene analisado utilizando o gene RNA ribossomal 18S (*Rn18s*) como controle endógeno. A quantificação gênica relativa foi determinada no termociclador *ABI 7500 Real-Time*

PCR System (Applied Biosystems) e a aquisição dos dados foi feita através do programa 7500 System Software (Applied Biosystems).

Tabela II – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*).

Gene	Sequência	Número de acesso no GenBank
<i>Rn18s</i>	<i>Forward:</i> GTA AGT GCG GGT CAT AAG <i>Reverse:</i> CCA TCC AAT CGG TAG TAG C	NR_046237.1
<i>Insr</i>	<i>Forward:</i> CCT TGG ATC GTT CCT CTC AC <i>Reverse:</i> GGT CCG TTT GAT GCT CAG AG	NM_017071.2
<i>Irs1</i>	<i>Forward:</i> TGA GAG CGG TGG TGG TAA GC <i>Reverse:</i> GGG CTG CTG GTG TTG GAA TC	NM_012969.1
<i>Akt2</i>	<i>Forward:</i> GGA GGT CAT GGA GCA TCG GTT C <i>Reverse:</i> GTT TGA AGG GTG GCA GGA GC	XM_008759111.2
<i>Fbp1</i>	<i>Forward:</i> CCA TCA TAA TAG AGC CCG AGA AGA <i>Reverse:</i> CTT TCT CCG AAG CCT CAT TAG C	NM_012558.3
<i>Gp</i>	<i>Forward:</i> AGC CAA AGT GAA GCA GGA AA <i>Reverse:</i> ATC ACA TGC AGG CAG TTC AG	NM_022268.1
<i>Hadh</i>	<i>Forward:</i> GGC TGC ATG AGC GAG GCG AT <i>Reverse:</i> TGG GAT ACC CGG CTC CCA GC	NM_057186.2
<i>Hmgcr</i>	<i>Forward:</i> GAC CAA CCT TCT ACC TCA GCA AG <i>Reverse:</i> ACA ACT CAC CAG CCA TCA CAG T	NM_013134.2
<i>Ldlr</i>	<i>Forward:</i> CAG CTC TGT GTG AAC CTG GA <i>Reverse:</i> TTC TTC AGG TTG GGG ATC AG	NM_175762.2
<i>Sreb1c</i>	<i>Forward:</i> GGA GCC ATG GAT TGC ACA TT <i>Reverse:</i> AGG AAG GCT TCC AGA GAG GA	XM_213329
<i>Sirt1</i>	<i>Forward:</i> GGT TGC AGG AAT CCA AAG G <i>Reverse:</i> CCA CGA ACA GCT TCA CAA TC	XM_008772947.2
<i>Sirt2</i>	<i>Forward:</i> CAC GAT GAG CTG GAT GAA AG <i>Reverse:</i> CGG GCT TTA CCA CAT TCT G	XM_006228676.3
<i>Sirt3</i>	<i>Forward:</i> GGG TCC TTT GCT CTG AGT CC <i>Reverse:</i> TCC ACC AGC CTT TCC ACA C	XM_008759981.2
<i>Sirt4</i>	<i>Forward:</i> TTG ATT TCA TCC GCA GTG <i>Reverse:</i> CCC AAG TTT CTC CCA GTT	XR_595327.2
<i>Sirt5</i>	<i>Forward:</i> AAC GCA AAG CAC ATA GTC AT <i>Reverse:</i> AGC AAA GGC CAG AGG AGT	XM_006253802.2
<i>Sirt6</i>	<i>Forward:</i> GCC GTC TGG TCA TTG TCA <i>Reverse:</i> AGC CTT GGG TGC TAC TGG	XM_017594720.1
<i>Sirt7</i>	<i>Forward:</i> AGC ACG GCA GCC TCT ATC <i>Reverse:</i> AGG TCG GCA GCA CTC ACA	XM_006247889.3

Os níveis de expressão relativa dos genes alvos foram calculados a partir do Δ CT relacionado ao gene normalizador (*Rn18s*). Para detectar as alterações na expressão gênica nos grupos G0-DH e F2-DH, os valores de Δ CT para cada amostra foram normalizados pelo nível médio de Δ CT do grupo dieta controle (grupo calibrador) e a alteração na expressão gênica ($\Delta\Delta$ CT) foi calculada. Os valores obtidos foram convertidos para uma escala linear ($2^{-\Delta\Delta$ CT}) e relatados como expressão comparativa em *fold change* (unidades arbitrárias), que considera a quantidade do gene alvo, normalizado para o gene de referência (*Rn18s*) e em relação ao grupo calibrador.

4.4.9.4. SELEÇÃO DO CONTROLE ENDÓGENO

Para a escolha do gene normalizador foi realizada a análise dos dados da expressão gênica por qRT-PCR para cinco controles endógenos: hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (*Hprt1*), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*), *Rn18s*, fosfoproteína ribossomal P2 da subunidade 60S (*Rplp2*) e peptidilprolil isomerase A (*Ppia*). Os resultados foram analisados utilizando o software *NormFinder*, que classifica o conjunto de genes de acordo com a sua estabilidade em um determinado conjunto de amostras, gerando uma medida de estabilidade, onde um valor mais baixo implica em uma maior estabilidade na expressão gênica (Andersen *et al.*, 2004). Como mostrado na tabela **III**, o gene *Rn18s* por ter apresentado menor variação entre as amostras de diferentes grupos experimentais foi identificado pelo software *NormFinder* como o controle ideal para o presente estudo.

Tabela III – Valores de estabilidade dos genes gerados pela análise *NormFinder*

Gene	Valor de estabilidade	Gene ideal	Valor de estabilidade do gene ideal
<i>Hprt1</i>	0,047	<i>Rn18s</i>	0,035
<i>Gapdh</i>	0,054		
<i>Rn18s</i>	0,035		
<i>Rplp2</i>	0,060		
<i>Ppia</i>	0,043		

4.4.9.5. CURVA DE EFICIÊNCIA E AMPLIFICAÇÃO DOS PRIMERS

Para determinar as eficiências da amplificação dos genes *Fbp1*, *Gp*, *Hadh*, *Hmgcr*, *Ldlr* e *Srebp1c* foram construídas curvas padrões para cada *amplicon* a partir de um *pool* de cDNA de seis amostras controles.

O ensaio foi realizado em triplicata e construído a partir de cinco diluições seriadas do cDNA utilizando um fator de diluição de 4x, conforme as seguintes concentrações de cDNA: 100 ng/2µL (50 ng/µL) – ponto 1024; 25 ng/2µL (12,5 ng/µL) – ponto 256; 6,25 ng/2µL (3,13 ng/µL) – ponto 64; 1,56 ng/2µL (0,78 ng/µL) – ponto 16; 0,39 ng/2µL (0,195 ng/µL) – ponto 4. Ao término das diluições seriadas, foi preparado o mix de cDNA nas cinco diluições com o *SYBR® Select Master Mix* (*Applied Biosystems*). Para isso, foi calculado a quantidade de reações para cada concentração de cDNA da curva (1024, 256, 64, 16 e 4) e para cada *primer* utilizado. Em seguida, foram adicionados em placas de 96 poços: 3µL de *primer* específico e 7 µL de mix de reação (contendo 2µL de cDNA de cada concentração da curva padrão e 5 µL de *SYBR® Select Master Mix*), totalizando um volume de 10 µL de reação em cada poço.

A curva padrão foi representada por um gráfico de regressão linear semi-log do valor de Cq (eixo Y) em comparação ao log da quantidade inicial do ácido nucleico (eixo X). O *slope* da curva padrão foi usado para estimar a eficiência de amplificação. O cálculo da estimativa da eficiência (E) foi obtido pela fórmula: $E = (10^{-1/slope} - 1) \times 100$. Os *primers* foram considerados apropriados para avaliar a expressão gênica pelo *SYBR®* quando apresentaram eficiência de reação acima de 80% e abaixo de 120%. A tabela IV mostra os valores de *slope* e as eficiências dos *primers* avaliados.

Tabela IV – Valores de *slope* e eficiências dos *primers* avaliados

Gene	Slope	Eficiência do primer (%)
<i>Fbp1</i>	-3,41	96
<i>Gp</i>	-3,44	95
<i>Hadh</i>	-3,16	107
<i>Hmgcr</i>	-3,35	99
<i>Ldlr</i>	-3,18	106
<i>Srebp1c</i>	-3,40	97

5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas pelo software *GraphPad Prism 6 for Windows*, (San Diego, CA, EUA). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste *Shapiro-Wilk*. A análise de dados paramétricos foi realizada utilizando o teste *t não pareado* e os dados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média. A análise de dados não paramétricos foi realizada pelo teste de *Mann-Whitney* e os dados foram apresentados como a mediana (mínimo valor e máximo valor). O nível de significância foi previamente fixado em $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Parâmetros do Metabolismo de Glicose e Lipídeos de Progenitoras G0 e das Proles F2

Em comparação com as progenitoras G0-DC, as progenitoras G0-DH apresentaram aumento da glicemia de jejum ($P=0,0159$), dos níveis séricos de insulina ($P=0,0238$) e do HOMA-IR ($P=0,0159$) (tabela V). No entanto, como mostrado na tabela V e figura 06, foi observada uma redução do HOMA- β ($P=0,0159$) e nenhuma alteração da AUC do TTOG [712,7 (547,4 mínimo valor - 983,0 máximo valor); $n=4$; G0-DH vs. 621,9 (563,5 mínimo valor - 765,3 máximo valor); $n=4$; G0-DC; $P=0,6571$] no grupo G0-DH. Em adição, foi visto que o consumo materno de dieta hiperlipídica aumentou os níveis de triglicérides ($P=0,0317$) do grupo G0-DH, quando comparado ao grupo G0-DC. No entanto, as concentrações séricas de colesterol total ($P=0,7143$) foram similares em ambos os grupos estudados (tabela V).

Tabela V – Parâmetros bioquímicos e massa relativa (g/ 100g de massa da rata) do fígado de progenitoras alimentadas com dieta controle (G0-DC; $n=4$) ou hiperlipídica (G0-DH; $n=5$) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias).

Parâmetros bioquímicos	G0-DC	G0-DH
Glicemia (mmol/L)	6,40 (5,97 - 6,45)	7,25 (7,12 - 8,34) *
Insulina (mU/L)	12,84 (12,39 - 13,12)	13,29 (13,12 - 15,31) *
HOMA-IR	3,66 (3,29 - 3,75)	4,76 (4,21 - 4,93) *
HOMA- β	89,14 (87,68 - 100,2)	73,35 (54,90 - 83,50) *
Triglicérides (mmol/L)	0,50 (0,38 - 0,81)	0,96 (0,76 - 1,14) *
Colesterol (mmol/L)	2,05 (1,52 - 2,36)	2,15 (1,41 - 2,33)
ALT (UI)	1,31 (0,50 - 2,25)	3,11 (1,52 - 6,85)
AST (UI)	0,80 (0,57 - 1,05)	1,23 (0,73 - 1,97)
Fígado (g/100g de massa da rata)	3,95 (3,85 - 4,06)	4,58 (4,04 - 5,39) *
	$n=4$	$n=5$

Os valores são expressos como mediana (entre parênteses, mínimo valor e máximo valor, respectivamente). As diferenças estatísticas foram determinadas pelo Teste de *Mann Whitney*. * $P<0,05$ em relação ao grupo G0-DC.

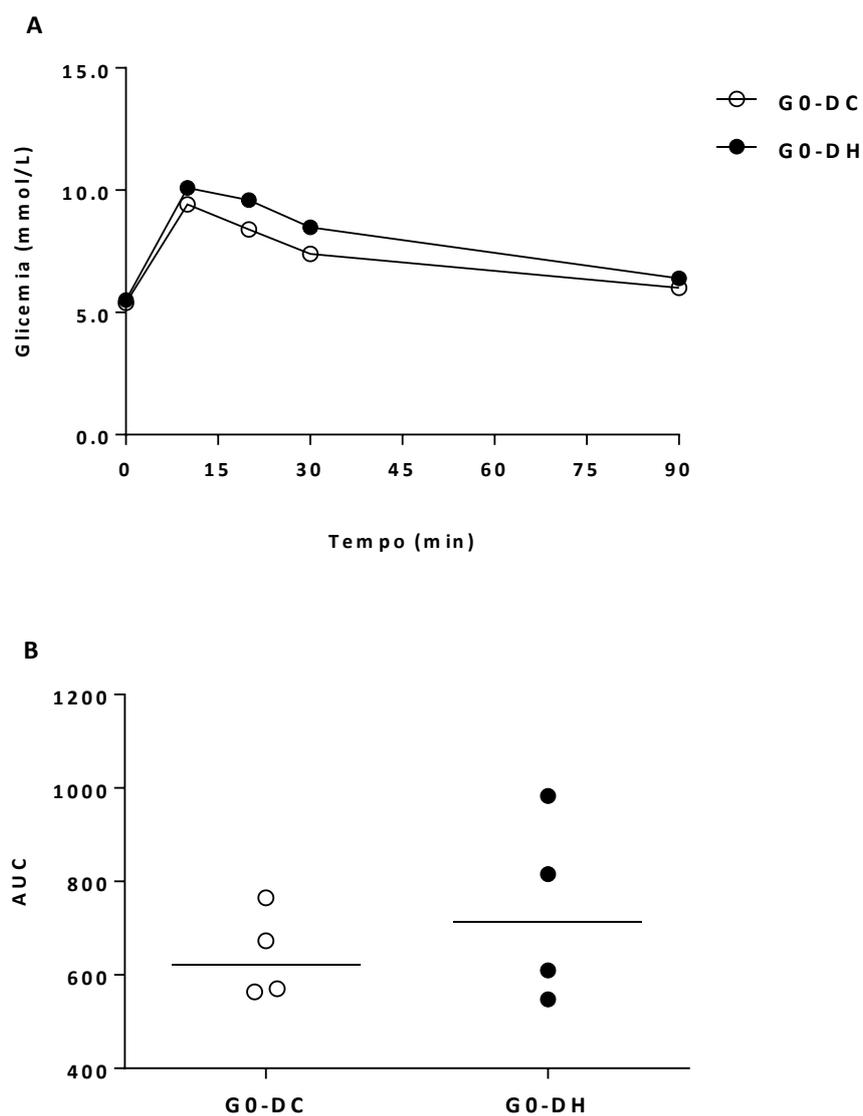


Figura 06: Teste de tolerância oral à glicose (glicemia - mmol/L; painel A) e área sob a curva (AUC; painel B) de progenitoras alimentadas com dieta controle (G0-DC; n=4) ou hiperlipídica (G0-DH, n=4) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias). Os valores são expressos como mediana (mínimo valor e máximo valor). As igualdades estatísticas foram determinadas pelo Teste de *Mann Whitney*; min = minutos.

Nossos resultados em relação às proles F2, como indicado na tabela VI e figura 07, revelaram que o grupo F2-DH, apesar de ter sido alimentado com dieta controle por 13 semanas após o desmame, apresentou maior glicemia de jejum ($P=0,0020$), concentração de insulina sérica ($P=0,0330$), HOMA-IR ($P=0,0258$) e AUC do TTOG ($555,8 \pm 21,80$; $n=7$; F2-DH vs. $484,1 \pm 20,94$; $n=6$; F2-DC; $P=0,0385$) em relação ao grupo F2-DC. O HOMA- β foi similar em ambos os grupos estudados ($P=0,6356$). Foi observado também que a prole F2-DH apresentou aumento dos níveis séricos de triglicérides ($P<0,0001$) e colesterol total ($P=0,0023$) quando comparado à prole F2-DC (tabela VI).

Tabela VI – Parâmetros bioquímicos e massa relativa (g/100g de massa do rato) do fígado das proles F2 de progenitoras alimentadas com dieta controle (F2-DC; $n=6-8$) ou hiperlipídica (F2-DH; $n=6-8$) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias).

Parâmetros bioquímicos	F2-DC	F2-DH
Glicemia (mmol/L)	$6,21 \pm 0,34$	$7,75 \pm 0,15^*$
Insulina (mU/L)	$25,24 \pm 1,71$	$35,50 \pm 3,90^*$
HOMA-IR	$7,09 \pm 0,67$	$11,61 \pm 1,65^*$
HOMA- β	$195,6 \pm 24,43$	$179,4 \pm 21,66$
Triglicérides (mmol/L)	$0,99 \pm 0,03$	$1,62 \pm 0,10^*$
Colesterol (mmol/L)	$2,03 \pm 0,14$	$2,54 \pm 0,04^*$
ALT (UI)	$3,06 \pm 0,35$	$6,25 \pm 1,03^*$
AST (UI)	$0,66 \pm 0,03$	$1,41 \pm 0,24^*$
Fígado (g/ 100g de massa do rato)	$3,04 \pm 0,02$	$3,57 \pm 0,10^*$
	$n=6-8$	$n=6-8$

Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo Teste t não pareado. * $P<0,05$ em relação ao grupo F2-DC.

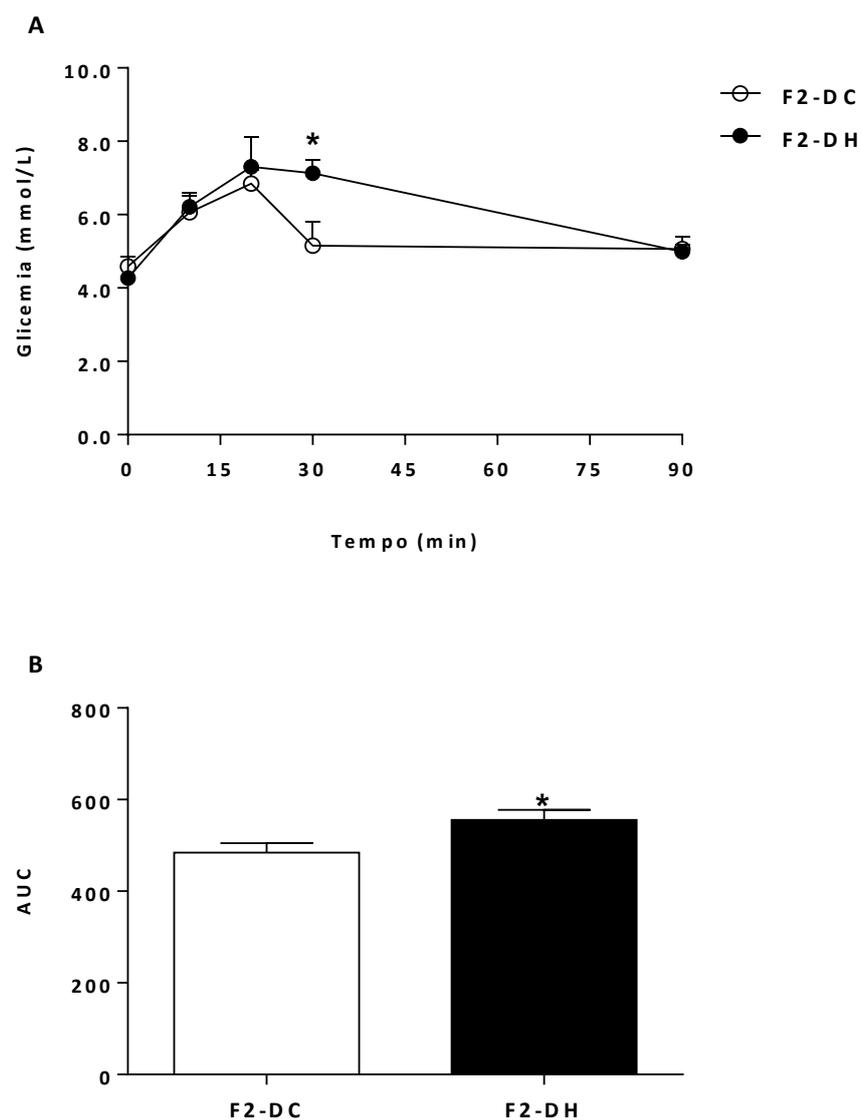


Figura 07: Teste de tolerância oral à glicose (glicemia - mmol/L; painel A) e área sob a curva (AUC; painel B) das proles F2 de progenitoras alimentadas com dieta controle (F2-DC; n=6) ou hiperlipídica (F2-DH; n=7) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias). Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo Teste t não pareado. * $P < 0,05$ em relação ao grupo F2-DC; min = minutos.

6.2. Histologia do Fígado e Parâmetros Bioquímicos Hepáticos de Progenitoras G0 e das Proles F2

Como indicado na tabela **V**, as progenitoras G0-DH apresentaram aumento da massa relativa do fígado ($P=0,0397$) (hepatomegalia) e similares níveis séricos das enzimas ALT ($P=0,1111$) e AST ($P=0,1111$) quando comparado às progenitoras G0-DC. Já, a prole F2-DH apresentou hepatomegalia ($P=0,0004$) e aumento dos níveis séricos das enzimas ALT ($P=0,0127$) e AST ($P=0,0083$) comparado à prole F2-DC (tabela **VI**).

A histologia do tecido hepático demonstrou uma grande quantidade de deposição lipídica no fígado do grupo G0-DH, característico de esteatose microvesicular intensa (figura **08b**). Em contrapartida, foi observado um padrão de deposição lipídica discreta no fígado do grupo F2-DH (figura **08d**). Os animais dos grupos G0-DC e F2-DC apresentaram alterações histológicas discretas, sendo o aspecto do fígado compatível com a normalidade.

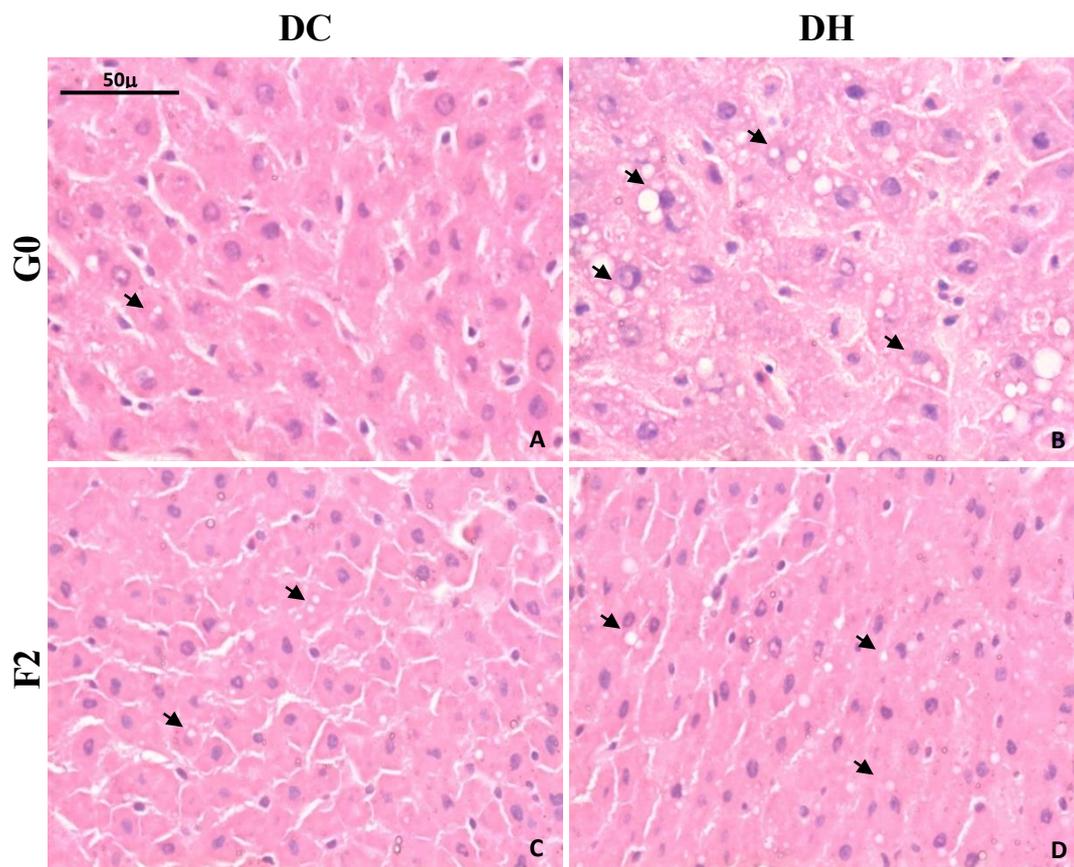


Figura 08: Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de ratas (os) Fisher demonstrando o grau de esteatose microvesicular de progenitoras (G0) alimentadas com dieta controle (DC) ou hiperlipídica (DH) durante acasalamento, gestação e lactação e das proles F2 alimentadas com DC durante 13 semanas após o desmame. G0 submetida à DC com padrão histológico hepático discreto (painel A); G0 submetida à DH com esteatose microvesicular intensa (painel B); proles F2 de progenitoras G0 submetidas à DC ou DH com esteatose microvesicular discreta (painéis C e D, respectivamente). Setas indicam esteatose microvesicular. Hematoxilina-Eosina. Barra = 50µm (G0-DC, n=4; G0-DH, n=5; F2-DC, n=7; F2-DH, n=8).

A figura 09 representa o grau de esteatose microvesicular hepática obtido pela análise semiquantitativa da esteatose microvesicular, através da graduação ausente, discreto, moderado e intenso, baseado no método proposto por (Brunt *et al.*, 1999). Em relação a esta análise, as progenitoras G0-DH foram classificadas como 80% com esteatose microvesicular intensa e 20% com esteatose microvesicular moderada. Já, a prole F2-DH foi classificada como 75% com esteatose microvesicular discreta e 25% com esteatose microvesicular intensa. Os grupos G0-DC e F2-DC foram classificados como 75% e 71% com esteatose microvesicular discreta, respectivamente, e 25% e 29% com esteatose microvesicular ausente, respectivamente.

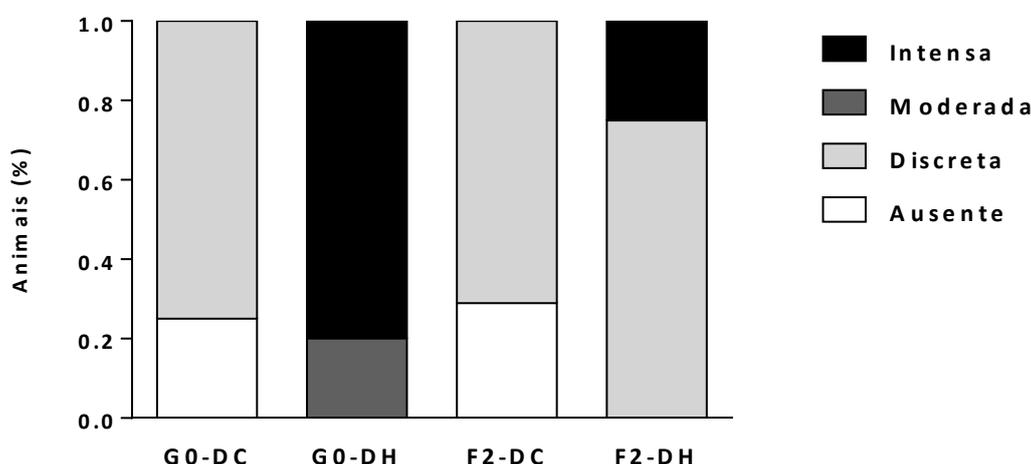


Figura 09: Grau de esteatose microvesicular hepática de progenitoras alimentadas com dieta controle (G0-DC) ou hiperlipídica (G0-DH) durante acasalamento, gestação e lactação e das proles F2-DC e F2-DH alimentadas com dieta controle durante 13 semanas após o desmame (G0-DC, n=4; G0-DH, n=5; F2-DC, n=7; F2-DH, n=8).

A análise dos resultados obtidos pela metodologia de Folch (Folch *et al.*, 1957) revelou que o grupo G0-DH apresentou aumento de 49,18% no conteúdo de lipídeos hepáticos quando comparado ao grupo G0-DC (tabela VII). Em adição, a prole F2-DH apresentou aumento de 23,21% no conteúdo de lipídeos hepáticos em relação à prole F2-DC (tabela VII). Com base nos resultados observados e levando em consideração que a NAFLD é caracterizada pelo aumento de mais de 5% de gordura no fígado (Milić e Stimac, 2012; Fang *et al.*, 2018; Stefan *et al.*, 2019), nossos dados sugerem a presença da NAFLD em progenitoras G0-DH e na prole F2-DH.

Tabela VII – Presença ou ausência da NAFLD em progenitoras alimentadas com dieta controle (G0-DC) ou hiperlipídica (G0-DH) durante acasalamento, gestação e lactação e nas proles F2-DC e F2-DH alimentadas com dieta controle durante 13 semanas após o desmame.

	% de lipídeos no fígado	NAFLD
G0-DC (n=4)	4,25 (3,29 - 4,89)	Não (< 5%)
G0-DH (n=5)	6,34 (6,03 - 7,01) *	Sim (>5%)
F2-DC (n=5)	4,61 ± 0,18	Não (<5%)
F2-DH (n=6)	5,68 ± 0,26 [#]	Sim (>5%)

A presença ou ausência da NAFLD foi calculada a partir do conteúdo de lipídeos hepáticos obtido pela metodologia de Folch e com base na definição da NAFLD descrita pelos estudos da literatura (Milić e Stimac, 2012; Fang *et al.*, 2018; Stefan *et al.*, 2019). Os valores são expressos como mediana (entre parênteses, mínimo valor e máximo valor, respectivamente) ou como média ± erro padrão da média. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo Teste de *Mann Whitney* ou pelo Teste t não pareado. *P<0,05 em relação ao grupo G0-DC e [#]P<0,05 em relação ao grupo F2-DC.

Como mostrado na figura 10, o consumo materno de dieta hiperlipídica aumentou o conteúdo de triglicérides hepático [4,36 (3,93 - 7,22; mínimo e máximo valor); P=0,0159; n=5] e colesterol hepático [0,84 (0,82 - 1,03; mínimo e máximo valor); 0,0079; n=5] em progenitoras G0-DH, comparado às progenitoras G0-DC [0,95 (0,85 - 1,09; mínimo e máximo valor) n=4; triglicérides hepático e 0,59 (0,30 - 0,76; mínimo e máximo valor) n=4; colesterol hepático – figura 10a e 10b, respectivamente]. Além disso, a dieta hiperlipídica materna também resultou em acúmulo significativo de triglicérides hepático (1,84 ± 0,25; n=6) na prole F2-DH em comparação com a prole F2-DC (1,05 ± 0,07; P= 0,0225; n=5). No entanto, o teor de colesterol hepático foi similar entre as proles estudadas (0,64 ± 0,05; n=5; F2-DC e 0,73 ± 0,05; n=6; F2-DH; P=0,2514 – figura 11a e 11b, respectivamente).

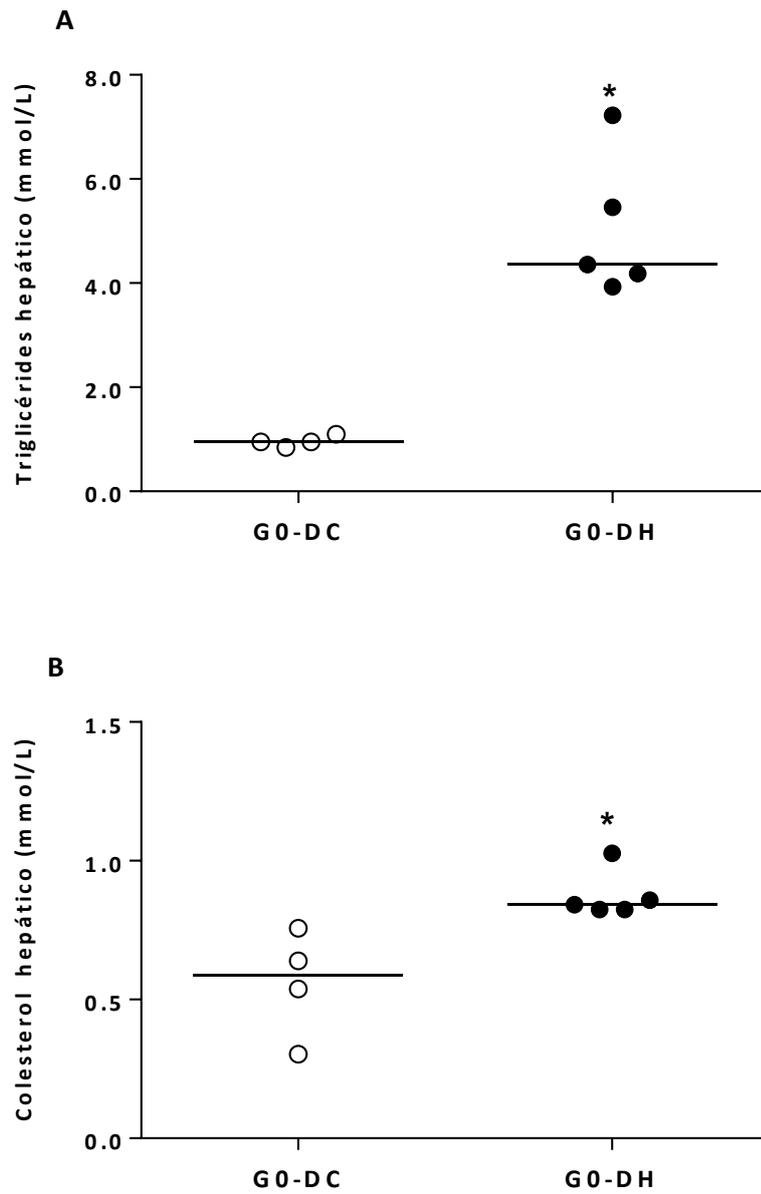


Figura 10: Teor de triglicérides (painel A) e colesterol (painel B) no fígado de progenitoras alimentadas com dieta controle (G0-DC; n=4) ou hiperlipídica (G0-DH, n=5) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias). Os valores são expressos como mediana (mínimo valor e máximo valor). As diferenças estatísticas foram determinadas pelo Teste de *Mann Whitney*. *P<0,05 em relação ao grupo G0-DC.

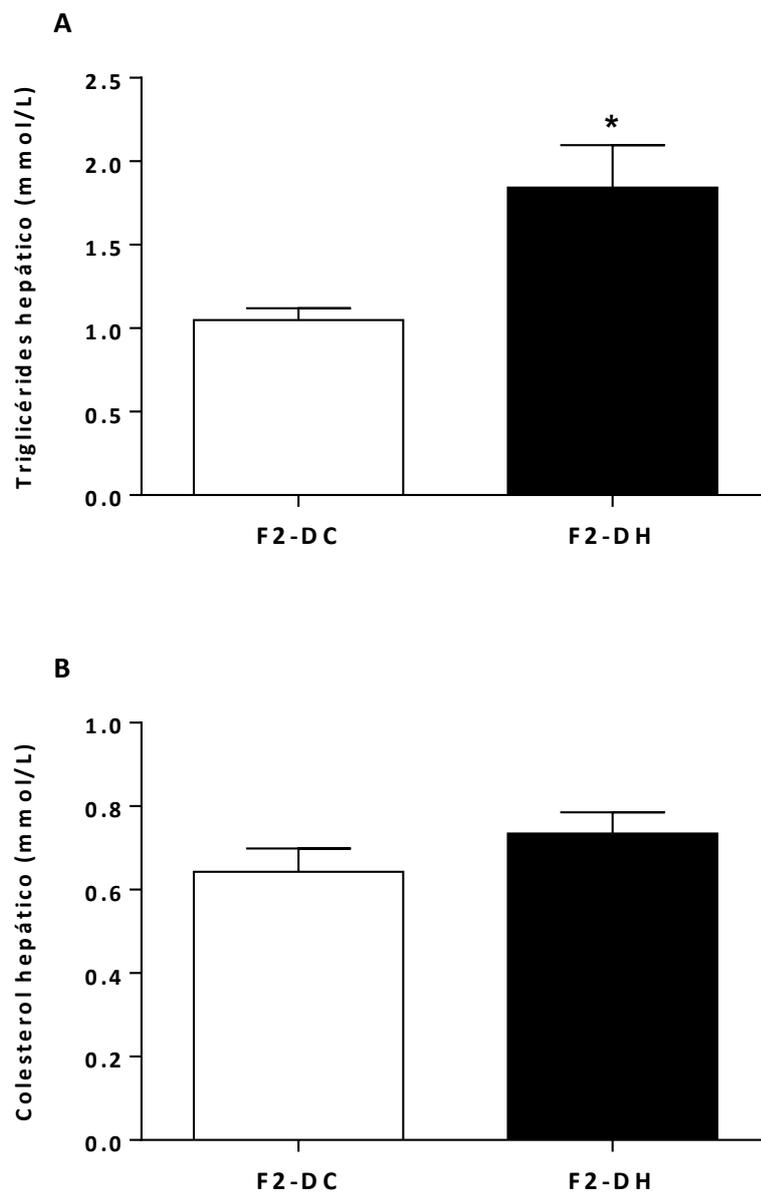


Figura 11: Teor de triglicérides (painel A) e colesterol (painel B) no fígado das proles F2 de progenitoras alimentadas com dieta controle (F2-DC, n=5) ou hiperlipídica (F2-DH, n=6) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias). Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. A diferença estatística foi determinada pelo Teste t não pareado. * $P < 0,05$ em relação ao grupo F2-DC.

6.3. Avaliação da Atividade Antioxidante e do Estresse Oxidativo no Fígado de Progenitoras G0 e das Proles F2

O consumo materno de dieta hiperlipídica resultou em estresse oxidativo no fígado tanto das progenitoras G0-DH como da prole F2-DH, como indicado pelo aumento da concentração de TBARS [0,98 mmol/mg de proteína (0,93 mínimo valor - 1,55 máximo valor); n=5; G0-DH vs. 0,53 mmol/mg de proteína (0,34 mínimo valor - 0,96 máximo valor); n=4; G0-DC; P= 0,0317 e 1,40 ± 0,08 mmol/mg de proteína; n=8; F2-DH vs. 1,02 ± 0,06 mmol/mg de proteína; n=7; F2-DC; P=0,0035 – figuras **12c** e **13c**, respectivamente].

Em adição, como mostrado na figura **12a**, foi observado um aumento da atividade da SOD somente em progenitoras G0-DH [2,46 U/mg de proteína (1,61 mínimo valor - 3,57 máximo valor); n=5; P=0,0159] comparado às progenitoras G0-DC [1,36 (1,15 mínimo valor - 1,43 máximo valor); n=4]. A atividade da SOD foi similar nas proles F2-DC (1,26 ± 0,08 U/mg de proteína; n=7) e F2-DH (1,44 ± 0,07 U/mg de proteína; n=7; P= 0,1328 – figura **13a**).

Além disso, no presente estudo, não foi relatado alterações significativas da concentração de proteína carbonilada em todos os grupos estudados [1,62 mmol/mg de proteína (1,38 mínimo valor - 2,42 máximo valor); n=5; G0-DH; vs. 1,37 mmol/mg de proteína (1,08 mínimo valor - 1,76 máximo valor); n=4; G0-DC; P=0,2857 e 0,20 ± 0,05 mmol/mg de proteína; n=5; F2-DH vs. 0,26 ± 0,06 mmol/mg de proteína; n=5; F2-DC; P=0,5110 – figuras **12b** e **13b**].

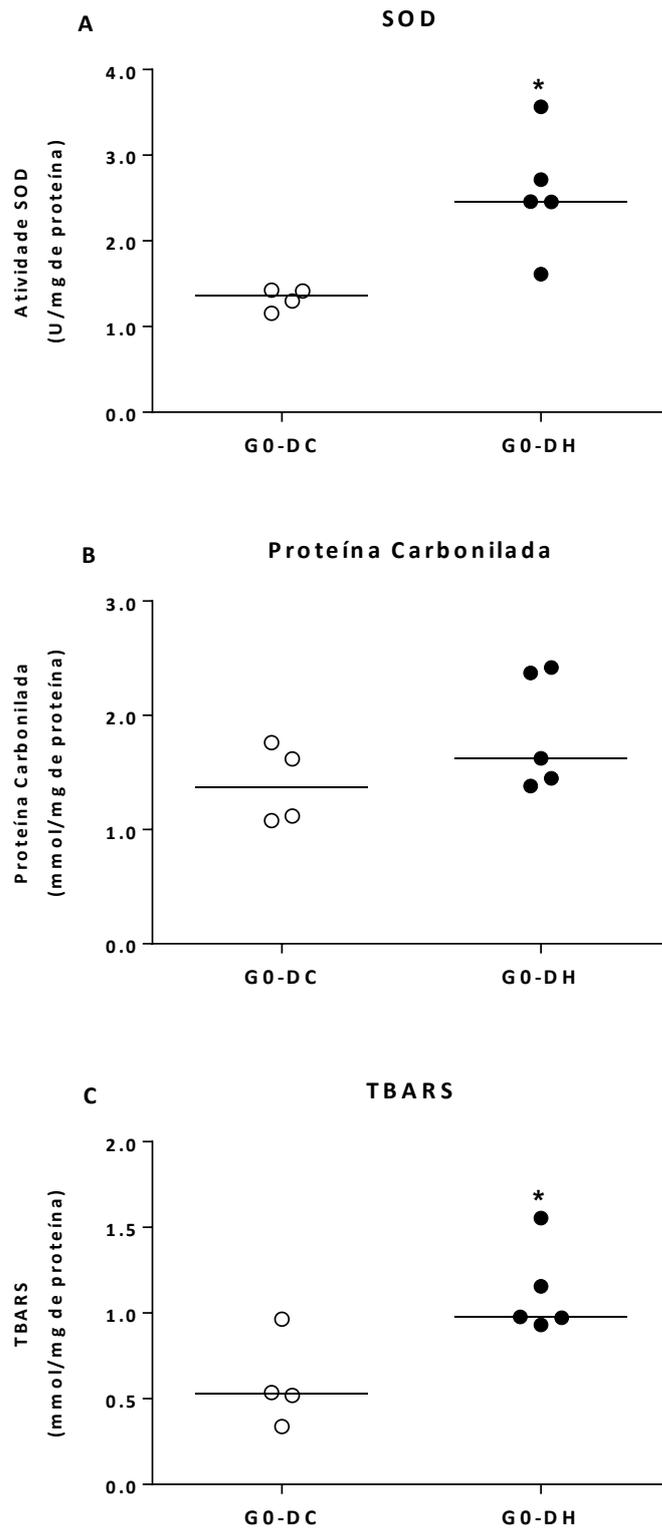


Figura 12: Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD, painel A), concentrações de proteína carbonilada (painel B) e peroxidação lipídica avaliada pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, painel C) no fígado de progenitoras alimentadas com dieta controle (G0-DC; n=4) ou hiperlipídica (G0-DH, n=5) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias). Os valores são expressos como mediana (mínimo valor e máximo valor). As diferenças estatísticas foram determinadas pelo Teste de *Mann Whitney*. *P<0,05 em relação ao grupo G0-DC.

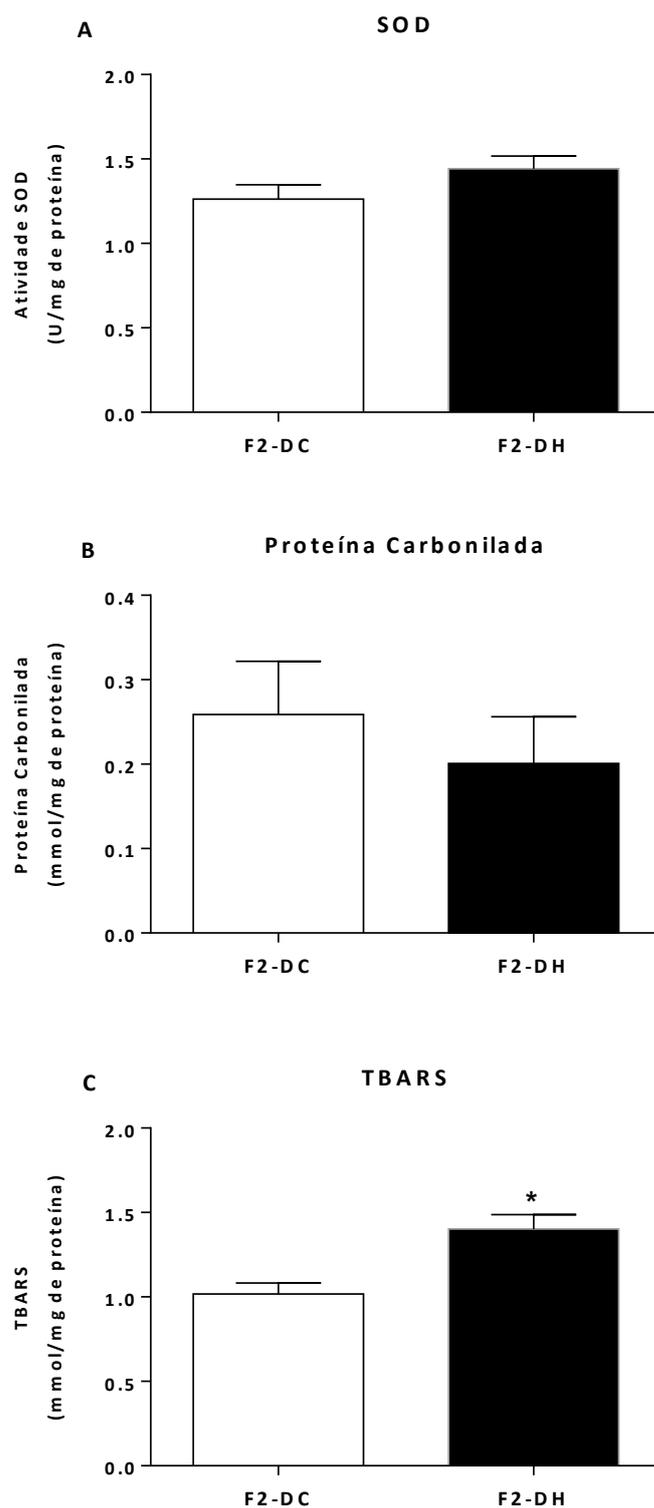


Figura 13: Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD, painel A), concentrações de proteína carbonilada (painel B) e peroxidação lipídica avaliada pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, painel C) no fígado das proles F2 de progenitoras alimentadas com dieta controle (F2-DC; n=5-8) ou hiperlipídica (F2-DH, n=5-8) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias). Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. A diferença estatística foi determinada pelo Teste t não pareado. * $P < 0,05$ em relação ao grupo F2-DC.

6.4. Expressão de mRNAs do Metabolismo de Glicose e Lipídeos no Fígado de Progenitoras G0 e das Proles F2 por qRT-PCR

Nossos resultados (figuras 14 e 15) revelaram que o consumo materno de dieta hiperlipídica reduziu os níveis de expressão gênica de *Insr*, *Irs1* e *Akt2* tanto em progenitoras G0-DH [3,510e-005 (3,760e-006 mínimo valor - 0,09 máximo valor); n=5; P=0,0159 – *Insr*; 2,530e-005 (2,530e-005 mínimo valor - 0,03 máximo valor); n=5; P=0,0159 – *Irs1*; 0,003 (5,680e-005 mínimo valor - 0,63 máximo valor); n=5; P=0,0159 – *Akt2*] quanto na prole F2-DH [0,48 (0,30 mínimo valor - 0,70 máximo valor); n=4; P=0,0286 – *Insr*; 0,32 (0,07 mínimo valor - 0,72 máximo valor); n=5; P=0,0159 – *Irs1*; 0,43 (0,29 mínimo valor - 0,69 máximo valor); n=4; P=0,0286 – *Akt2*] em comparação com os seus respectivos calibradores [1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 – *Insr*; 1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 – *Irs1*; 1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 – *Akt2* – G0-DC e F2-DC].

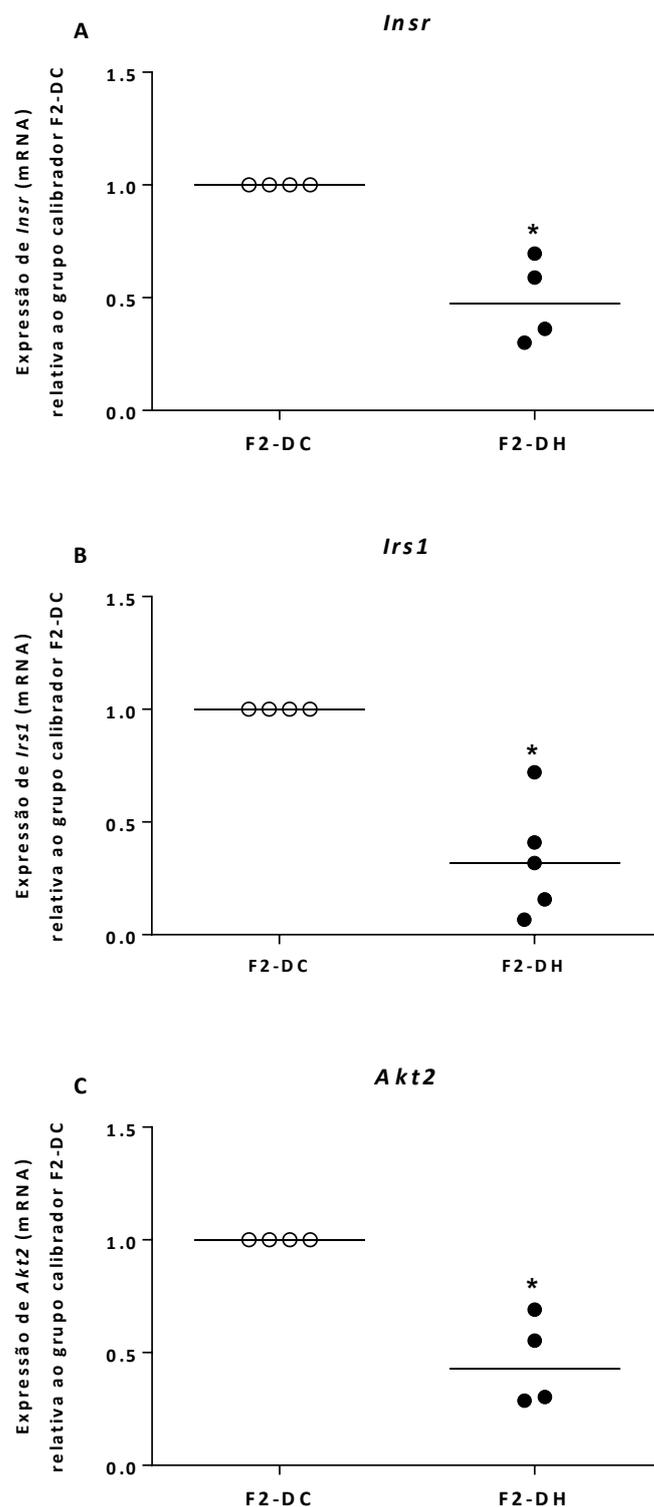


Figura 15: Expressão de mRNA de *Insr* (painel A), *Irs1* (painel B) e *Akt2* (painel C) (qRT-PCR) no fígado das proles F2 de progenitoras alimentadas com dieta controle (F2-DC; n=4) ou hiperlipídica (F2-DH, n=4-5) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias). Os círculos pretos representam valores médios da expressão *fold change* de mRNAs alvos em relação ao grupo calibrador F2-DC (representado pelos círculos brancos). As diferenças estatísticas foram determinadas pelo Teste de *Mann Whitney*. *P<0,05 em comparação com o grupo calibrador F2-DC.

Já, a análise da expressão de *Fbp1* e *Gp* mostrou que os seus níveis de mRNA foram maiores no grupo G0-DH [2,62 (1,77 mínimo valor - 2,90 máximo valor); n=5; P=0,0159 – *Fbp1*; 1,53 (1,44 mínimo valor – 2,00 máximo valor); n=4; P=0,0286 – *Gp*]; comparado ao grupo de referência G0-DC [1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 – *Fbp1*; 1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 – *Gp* – figura **16**). Em relação às proles F2, foi observado aumento dos níveis de expressão gênica de *Fbp1* e níveis similares de mRNA de *Gp* no grupo F2-DH [1,07 (0,97 mínimo valor - 1,66 máximo valor); n=6; P=0,0476 – *Fbp1*; 1,14 ± 0,12; n=5; P=0,2195 – *Gp*], comparado ao grupo calibrador F2-DC [1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=6 – *Fbp1*; 1,00 ± 0,00; n=6 – *Gp* – figura **17**).

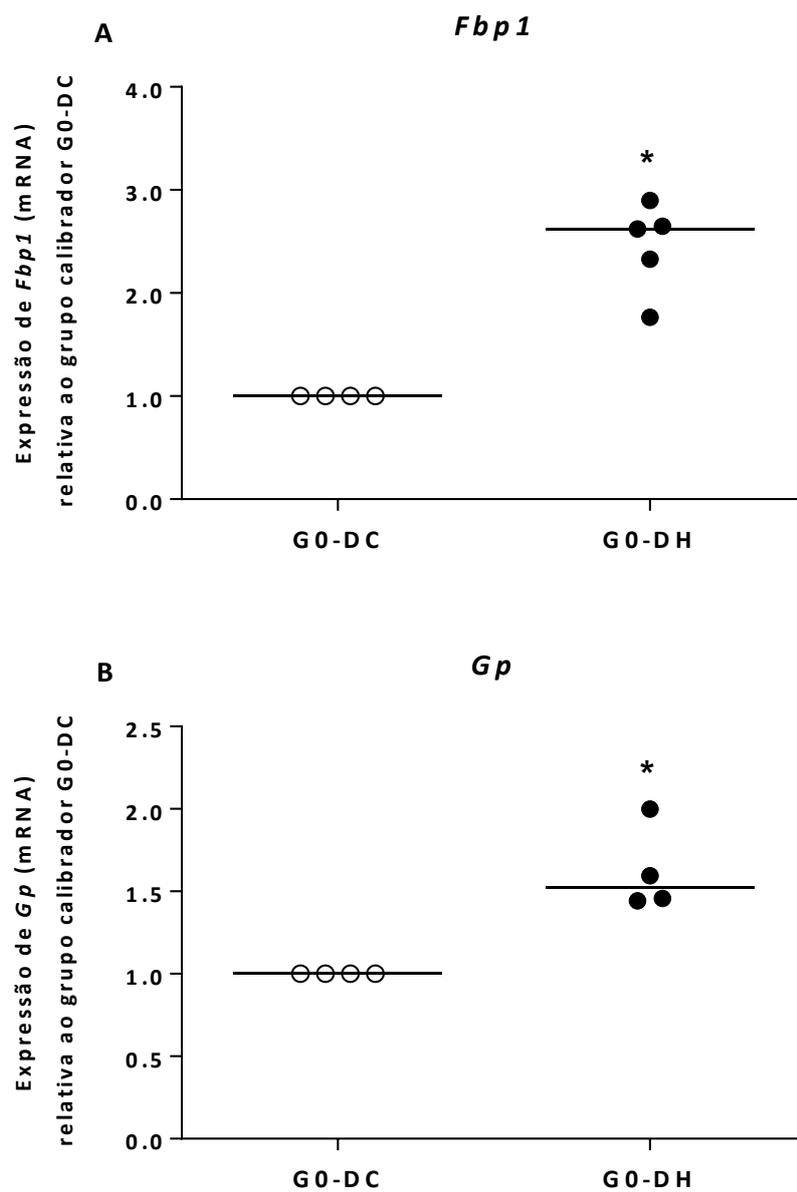


Figura 16: Expressão de mRNA de *Fbp1* (painel A) e *Gp* (painel B) (qRT-PCR) no fígado de progenitoras alimentadas com dieta controle (G0-DC; n=4) ou hiperlipídica (G0-DH, n=4-5) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias). Os círculos pretos representam valores médios da expressão *fold change* de mRNAs alvos em relação ao grupo calibrador G0-DC (representado pelos círculos brancos). As diferenças estatísticas foram determinadas pelo Teste de *Mann Whitney*. *P<0,05 em comparação com o grupo calibrador G0-DC.

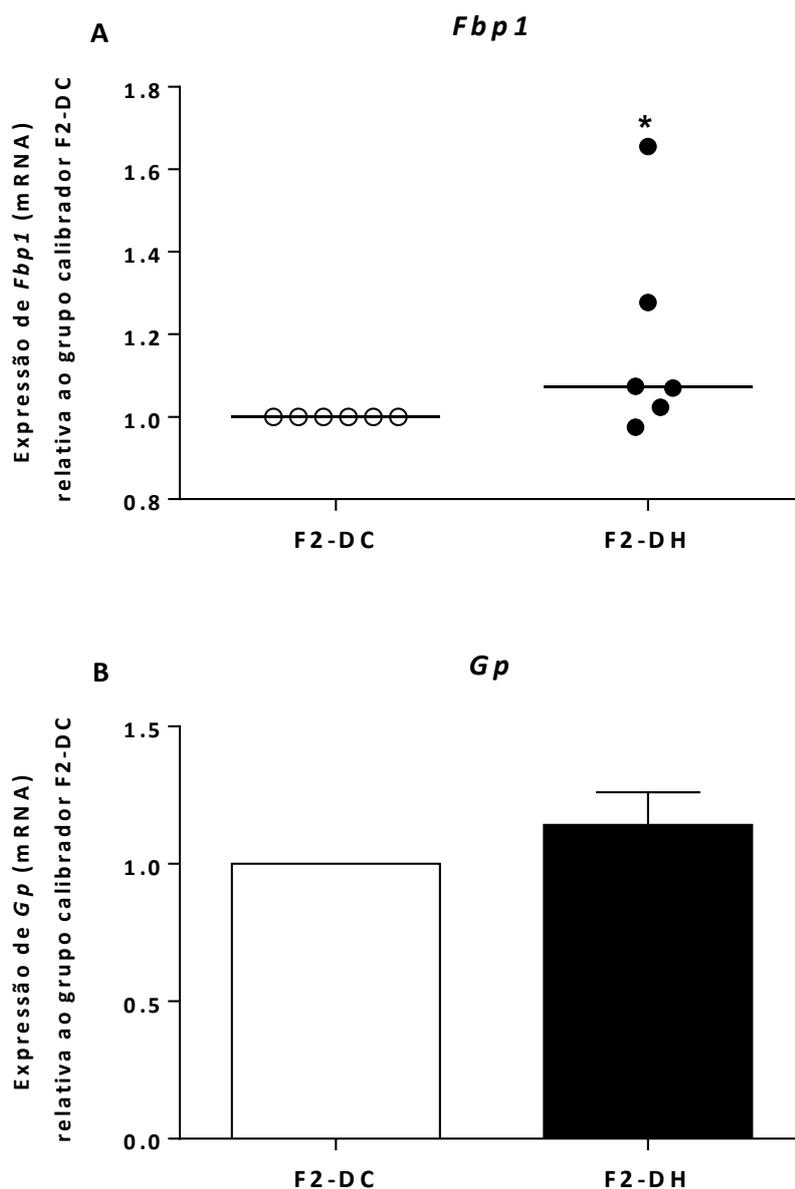


Figura 17: Expressão de mRNA de *Fbp1* (painel A) e *Gp* (painel B) (qRT-PCR) no fígado das proles F2 de progenitoras alimentadas com dieta controle (F2-DC; n=6) ou hiperlipídica (F2-DH, n=5-6) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias). A barra preta ou círculos pretos representam valores médios da expressão *fold change* de mRNAs alvos em relação ao grupo calibrador F2-DC (representado pela barra branca ou círculos brancos). A diferença estatística foi determinada pelo Teste de *Mann Whitney*. *P<0,05 em comparação com o grupo calibrador F2-DC.

Em relação ao metabolismo de lipídeos, foi visto que o grupo G0-DH apresentou aumento dos níveis de expressão gênica de *Srebp1c* [1,97 (1,62 mínimo valor - 2,28 máximo valor); n=4; P=0,0286] e níveis similares de mRNA de *Hadh* [1,41 (0,99 mínimo valor - 4,39 máximo valor); n=5; P=0,1587] em comparação com o grupo G0-DC [1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 - *Srebp1c*; 1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 - *Hadh* - figura **18a e 18b**, respectivamente]. Em contrapartida, foi observado que o grupo F2-DH apresentou níveis similares de mRNA de *Srebp1c* ($1,22 \pm 0,26$; n=6; P=0,4032) e aumento dos níveis de expressão gênica de *Hadh* ($4,82 \pm 1,45$; n=6; P=0,0247) comparado ao grupo F2-DC ($1,00 \pm 0,00$; n=6 - *Srebp1c*; $1,00 \pm 0,00$; n=6 - *Hadh* - figura **19a e 19b**, respectivamente).

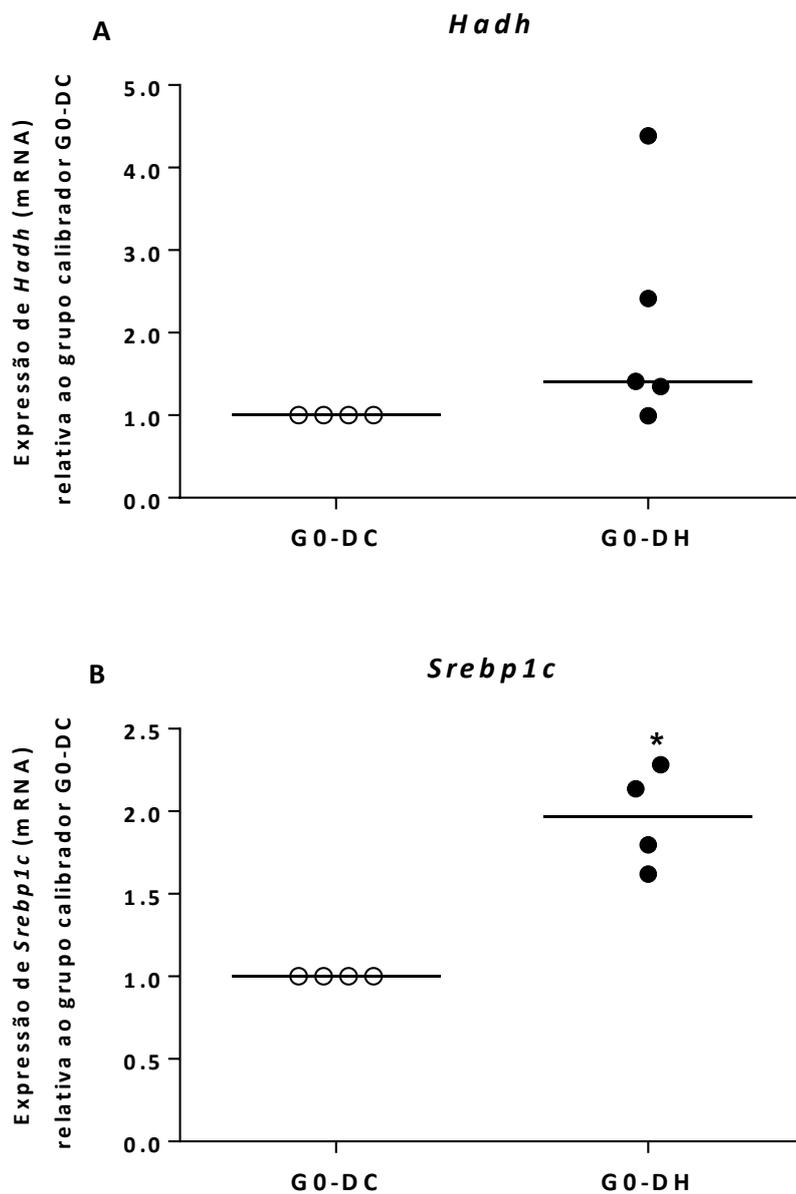


Figura 18: Expressão de mRNA de *Hadh* (painel A) e *Srebp1c* (painel B) (qRT-PCR) no fígado de progenitoras alimentadas com dieta controle (G0-DC; n=4) ou hiperlipídica (G0-DH, n=4-5) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias). Os círculos pretos representam valores médios da expressão *fold change* de mRNAs alvos em relação ao grupo calibrador G0-DC (representado pelos círculos brancos). A diferença estatística foi determinada pelo Teste de *Mann Whitney*. *P<0,05 em comparação com o grupo calibrador G0-DC.

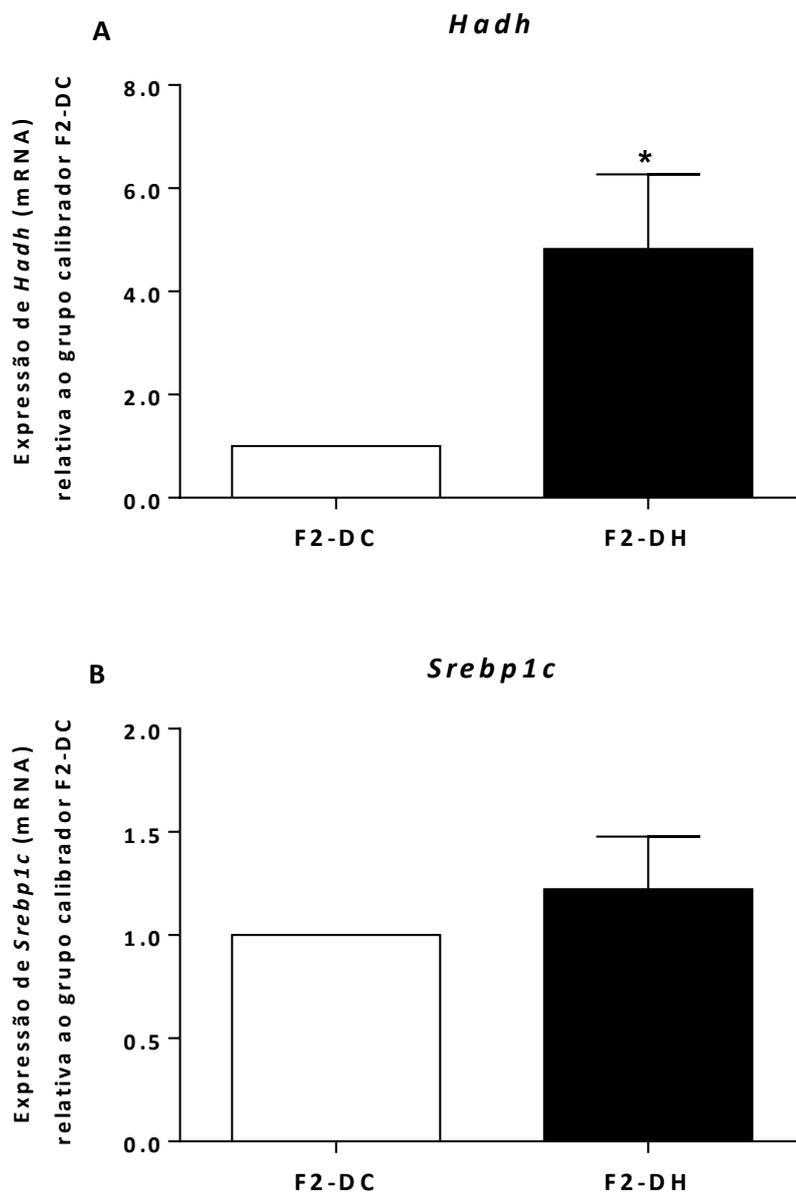


Figura 19: Expressão de *Hadh* (painel A) e *Srebp1c* (painel B) (qRT-PCR) no fígado das proles F2 de progenitoras alimentadas com dieta controle (F2-DC; n=6) ou hiperlipídica (F2-DH, n=6) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias). As barras pretas representam valores médios da expressão *fold change* de mRNAs alvos em relação ao grupo calibrador F2-DC (representado pelas barras brancas). A diferença estatística foi determinada pelo Teste t não pareado. *P<0,05 em comparação com o grupo calibrador F2-DC.

A análise da expressão de genes relacionados ao metabolismo de colesterol, revelou que as progenitoras G0-DH apresentaram aumento da expressão de mRNA de *Hmgcr* [2,69 (2,44 mínimo valor - 14,16 máximo valor); n=5; P=0,0159] e *Ldlr* [2,77 (2,31 mínimo valor - 5,07 máximo valor); n=5; P=0,0159] em comparação com as progenitoras G0-DC [1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 - *Hmgcr*; 1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 - *Ldlr* - figura **20a** e **20b**, respectivamente]. Em contrapartida, foi observado que a prole F2-DH apresentou redução dos níveis de mRNA de *Hmgcr* ($0,65 \pm 0,10$; n=6; P=0,0058) e níveis similares de mRNA de *Ldlr* ($0,97 \pm 0,13$; n=5; P=0,8290) comparado à prole F2-DC ($1,00 \pm 0,00$; n=6 - *Hmgcr*; $1,00 \pm 0,00$; n=6 - *Ldlr* - figura **21a** e **21b**, respectivamente).

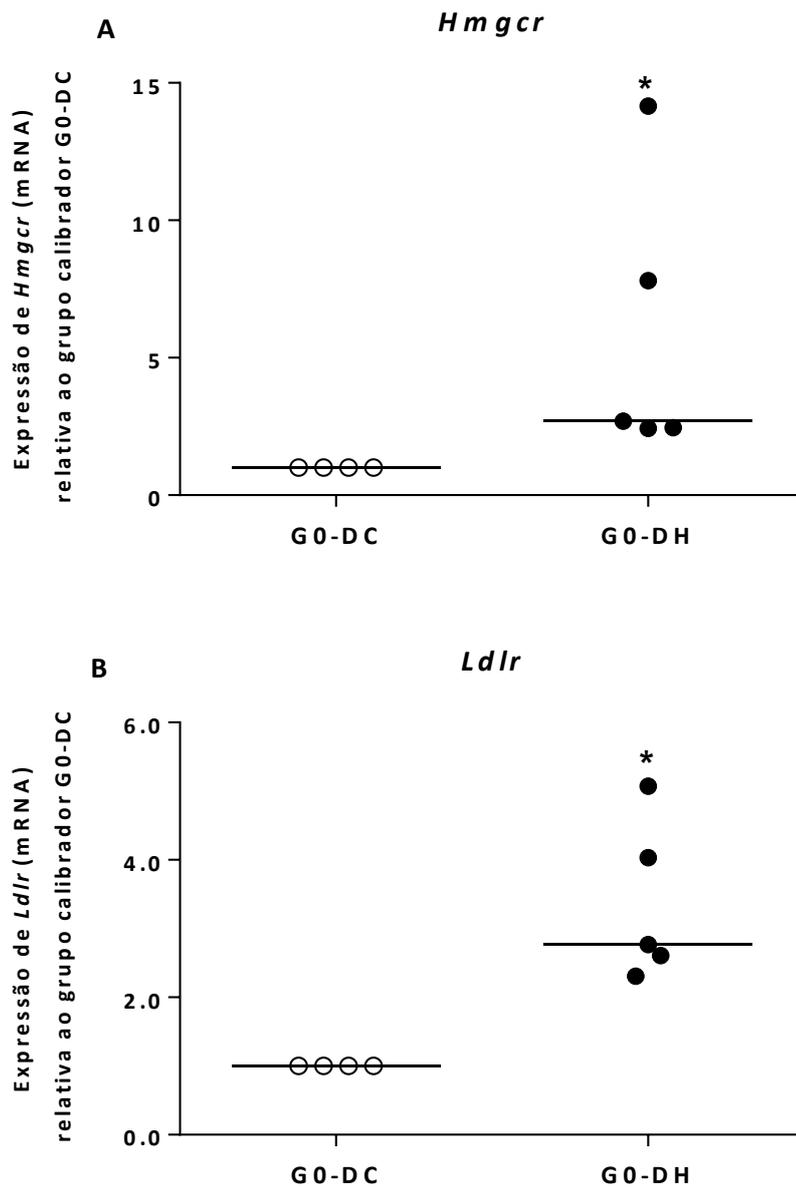


Figura 20: Expressão de mRNA de *Hmgcr* (painel A) e *Ldlr* (painel B) (qRT-PCR) no fígado de progenitoras alimentadas com dieta controle (G0-DC; n=4) ou hiperlipídica (G0-DH, n=4-5) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias). Os círculos pretos representam valores médios da expressão *fold change* de mRNAs alvos em relação ao grupo calibrador G0-DC (representado pelos círculos brancos). As diferenças estatísticas foram determinadas pelo Teste de *Mann Whitney*. *P<0,05 em comparação com o grupo calibrador G0-DC.

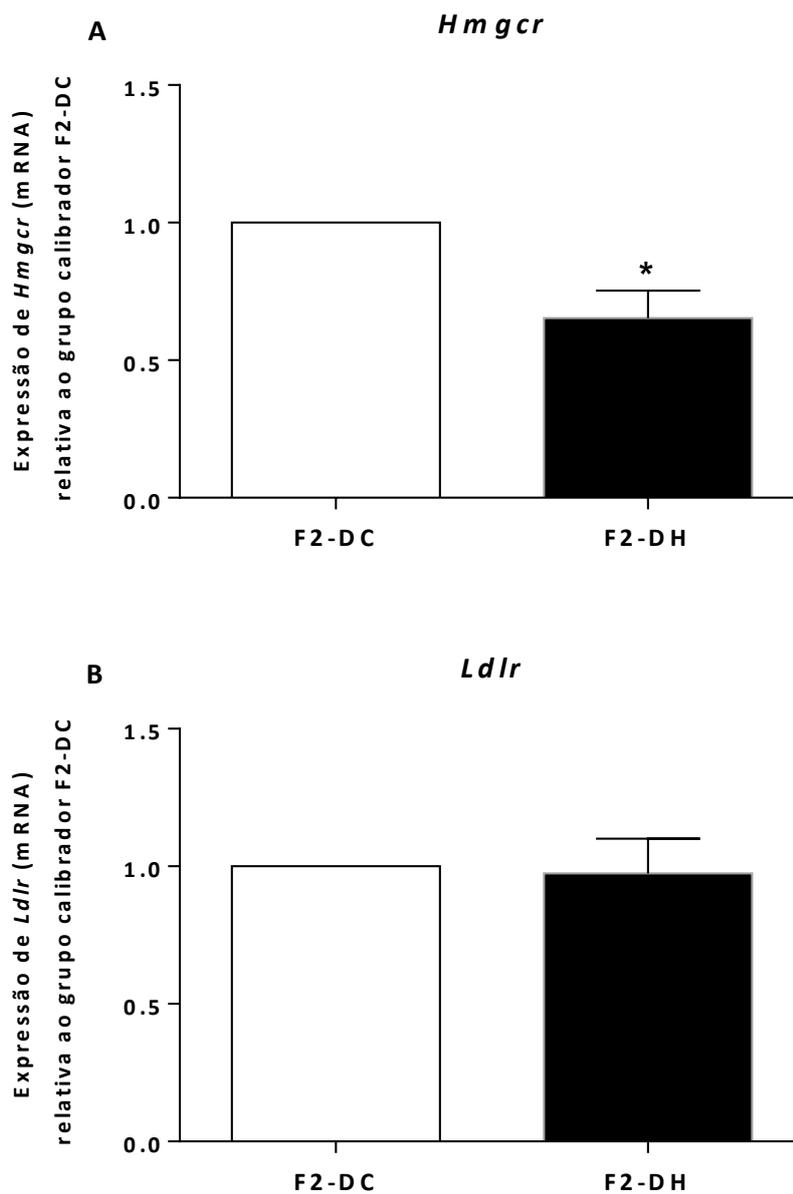


Figura 21: Expressão de mRNA de *Hmgcr* (painel A) e *Ldlr* (painel B) (qRT-PCR) no fígado das proles de progenitoras alimentadas com dieta controle (F2-DC; n=6) ou hiperlipídica (F2-DH, n=5-6) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias). As barras pretas representam valores médios da expressão *fold change* de mRNAs alvos em relação ao grupo calibrador F2-DC (representado pelas barras brancas). A diferença estatística foi determinada pelo Teste t não pareado. *P<0,05 em comparação com o grupo calibrador F2-DC.

6.5. Expressão de mRNAs de Sirtuínas no Fígado de Progenitoras G0 e das Proles F2 por qRT-PCR

Como indicado na figura 22, progenitoras G0-DH apresentaram redução dos níveis de mRNA de *Sirt1* [0,0009 (0,0009 mínimo valor - 0,0009 máximo valor); n=5; P=0,0079], *Sirt2* [1,640e-005 (1,640e-005 mínimo valor - 0,14 máximo valor); n=5; P=0,0159], *Sirt3* [0,002 (0,0001 mínimo valor - 0,08 máximo valor); n=5; P=0,0159] e *Sirt7* [0,0005 (0,0005 mínimo valor - 0,03 máximo valor); n=5; P=0,0159] comparado às progenitoras G0-DC [1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 – *Sirt1*; 1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 – *Sirt2*; 1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 – *Sirt3* e 1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 – *Sirt7*].

Não foram observadas alterações dos níveis de mRNA de *Sirt4* [1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=5 – G0-DH vs. 1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 – G0-DC; P> 0,9999], *Sirt5* [1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=5 – G0-DH vs. 1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 – G0-DC; P> 0,9999] e *Sirt6* [1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=5 – G0-DH vs. 1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 – G0-DC; P> 0,9999] nos grupos estudados.

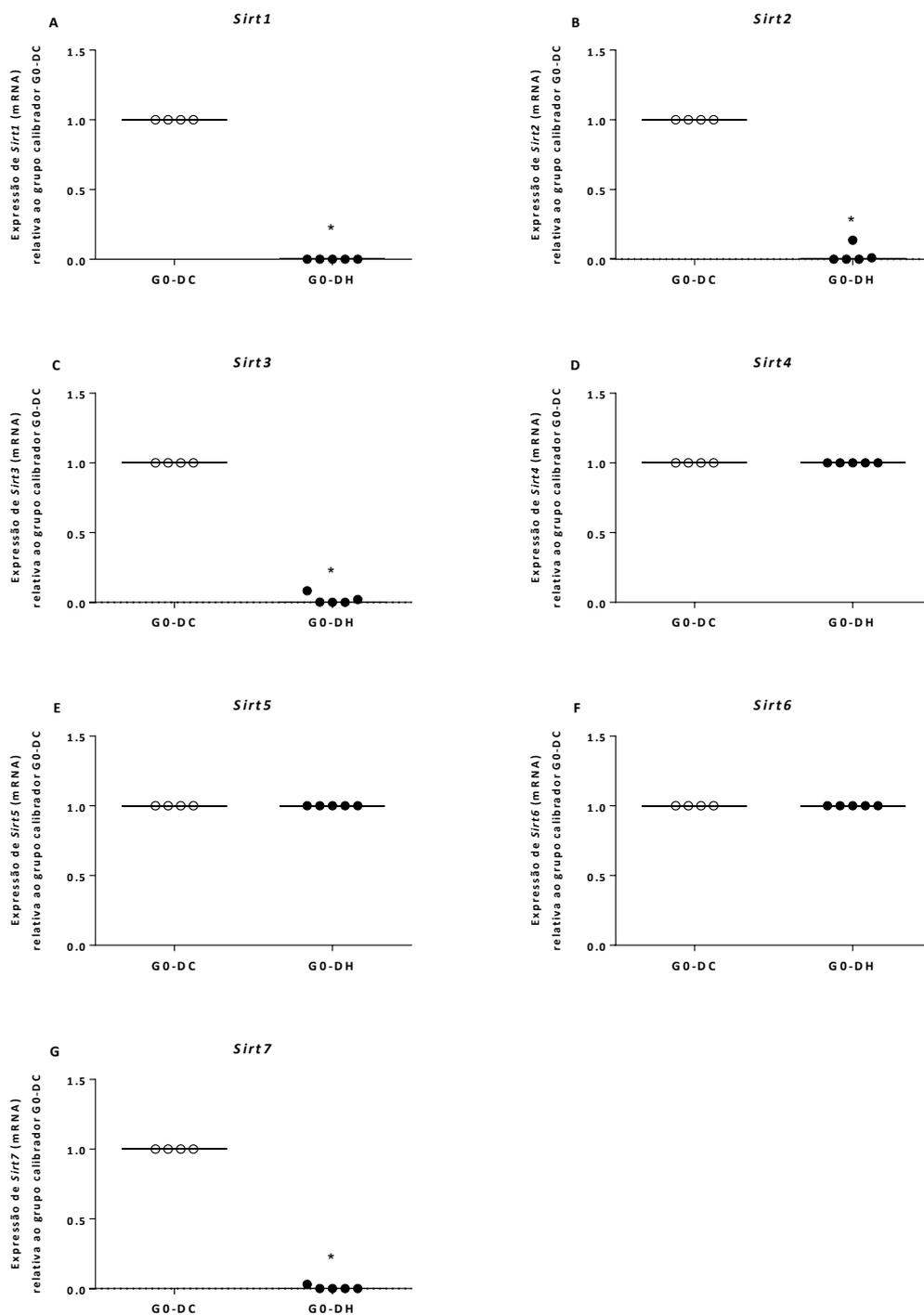


Figura 22: Expressão de mRNA de *Sirt1* (painel A), *Sirt2* (painel B), *Sirt3* (painel C), *Sirt4* (painel D), *Sirt5* (painel E), *Sirt6* (painel F) e *Sirt7* (painel G) (qRT-PCR) no fígado de progenitoras alimentadas com dieta controle (G0-DC; n=4) ou hiperlipídica (G0-DH, n=5) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias). Os círculos pretos representam valores médios da expressão *fold change* de mRNAs alvos em relação ao grupo calibrador G0-DC (representado pelos círculos brancos). As diferenças estatísticas foram determinadas pelo Teste de *Mann Whitney*. *P<0,05 em comparação com o grupo calibrador G0-DC.

Em relação às proles F2, como indicado na figura 23, foi observada uma redução significativa dos níveis de expressão gênica de *Sirt1* [0,28 (0,13 mínimo valor - 0,61 máximo valor); n=4; P= 0,0286], *Sirt2* [0,14 (0,01 mínimo valor - 0,87 máximo valor); n=5; P= 0,0159], *Sirt3* [0,09 (0,08 mínimo valor - 0,13 máximo valor); n=5; P= 0,0159], *Sirt5* [0,12 (0,05 mínimo valor - 0,26 máximo valor); n=4; P= 0,0286], *Sirt6* [0,009 (0,009 mínimo valor - 0,33 máximo valor); n=6; P= 0,0095] e *Sirt7* [0,22 (0,06 mínimo valor - 0,47 máximo valor); n=5; P= 0,0159] no grupo F2-DH, comparado ao grupo F2-DC [1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 – *Sirt1*; 1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 – *Sirt2*; 1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 – *Sirt3*; 1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 – *Sirt5*; 1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 – *Sirt6*; 1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 – *Sirt7*]. Não houve diferença na expressão gênica de *Sirt4* nos grupos estudados [1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 – F2-DH vs. 1,00 (1,00 mínimo valor - 1,00 máximo valor); n=4 – F2-DC].

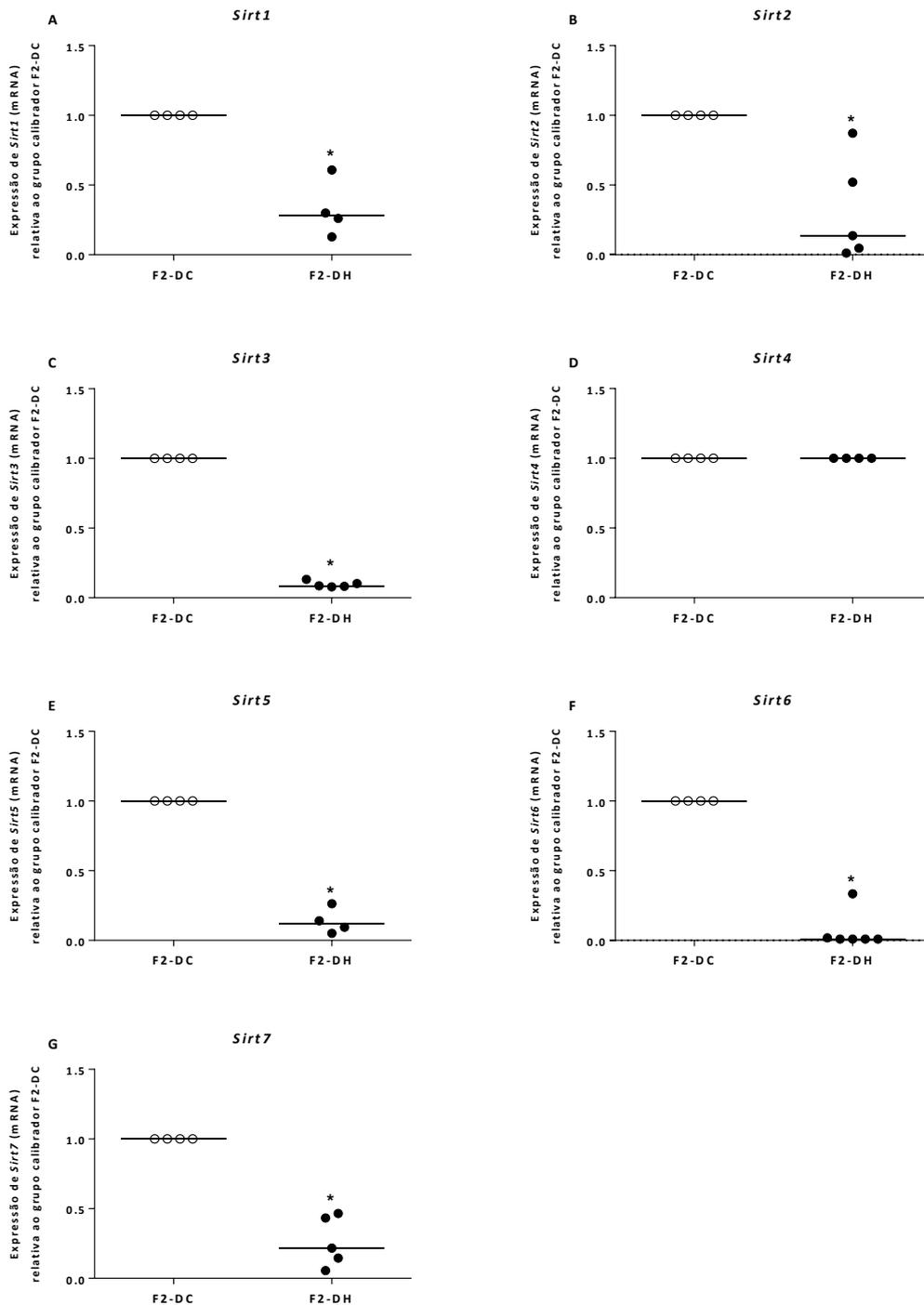


Figura 23: Expressão de mRNA de *Sirt1* (painel A), *Sirt2* (painel B), *Sirt3* (painel C), *Sirt4* (painel D), *Sirt5* (painel E), *Sirt6* (painel F) e *Sirt7* (painel G) (qRT-PCR) no fígado das proles F2 de progenitoras alimentadas com dieta controle (F2-DC; n=4) ou hiperlipídica (F2-DH, n=4-6) durante acasalamento, gestação e lactação (59 dias). Os círculos pretos representam valores médios da expressão *fold change* de mRNAs alvos em relação ao grupo calibrador F2-DC (representado pelos círculos brancos). As diferenças estatísticas foram determinadas pelo Teste de *Mann Whitney*. *P<0,05 em comparação com o grupo calibrador F2-DC.

7. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que o consumo materno de dieta hiperlipídica durante um curto período de tempo (acasalamento, gestação e lactação) induziu desregulação no metabolismo hepático que levou a distúrbios metabólicos em progenitoras G0-DH. Essa desregulação metabólica hepática foi transmitida aos seus descendentes F2-DH, apesar da própria prole F2-DH e de suas genitoras G1-DH terem sido alimentadas com dieta controle desde o desmame até completarem 90 dias de idade, indicando que a dieta hiperlipídica materna atuou como um desregulador metabólico hepático transgeracional na geração F2.

No presente estudo, a consanguinidade entre os grupos foi evitada a fim de a dieta hiperlipídica materna ser exclusivamente o fator desregulador de nossos resultados. Outra importante consideração, a se fazer sobre o nosso estudo, trata-se do tempo de exposição à dieta hiperlipídica materna: os estudos da literatura sobre o efeito da dieta hiperlipídica materna na prole apresentam grande variabilidade nos protocolos experimentais referentes às composições dietéticas, duração da submissão da dieta, linhagem dos animais, idade e sexo da prole, dificultando a compreensão da importância da dieta hiperlipídica submetida às progenitoras na saúde de seus descendentes. Neste trabalho, avaliamos o efeito da dieta hiperlipídica materna apenas durante o acasalamento, a gestação e a amamentação (59 dias) sobre o metabolismo hepático na F2, sendo que a F1 e F2 somente se alimentaram de dieta controle desde o desmame até completarem 90 dias de idade. Assim, os distúrbios metabólicos na prole F2-DH podem ser atribuídos ao efeito da dieta hiperlipídica materna da G0.

Dados anteriores de nosso laboratório (Barbosa, 2018) mostraram que as progenitoras G0-DH apresentaram distúrbios característicos da síndrome metabólica que foram transmitidos aos seus descendentes F1 e F2, apesar de terem sido alimentados somente com dieta controle após o desmame. No presente estudo, as progenitoras G0-DH não desenvolveram intolerância à glicose, no entanto, apresentaram hiperglicemia de jejum, hiperinsulinemia, resistência à insulina e disfunção das células beta pancreáticas. Em adição, foi observado que a prole F2-DH apresentou intolerância à glicose, hiperglicemia de jejum, hiperinsulinemia, resistência à insulina e capacidade normal da função das células beta pancreáticas, apesar de ter sido alimentada com dieta controle por 13 semanas após o desmame. Essas alterações podem ser atribuídas: 1) ao prejuízo na sinalização de insulina hepática induzido pela redução

dos níveis de expressão gênica de *Insr*, *Irs1* e *Akt2*; 2) ao aumento da produção de glicose hepática induzido pelo aumento dos níveis de expressão gênica de *Fbp1* tanto em progenitoras G0-DH quanto na prole F2-DH; e 3) ao aumento da degradação de glicogênio hepático induzido pelo aumento dos níveis de expressão gênica de *Gp* em progenitoras G0-DH. Nossos resultados sugerem que a dieta hiperlipídica materna pode induzir um efeito transgeracional na resistência à insulina hepática na F2, em parte, por desregular o metabolismo de glicose hepático da G0.

Nossos dados são corroborados pelo estudo que relatou que indivíduos resistentes à insulina apresentam taxas aumentadas de produção de glicose hepática (Roden *et al.*, 2000). Em adição, estudos da literatura (Rizza, 2010; Lin e Accili, 2011) demonstraram que fígados resistentes à insulina falham em suprimir a glicogenólise e a gliconeogênese, resultando no aumento da produção da glicose hepática, apesar da hiperinsulinemia.

Nossos achados também são consistentes com prévios estudos de nosso laboratório (Zacarias *et al.*, 2017) que descreveram resultados similares utilizando a mesma dieta hiperlipídica do presente estudo. De Castro (2015) demonstraram que o consumo crônico da dieta hiperlipídica durante 13 semanas após o desmame induziu hiperglicemia de jejum, hiperinsulinemia, intolerância à glicose, resistência à insulina e prejuízo da sinalização de insulina induzido pela redução dos níveis de mRNA de componentes da via de sinalização de insulina no fígado (*Irs1* e *Akt2*), no músculo gastrocnêmico (*Insr*, *Irs1*, *Akt2* e *Glut4*) e no tecido adiposo branco retroperitoneal (*Insr*, *Irs1*, *Irs2* e *Glut4*) em ratos Fischer. Em adição, Zacarias e colaboradores (2017) (Zacarias *et al.*, 2017) também relataram que o consumo crônico da dieta hiperlipídica durante 13 semanas após o desmame resultou em hiperglicemia de jejum, hiperinsulinemia e resistência a insulina hepática mediada pela redução da expressão de mRNA de *Irs1* e *Akt2* em ratos Fischer sedentários.

Estudos da literatura (Mccurdy *et al.*, 2009; Ashino *et al.*, 2012; Fante *et al.*, 2016; Huang, Y. H. *et al.*, 2017) também descreveram resultados similares ao do presente estudo. Fante e colaboradores (2016) demonstraram que as genitoras alimentadas com dieta hiperlipídica por três semanas antes da gestação e durante a gestação e a lactação apresentaram hiperglicemia no décimo segundo dia da gestação e no décimo quinto dia da lactação e hiperinsulinemia no décimo oitavo dia da gestação e no décimo quinto dia da lactação em comparação às genitoras alimentadas com dieta controle. Em adição, a prole adulta F1 apresentou aumento da expressão proteica de

PEPCK, redução dos níveis de glicogênio hepático, hiperglicemia de jejum e intolerância à glicose, apesar de ter sido alimentada com dieta controle após o desmame (Fante *et al.*, 2016). Os resultados desse estudo indicam que a dieta hiperlipídica materna resultou em aumento da produção de glicose hepática e aumento da degradação de glicogênio hepático, independente da nutrição pós-natal da prole F1, similar ao observado na prole F2-DH do presente estudo.

De forma complementar, Ashino e colaboradores (2012) relataram que o consumo de dieta hiperlipídica por uma semana antes do acasalamento e durante a gestação e lactação induziu aumento da expressão proteica de PEPCK e redução da fosforilação no resíduo de tirosina dos componentes da via de sinalização da insulina (INSR, IRS1 e AKT) no fígado da prole adulta F1, apesar de ter sido alimentada com dieta controle após o desmame (Ashino *et al.*, 2012). Os resultados desse estudo indicam que a dieta hiperlipídica materna resultou em aumento da produção de glicose hepática e resistência molecular à insulina hepática, independente da nutrição pós-natal da prole F1, similar ao observado na prole F2-DH do presente estudo. Esses estudos juntamente com o nosso demonstram a importância da dieta submetida à progenitora no período gestacional em influenciar a saúde da prole F2.

Em adição, McCurdy e colaboradores (2009) utilizando macacas japonesas adultas jovens com 5 a 6 anos de idade, alimentadas com dieta hiperlipídica, demonstraram que o consumo crônico da dieta hiperlipídica antes da gestação (quatro anos) e durante a gestação, induziu aumento da expressão de mRNA das enzimas *G6p* e *Fbp1* no fígado fetal com 30 dias de gestação (McCurdy *et al.*, 2009), indicando que a dieta hiperlipídica materna alterou o programa de expressão de genes gliconeogênicos no fígado fetal, similar ao observado na prole F2-DH do presente estudo.

Mais recentemente, Huang e colaboradores (2017) demonstraram que o consumo da dieta hiperlipídica durante oito semanas antes do acasalamento mais seis semanas nos períodos de acasalamento, gestação e lactação também induziu intolerância à glicose em progenitoras G0 e na prole F2 de ratos, apesar de ter sido alimentada com dieta controle após o desmame. Além disso, nesse estudo foi observado que a dieta hiperlipídica materna induziu aumento dos níveis séricos de glicose de jejum na prole F2 com três semanas de idade; e redução dos níveis séricos de insulina, do HOMA- β e da taxa de proliferação das células β pancreáticas nas proles F2 com três e doze semanas de idade, indicando que a dieta hiperlipídica materna durante a pré-gestação, gestação e lactação levou a intolerância à glicose devido ao prejuízo na função e proliferação de

células β pancreáticas (Huang, Y. H. *et al.*, 2017). No entanto, no nosso modelo animal, observamos que a dieta hiperlipídica materna induziu hiperinsulinemia, intolerância à glicose e nenhuma alteração do índice HOMA- β na prole F2-DH. Esta diferença pode ser explicada pela variação do tempo de consumo da dieta, uma vez que nesse estudo citado a dieta hiperlipídica foi submetida à genitora por 14 semanas, enquanto no presente estudo a dieta hiperlipídica foi submetida por apenas 8 semanas. Os dados da literatura juntamente com os nossos reforçam a nossa hipótese de que a dieta hiperlipídica materna pode atuar como um desregulador transgeracional do metabolismo hepático de glicose.

Estudos da literatura (Roden *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2007; Lambert *et al.*, 2014) demonstraram que indivíduos resistentes à insulina exibem aumento da produção hepática de glicose juntamente ao aumento da síntese lipídica, indicando que durante a progressão da resistência à insulina, a insulina falha em suprimir a produção hepática de glicose e, paradoxalmente, estimula a síntese lipídica, levando a NAFLD, hiperglicemia e hipertrigliceridemia (Brown e Goldstein, 2008; Santoleri e Titchenell, 2019). De forma similar, Semple e colaboradores (2009) relataram que humanos com defeito pós-receptor seletivo na AKT2 exibiram elevada lipogênese, aumento do conteúdo de gordura hepática, hipertrigliceridemia e baixos níveis de colesterol HDL, demonstrando que a resistência à insulina hepática pós-receptor é um elemento chave no desenvolvimento de dislipidemia metabólica e esteatose hepática (Semple *et al.*, 2009).

Consistente com esses achados, no presente estudo, foi observado que as progenitoras G0-DH apresentaram reduzida expressão gênica de Akt2 no fígado juntamente com dislipidemia, hepatomegalia e esteatose microvesicular intensa, resultante provavelmente do acúmulo hepático de triglicérides e colesterol. No entanto, o grupo G0-DH não exibiu nenhuma alteração significativa nos níveis séricos das enzimas ALT e AST. Estendendo nossa observação, a prole F2-DH apresentou dislipidemia, hepatomegalia e aumento dos níveis séricos das enzimas ALT e AST, indicando comprometimento da função hepática, apesar de ter sido alimentada com dieta controle durante 13 semanas após desmame. Em adição, 75% dos ratos F2-DH apresentaram um padrão de deposição lipídica discreta e 25% dos animais apresentaram esteatose microvesicular intensa, como indicado pela análise histológica. No entanto, a análise dos resultados obtidos pela metodologia de Folch revelou que a prole F2-DH apresentou acúmulo significativo de triglicérides hepático.

A NAFLD é clinicamente definida pelo armazenamento de triglicérides excedendo 5% da massa hepática total (Milić e Stimac, 2012; Stefan *et al.*, 2019). Nossos resultados demonstraram que as progenitoras G0-DH apresentaram aumento de 49,18% no conteúdo de lipídeos hepáticos em relação às progenitoras G0-DC. Enquanto, a prole F2-DH apresentou aumento de 23,21% no conteúdo de lipídeos hepáticos em relação à prole F2-DC. Com base na definição clínica da NAFLD, nossos dados sugerem a presença da NAFLD em progenitoras G0-DH e na prole F2-DH. No entanto, a fim de confirmar se a dieta hiperlipídica materna induz NAFLD tanto em progenitoras G0-DH quanto na prole F2-DH, posteriormente será realizada a técnica de *oil red*.

Estudo prévio de nosso laboratório (De Castro *et al.*, 2013) relatou que ratos Fischer submetidos à mesma dieta hiperlipídica do presente estudo, imediatamente após o desmame por um período de 13 semanas, apresentaram aumento da massa do fígado e NAFLD, juntamente com altos níveis séricos de ALT e AST, indicando dano hepático e deposição ectópica de gordura no fígado. De forma interessante, observamos fenótipo similar a este na prole F2-DH, cuja mãe foi exposta a dieta hiperlipídica somente *in utero* e durante o aleitamento materno.

Nossos dados são corroborados por estudos da literatura (Li *et al.*, 2012; Takasaki *et al.*, 2012) que relataram que o consumo materno de dieta hiperlipídica durante a G0 promoveu acúmulo lipídico hepático e esteatose hepática na F2. No entanto, nestes estudos, ambas as F1 e F2 foram continuamente alimentadas com dieta hiperlipídica, dessa forma, o impacto da dieta hiperlipídica materna da G0 na F2 não pôde ser distinguido da dieta hiperlipídica das proles F1 e F2. No presente estudo, apenas as progenitoras G0-DH foram alimentadas com dieta hiperlipídica, ambas as F1 e F2 receberam dieta controle após o desmame, indicando o impacto da dieta hiperlipídica materna da G0 na F2.

O acúmulo intracelular de triglicérides hepático reflete o balanço entre o fluxo de ácidos graxos livres, lipogênese de novo, oxidação de ácidos graxos e secreção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (Postic e Girard, 2008; Stefan *et al.*, 2008). O aumento do conteúdo de triglicérides hepático em progenitoras G0-DH sugere aumento da liberação de produtos de quilomícrons remanescentes e de produtos lipolíticos do tecido adiposo que, por sua vez, podem aumentar a reesterificação hepática de triglicérides e sua liberação na circulação sob a forma de VLDL. Além disso, a esteatose hepática em progenitoras G0-DH pode ser também consequência do

aumento da lipogênese de novo combinada com nenhuma alteração significativa da β -oxidação. Esta hipótese é fundamentada pelo aumento da expressão de mRNA do fator de transcrição chave de genes lipogênicos, *Srebp1c*, e pelos níveis similares de mRNA da enzima da β -oxidação, *Hadh*, observados no grupo G0-DH. No entanto, a prole F2-DH exibiu aumento da β -oxidação, indicado pelo aumento da expressão de mRNA da enzima *Hadh*, e nenhuma alteração da lipogênese, indicada pelos níveis similares de mRNA de *Srebp1c*, apesar de ter apresentado acúmulo de triglicérides hepático, sugerindo um mecanismo adaptativo e compensatório em resposta ao intenso acúmulo de triglicérides hepático de suas progenitoras G0-DH e também uma sobrecarga do processo de β -oxidação em resposta ao aumento do fluxo de ácidos graxos livres para o fígado mediado pelo quadro de resistência à insulina observado nesse grupo.

Recente estudo da literatura (Huang, Y. *et al.*, 2017) relatou que o consumo de dieta hiperlipídica por oito semanas antes e durante a gestação e lactação, induziu intolerância à glicose, hipercolesterolemia, esteatose hepática e aumento da expressão de genes lipogênicos (*enzima málica* e *estearoil-coa desaturase*) e lipolíticos (*PPAR α* ; *Cpt-1*; enoil-CoA hidratase e 3-hidroxiacil CoA desidrogenase) no início da vida da prole F1 de ratos, indicando que a dieta hiperlipídica materna além de induzir a lipogênese, promove também a lipólise através da β -oxidação, como um mecanismo compensatório, levando a distúrbios metabólicos na prole F1.

No presente estudo, a esteatose microvesicular intensa observada nos grupos G0-DH e F2-DH pode ter sido induzida não apenas devido ao teor de gordura da dieta hiperlipídica, mas também devido ao seu conteúdo de carboidratos simples, como por exemplo, sacarose e frutose. A frutose é um açúcar excepcionalmente lipogênico (Ter Horst e Serlie, 2017). Foi demonstrado que o consumo crônico de frutose promove mecanismos que regulam positivamente o programa de lipogênese hepática, incluindo o SREPB-1c (Ter Horst e Serlie, 2017). Mukai e colaboradores (2013) demonstraram que a ingestão de baixa dose de frutose (10% na água *ad libitum*) durante a gestação, induziu aumento dos níveis de expressão gênica e proteica de SREBP-1c no fígado de ratas Wistar e da prole F1 de fetos com 20 dias de gestação. Nesse estudo, o consumo de frutose também induziu no fígado materno: aumento dos níveis de mRNA de *FAS* (gene alvo de SREBP-1c), redução dos níveis de mRNA de acil-CoA oxidase (primeira enzima da β -oxidação peroxissomal) e acúmulo de gotículas lipídicas, sugerindo que a ingestão de frutose durante a gestação levou ao aumento da lipogênese de novo através do aumento da expressão de SREBP-1c e de genes alvo lipogênicos (Mukai *et al.*,

2013). Além disso, estudo relatou elevada lipogênese de novo em humanos com NAFLD (Lambert *et al.*, 2014). Estes relatos são consistentes com nossos achados em progenitoras G0-DH que apresentaram esteatose microvesicular intensa juntamente com elevada expressão de mRNA de *Srebp1c*. Os dados da literatura juntamente com os nossos reforçam a nossa hipótese de que a dieta hiperlipídica materna pode atuar como um desregulador transgeracional do metabolismo hepático de lipídeos.

Estudos da literatura (Van Rooyen *et al.*, 2011; Kerr e Davidson, 2012; Tomita *et al.*, 2014) relataram que a NAFLD induzida por hipercolesterolemia é caracterizada pelo acúmulo de colesterol hepático, aumento da síntese de colesterol e alterada expressão de genes envolvidos no metabolismo de colesterol, o que contribui para a progressão da doença. No presente estudo, foi observado que a dieta hiperlipídica materna não alterou a concentração sérica de colesterol total, no entanto, aumentou o teor de colesterol hepático e os níveis de expressão de mRNA de *Hmgcr* e *Ldlr* em progenitoras G0-DH, sugerindo que a dieta hiperlipídica materna desregulou o metabolismo hepático de colesterol, o que pode ter contribuído para o desenvolvimento da NAFLD nesse grupo. Nossos achados são consistentes com o estudo de Kim e Kwon (2016). Neste trabalho, foi relatado que genitoras expostas à dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação apresentaram aumento dos níveis séricos de colesterol, dos níveis de triglicérides hepáticos e dos níveis de mRNA de *Srebp2* e *Ldlr* em relação ao grupo controle, indicando que a dieta hiperlipídica materna alterou a homeostase do metabolismo de colesterol em genitoras (Kim e Kwon, 2016), similar ao observado no grupo G0-DH do presente estudo.

Estudo anterior de nosso laboratório (Barbosa, 2018), utilizando o mesmo protocolo do presente estudo, mostrou aumento dos níveis séricos de colesterol total na prole F2-DH, mesmo esta tendo sido alimentada com dieta controle após o desmame. No presente estudo, foi visto que a prole F2-DH apresentou redução dos níveis de mRNA de *Hmgcr* e níveis similares de colesterol hepático e de mRNA de *Ldlr*, apesar de ter apresentado aumento dos níveis séricos de colesterol total, sugerindo um sistema de *feedback* negativo em resposta a exposição ao ambiente hipercolesterolêmico hepático no início da vida da geração F1. Nossos achados são consistentes com o estudo de Benatti e colaboradores (2014) que descreveu resultados similares no início da vida da prole F1 alimentada com dieta controle após desmame. Os autores demonstraram que camundongos de genitoras alimentadas com dieta hiperlipídica apresentaram reduzida expressão gênica de *Hmgcr* em relação ao grupo controle, no entanto, o nível sérico de

colesterol foi maior em vez de menor (Benatti *et al.*, 2014). De forma complementar, Kim e Kwon (2016) relataram que a prole F1 de genitoras alimentadas com dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação apresentou aumento dos níveis séricos de colesterol, apesar de ter exibido níveis similares de colesterol hepático e de mRNA de *Srebp2* e *Ldlr* (Kim e Kwon, 2016). Os resultados da literatura juntamente com os nossos reforçam a nossa hipótese de que a dieta hiperlipídica materna pode atuar como um desregulador transgeracional do metabolismo hepático de colesterol.

Estudo prévio da literatura (Luo *et al.*, 2006) relatou que fatores nutricionais desempenham um importante papel na programação da suscetibilidade da prole ao estresse oxidativo e distúrbios relacionados à gestação. A programação do estresse oxidativo durante períodos críticos de desenvolvimento pode atuar diretamente através da modulação da expressão gênica ou indiretamente através dos efeitos adversos de moléculas oxidadas, como lipídeos e proteínas (Luo *et al.*, 2006). No presente estudo, a dieta hiperlipídica materna levou a dano oxidativo hepático evidenciado pela peroxidação lipídica, como mostrado pelas altas concentrações de TBARS tanto em progenitoras G0-DH quanto na prole F2-DH. Em adição, nossos dados mostraram que o grupo G0-DH apresentou aumento da atividade da SOD, sugerindo aumento da defesa antioxidante em resposta ao aumento da produção de ROS, como resultado do consumo materno de dieta hiperlipídica. Esses dados são consistentes com trabalho anterior de nosso laboratório (Zacarias *et al.*, 2017) que demonstrou que a mesma dieta hiperlipídica utilizada no presente estudo também aumentou a atividade da SOD e induziu dano oxidativo, como indicado pelas altas concentrações de TBARS e proteínas carboniladas no fígado de ratos com 90 dias de idade.

Nossos dados estão de acordo com os resultados de Kim e Kwon (2016) que demonstraram aumento dos níveis séricos e hepáticos de peróxidos lipídicos e redução dos níveis de mRNA de enzimas hepáticas envolvidas na capacidade antioxidante celular em genitoras alimentadas com dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação (Kim e Kwon, 2016). Adedeji e colaboradores (2019) também relataram que a dieta hiperlipídica materna induziu aumento na concentração de peroxidação lipídica e redução da concentração de glutatona reduzida no fígado de progenitoras G0 e na prole F2 de ratos alimentados com dieta controle por nove semanas após o desmame. Em adição, a prole F2 de progenitoras alimentadas com dieta hiperlipídica também apresentou redução da relação glutatona reduzida/glutatona oxidada, indicando que o dano oxidativo ocorrido *in utero* e durante o aleitamento materno da F1 foi transmitido

à F2 (Adedeji *et al.*, 2019). No entanto, uma importante consideração a se fazer sobre este estudo, trata-se do tempo de exposição à dieta hiperlipídica: a G0 foi alimentada com dieta hiperlipídica por nove semanas antes da gestação e lactação, a F1 foi continuamente alimentada com dieta hiperlipídica e a F2 foi alimentada com dieta hiperlipídica durante a amamentação (total de 217 dias). Neste sentido, o efeito da dieta hiperlipídica materna da G0 na F2 não pôde ser distinguido da alimentação da G0 (antes da gestação), F1 e F2. No presente estudo, a G0 foi alimentada com dieta hiperlipídica apenas durante o acasalamento, a gestação e a lactação (total de 59 dias), a F1 e F2 receberam dieta controle após o desmame, indicando que o dano oxidativo hepático observado na F2 pode ser atribuído ao efeito da dieta hiperlipídica materna da G0.

O dano oxidativo observado na prole F2-DH deste estudo pode ter sido induzido pela sobrecarga do processo de β -oxidação em resposta ao quadro de resistência à insulina, que aumenta a liberação de ácidos graxos do tecido adiposo (lipólise) para o fígado, como evidenciado pelo aumento dos níveis de mRNA de *Hadh*. Nossa hipótese fundamenta-se no relato de que no estado de resistência à insulina, o aumento de ácidos graxos no fígado pode sobrecarregar o processo de β -oxidação, resultando em disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e superprodução de ROS (Oliveira *et al.*, 2016).

Baseado nas evidências que a produção excessiva de ROS e alterado balanço redox promove o acúmulo de lipídeos hepáticos (Musso *et al.*, 2010; Spahis *et al.*, 2017) e resistência molecular à insulina (Evans *et al.*, 2005), nossos dados sugerem que o estresse oxidativo induzido pela dieta hiperlipídica materna pode ter contribuído para a resistência à insulina hepática e acúmulo lipídico observados em progenitoras G0-DH e na prole F2-DH.

A desregulação de sirtuínas é um mediador bem estabelecido para o desenvolvimento de doenças metabólicas (Nguyen *et al.*, 2016). Em nosso modelo animal, a dieta hiperlipídica materna induziu baixa expressão de mRNA de *Sirt1*, *Sirt2*, *Sirt3* e *Sirt7* tanto em progenitoras G0-DH quanto na prole F2-DH. Além disso, na prole F2-DH, a dieta hiperlipídica materna também induziu baixa expressão de mRNA de *Sirt5* e *Sirt6*. No entanto, a dieta hiperlipídica materna não alterou os níveis de mRNA de *Sirt4*, *Sirt5* e *Sirt6* no grupo G0-DH e de *Sirt4* no grupo F2-DH. Nossos dados sugerem que a dieta hiperlipídica materna durante períodos críticos de desenvolvimento pode programar um perfil particular de expressão gênica de sirtuínas (*Sirt1*, 2, 3 e 7) no fígado da G0-DH que persiste até a F2-DH, o que pode estar relacionado aos distúrbios metabólicos na vida adulta da F2-DH, sugerindo que a família de sirtuínas pode ser um

potencial biomarcador precoce da suscetibilidade às doenças metabólicas. Os resultados do presente estudo são consistentes com os achados em relação à prole F1 de Borengasser e colaboradores (2011) que também relataram reduzida expressão gênica de *Sirt2*, *Sirt3*, *Sirt6* e *Sirt7* no fígado de descendentes machos F1 de genitoras obesas alimentadas com dieta hipercalórica antes do acasalamento e durante a gestação (Borengasser *et al.*, 2011).

Nossos dados também são corroborados por outros estudos da literatura (Borengasser *et al.*, 2014; Bruce *et al.*, 2016; Nguyen *et al.*, 2019). Borengasser e colaboradores (2014) relataram reduzida expressão gênica hepática de *Sirt1* e *Ppara* na prole F1 de genitoras obesas alimentadas com dieta hipercalórica antes do acasalamento e durante a gestação, indicando que as vias reguladoras do metabolismo hepático de lipídeos (SIRT1 e PPAR α) foram comprometidas pela obesidade materna (Borengasser *et al.*, 2014). Bruce e colaboradores (2016) demonstraram que a prole F1 de genitoras alimentadas com dieta hiperlipídica desenvolveu NASH por meio da reduzida expressão gênica hepática de *Sirt1* e *Sirt3* e da elevada expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico, como *Srebp1c* (Bruce *et al.*, 2016). Isso é consistente com nossos achados em progenitoras G0-DH que apresentaram NAFLD juntamente com reduzida expressão gênica de *Sirt1* e *Sirt3* e elevada expressão gênica de *Srebp1c*. De fato, *Sirt1* pode inibir a expressão de genes envolvidos na síntese lipídica, como *Srebp-1c*, *Acc* e *Fas*, atenuando a esteatose hepática (Yamazaki *et al.*, 2009; Ponugoti *et al.*, 2010).

Nguyen e colaboradores (2019) desenvolveram um modelo animal de superexpressão sistêmica de SIRT1 nos descendentes F1 de genitoras alimentadas com dieta hiperlipídica por seis semanas antes do acasalamento e durante a gestação e lactação. Este modelo foi produzido pelo acasalamento de camundongas C57BL/6 *wild-type* com camundongos transgênicos hemizigóticos para gerar descendentes F1 que superexpressam SIRT1 sem modificação genotípica materna. Foi demonstrado que a superexpressão perinatal de SIRT1 resultou na atenuação de desordens metabólicas na prole F1, como resultado do consumo materno de dieta hiperlipídica. Os autores desse recente estudo (Nguyen *et al.*, 2019) relataram que a superexpressão perinatal de SIRT1 preveniu a intolerância à glicose e normalizou os níveis plasmáticos de insulina através da reversão da expressão proteica de AKT, mas não de outros componentes da via de sinalização da insulina (INSR e GLUT2), indicando que a superexpressão de SIRT1 regulou a sensibilidade à insulina hepática por meio de um mecanismo dependente de AKT. Nguyen e colaboradores (2019) também demonstraram que a superexpressão

perinatal de SIRT1 reduziu os níveis de triglicérides no fígado da prole F1 de genitoras alimentadas com dieta hiperlipídica por meio da supressão da expressão proteica de SREBP-1c, indicando redução da lipotoxicidade via mecanismo inibitório da lipogênese de novo. Os autores desse estudo (Nguyen *et al.*, 2019) ainda relataram que a superexpressão de SIRT1 na prole F1 aumentou a expressão gênica de enzimas antioxidantes hepáticas (glutathiona peroxidase e catalase), refletindo aumento da defesa antioxidante em resposta ao aumento da produção de ROS, resultante do consumo materno de dieta hiperlipídica. Os resultados em conjunto desse estudo sugerem que a superexpressão de SIRT1 nos primeiros períodos de desenvolvimento pode reprogramar distúrbios metabólicos na prole F1 em resposta a alimentação materna com dieta hiperlipídica (Nguyen *et al.*, 2019).

De forma complementar, Borengasser e colaboradores (2011) relataram que os mecanismos que levaram ao desenvolvimento de esteatose hepática em descendentes machos F1 de genitoras obesas envolveram: redução da expressão hepática de SIRT3 (mRNA e proteína), redução da expressão proteica e hiperacetilação da LCAD (enzima chave envolvida na β -oxidação que é regulada pela SIRT3), resultando em redução da atividade desacetilase de SIRT3 e subsequente diminuição da β -oxidação hepática (Borengasser *et al.*, 2011). Além disso, Qiu e colaboradores (2010) relataram que a SIRT3 reduziu os níveis celulares de ROS via SOD2. Mecanicamente, os autores demonstraram que a SIRT3 desacetilou a SOD2, o que promoveu a sua atividade antioxidante e levou a redução do dano oxidativo, indicando que a SIRT3 desempenha um importante papel na regulação da defesa antioxidante celular (Qiu *et al.*, 2010). Os dados da literatura juntamente com os nossos reforçam a nossa hipótese de que as sirtuínas estão envolvidas nos mecanismos transgeracionais que levam à desregulação metabólica hepática na prole F2.

Até a presente data não há relatos na literatura sobre o efeito da dieta hiperlipídica materna na expressão hepática das sete sirtuínas na F2. Neste sentido, o presente estudo mostra pela primeira vez que o consumo materno de dieta hiperlipídica apenas durante os períodos críticos de desenvolvimento leva à disfunção metabólica hepática na vida adulta da F2, em parte, pela desregulação da sinalização de sirtuínas.

Em resumo, nossos achados sugerem que a dieta hiperlipídica materna desregulou o metabolismo hepático, levando a distúrbios metabólicos, como hiperglicemia de jejum, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, além de resistência à insulina hepática, NAFLD e estresse oxidativo hepático em progenitoras G0-DH. Essas

alterações metabólicas foram desencadeadas pelo prejuízo na via de sinalização da insulina hepática, pelo aumento da gliconeogênese, glicogenólise, lipogênese de novo, síntese de colesterol, do acúmulo de triglicérides e colesterol hepático, da peroxidação lipídica e da redução da expressão gênica de sirtuínas (*Sirt1*, *Sirt2*, *Sirt3* e *Sirt7*) envolvidas na regulação da homeostase metabólica hepática. Interessantemente, essa desregulação metabólica da G0 foi transmitida à F2, apesar de ambas as F1 e F2 não terem sido alimentadas com a dieta hiperlipídica. No entanto, a prole F2-DH, além dos distúrbios metabólicos das progenitoras G0-DH, também apresentou intolerância à glicose, hipercolesterolemia e dano hepático. Esta disfunção metabólica envolveu aumento da β -oxidação ao invés da lipogênese de novo, redução da síntese de colesterol ao invés de aumento e redução da expressão gênica de *Sirt5* e *Sirt6*, além de redução da expressão gênica de *Sirt1*, *Sirt2*, *Sirt3* e *Sirt7* como nas progenitoras G0-DH.

Nossos dados podem ser utilizados como evidências convincentes para a prevenção e intervenção de doenças metabólicas desde o início da vida. Uma questão que resta a ser respondida é o mecanismo que leva à desregulação metabólica hepática na F2 em resposta a exposição à dieta hiperlipídica durante o acasalamento, a gestação e a lactação da G0. Mecanismos epigenéticos, como eventos de metilação do promotor do gene, podem estar envolvidos nesse processo. Isso precisa ser estudado.

8. CONCLUSÃO

Nossos achados sugerem que o consumo de dieta hiperlipídica durante o acasalamento, a gestação e a amamentação induz desregulação metabólica hepática na G0 que leva a distúrbios metabólicos que persistem até a F2, indicando que a dieta hiperlipídica materna atuou como um desregulador metabólico hepático transgeracional na F2. Nossos dados reforçam a importância da nutrição materna para a saúde da segunda geração de descendentes.

9. PERSPECTIVAS

Em animais G0-DC, G0-DH, F2-DC e F2-DH:

1. Quantificar os níveis de lipídeos hepáticos pela técnica *oil red*;
2. Identificar o status de metilação de cada sítio CpG da região promotora dos genes *Akt2*; *Pepck*, *Gp*, *Ppara*, *Srebp1c*, *Hmgcr*, *Sirt1* e *Sirt3* pela técnica Bissulfito-Sequenciamento.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEDEJI, T. G.; FASANMADE, A. A.; OLAPADE-OLAOPA, E. O. Dietary intake of parents affects antioxidant activity and inflammatory status in F2 offspring. **Life Sci**, v. 222, p. 53-59, Apr 2019. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30825544> >.

AGIUS, L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. **Biochem J**, v. 414, n. 1, p. 1-18, Aug 2008. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18651836> >.

_____. Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. **Mol Aspects Med**, v. 46, p. 34-45, Dec 2015. ISSN 1872-9452. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26519772> >.

AMEER, F. et al. De novo lipogenesis in health and disease. **Metabolism**, v. 63, n. 7, p. 895-902, Jul 2014. ISSN 1532-8600. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24814684> >.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Res**, v. 64, n. 15, p. 5245-50, Aug 2004. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15289330> >.

ARAB, J. P.; ARRESE, M.; TRAUNER, M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Annu Rev Pathol**, v. 13, p. 321-350, 01 2018. ISSN 1553-4014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29414249> >.

ARGO, C. K. et al. Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. **J Hepatol**, v. 51, n. 2, p. 371-9, Aug 2009. ISSN 1600-0641. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19501928> >.

ASHINO, N. G. et al. Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. **J Nutr Biochem**, v. 23, n. 4, p. 341-8, Apr 2012. ISSN 1873-4847. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21543214> >.

ASHRAF, N. U.; ALTAF, M. Epigenetics: An emerging field in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **Mutat Res**, v. 778, p. 1-12, 2018 Oct - Dec 2018. ISSN 1873-135X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30454678> >.

ASHRAF, N. U.; SHEIKH, T. A. Endoplasmic reticulum stress and Oxidative stress in the pathogenesis of Non-alcoholic fatty liver disease. **Free Radic Res**, v. 49, n. 12, p. 1405-18, 2015. ISSN 1029-2470. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26223319> >.

BARBOSA, CLAUDIANE MARIA. Efeitos da exposição de ratas à dieta hiperlipídica sobre parâmetros cardiometabólicos das proles F1 e F2 [manuscrito] / Claudiane Maria Barbosa. - 2018. Orientadora: Profa. Andréia Carvalho Alzamora. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

BARKER, D. J. Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. **Nutrition**, v. 13, n. 9, p. 807-13, Sep 1997. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9290095> >.

_____. The origins of the developmental origins theory. **J Intern Med**, v. 261, n. 5, p. 412-7, May 2007. ISSN 0954-6820. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17444880> >.

BARKER, D. J. et al. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. **Lancet**, v. 341, n. 8850, p. 938-41, Apr 1993. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8096277> >.

BENATTI, R. O. et al. Maternal high-fat diet consumption modulates hepatic lipid metabolism and microRNA-122 (miR-122) and microRNA-370 (miR-370) expression in offspring. **Br J Nutr**, v. 111, n. 12, p.

2112-22, Jun 2014. ISSN 1475-2662. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24666709> >.

BENKOVIC, S. J.; DEMAINE, M. M. Mechanism of action of fructose 1,6-bisphosphatase. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**, v. 53, p. 45-82, 1982. ISSN 0065-258X. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6277165> >.

BESSONE, F.; RAZORI, M. V.; ROMA, M. G. Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression. **Cell Mol Life Sci**, v. 76, n. 1, p. 99-128, Jan 2019. ISSN 1420-9071. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30343320> >.

BIGGS, W. H. et al. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 13, p. 7421-6, Jun 1999. ISSN 0027-8424. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10377430> >.

BORENGASSER, S. J. et al. High fat diet and in utero exposure to maternal obesity disrupts circadian rhythm and leads to metabolic programming of liver in rat offspring. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e84209, 2014. ISSN 1932-6203. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24416203> >.

_____. Maternal obesity during gestation impairs fatty acid oxidation and mitochondrial SIRT3 expression in rat offspring at weaning. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e24068, 2011. ISSN 1932-6203. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21901160> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. **Cell Metab**, v. 7, n. 2, p. 95-6, Feb 2008. ISSN 1550-4131. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18249166> >.

BRUCE, K. D. et al. Altered cellular redox status, sirtuin abundance and clock gene expression in a mouse model of developmentally primed NASH. **Biochim Biophys Acta**, v. 1861, n. 7, p. 584-93, Jul 2016. ISSN 0006-3002. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27040510> >.

BRUMBAUGH, D. E.; FRIEDMAN, J. E. Developmental origins of nonalcoholic fatty liver disease. **Pediatr Res**, v. 75, n. 1-2, p. 140-7, Jan 2014. ISSN 1530-0447. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24192698> >.

BRUNT, E. M. et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. **Am J Gastroenterol**, v. 94, n. 9, p. 2467-74, Sep 1999. ISSN 0002-9270. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10484010> >.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302-10, 1978. ISSN 0076-6879. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/672633> >.

BUGIANESI, E.; MCCULLOUGH, A. J.; MARCHESINI, G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. **Hepatology**, v. 42, n. 5, p. 987-1000, Nov 2005. ISSN 0270-9139. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16250043> >.

CAMPIÓN, J.; MILAGRO, F.; MARTÍNEZ, J. A. Epigenetics and obesity. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 94, p. 291-347, 2010. ISSN 1878-0814. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21036330> >.

CARRACEDO, A.; CANTLEY, L. C.; PANDOLFI, P. P. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 4, p. 227-32, 04 2013. ISSN 1474-1768. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23446547> >.

CHALKIADAKI, A.; GUARENTE, L. Sirtuins mediate mammalian metabolic responses to nutrient availability. **Nat Rev Endocrinol**, v. 8, n. 5, p. 287-96, Jan 2012. ISSN 1759-5037. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22249520> >.

CHAO, H. W. et al. Homeostasis of Glucose and Lipid in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 2, Jan 2019. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30642126> >.

CHRISTENSEN, B. C. et al. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. **PLoS Genet**, v. 5, n. 8, p. e1000602, Aug 2009. ISSN 1553-7404. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19680444> >.

CHRISTENSEN, B. C.; MARSIT, C. J. Epigenomics in environmental health. **Front Genet**, v. 2, p. 84, 2011. ISSN 1664-8021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22303378> >.

COHEN, J. C.; HORTON, J. D.; HOBBS, H. H. Human fatty liver disease: old questions and new insights. **Science**, v. 332, n. 6037, p. 1519-23, Jun 2011. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21700865> >.

CORCOS, L.; LE JOSSIC-CORCOS, C. Statins: perspectives in cancer therapeutics. **Dig Liver Dis**, v. 45, n. 10, p. 795-802, Oct 2013. ISSN 1878-3562. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23490341> >.

DE CASTRO, U. G. et al. Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats. **Lipids Health Dis**, v. 12, p. 136, Sep 2013. ISSN 1476-511X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24044579> >.

DE CASTRO, UBERDAN GUILHERME MENDES. Tratamento com HP β CD/Ang-(1-7) reverte distúrbios da síndrome metabólica através da redução do processo inflamatório do tecido adiposo, da melhora da via da insulina e do aumento da termogênese adaptativa [manuscrito] / Uberdan Guilherme Mendes de Castro. - 2015. Orientadora: Profa. Andréia Carvalho Alzamora. **Tese (Doutorado)** - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica. Disponível em: < <https://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/6454> >.

DENECHAUD, P. D. et al. ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. **J Clin Invest**, v. 118, n. 3, p. 956-64, Mar 2008. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18292813> >.

DING, R. B.; BAO, J.; DENG, C. X. Emerging roles of SIRT1 in fatty liver diseases. **Int J Biol Sci**, v. 13, n. 7, p. 852-867, 2017. ISSN 1449-2288. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28808418> >.

DOS SANTOS PEREZ, G. et al. MATERNAL AND POST-WEANING EXPOSURE TO A HIGH FAT DIET PROMOTES VISCERAL OBESITY AND HEPATIC STEATOSIS IN ADULT RATS. **Nutr Hosp**, v. 32, n. 4, p. 1653-8, Oct 2015. ISSN 1699-5198. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26545531> >.

EBERLÉ, D. et al. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 839-48, Nov 2004. ISSN 0300-9084. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15589694> >.

EVANS, J. L.; MADDUX, B. A.; GOLDFINE, I. D. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, n. 7-8, p. 1040-52, 2005 Jul-Aug 2005. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15998259> >.

FABBRINI, E.; SULLIVAN, S.; KLEIN, S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. **Hepatology**, v. 51, n. 2, p. 679-89, Feb 2010. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20041406> >.

FANG, Y. L. et al. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: From "two hit theory" to "multiple hit model". **World J Gastroenterol**, v. 24, n. 27, p. 2974-2983, Jul 2018. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30038464> >.

FANTE, T. et al. Diet-Induced Maternal Obesity Alters Insulin Signalling in Male Mice Offspring Rechallenged with a High-Fat Diet in Adulthood. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. e0160184, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27479001> >.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, May 1957. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13428781> >.

GOHARKHAY, N. et al. Maternal hypercholesterolemia leads to activation of endogenous cholesterol synthesis in the offspring. **Am J Obstet Gynecol**, v. 199, n. 3, p. 273.e1-6, Sep 2008. ISSN 1097-6868. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18771980> >.

GROSS, D. N.; WAN, M.; BIRNBAUM, M. J. The role of FOXO in the regulation of metabolism. **Curr Diab Rep**, v. 9, n. 3, p. 208-14, Jun 2009. ISSN 1539-0829. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19490822> >.

GUAL, P.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; TANTI, J. F. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. **Biochimie**, v. 87, n. 1, p. 99-109, Jan 2005. ISSN 0300-9084. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15733744> >.

GUARENTE, L. Sirtuins, aging, and metabolism. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 76, p. 81-90, 2011. ISSN 1943-4456. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22114328> >.

HAEUSLER, R. A.; KAESTNER, K. H.; ACCILI, D. FoxOs function synergistically to promote glucose production. **J Biol Chem**, v. 285, n. 46, p. 35245-8, Nov 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20880840> >.

HAIGIS, M. C.; SINCLAIR, D. A. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. **Annu Rev Pathol**, v. 5, p. 253-95, 2010. ISSN 1553-4014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20078221> >.

HAN, H. S. et al. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. **Exp Mol Med**, v. 48, p. e218, Mar 2016. ISSN 2092-6413. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26964834> >.

HE, X. Y.; YANG, S. Y.; SCHULZ, H. Assay of L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase with substrates of different chain lengths. **Anal Biochem**, v. 180, n. 1, p. 105-9, Jul 1989. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2817332> >.

HERSHBERGER, K. A.; MARTIN, A. S.; HIRSCHEY, M. D. Role of NAD. **Nat Rev Nephrol**, v. 13, n. 4, p. 213-225, 04 2017. ISSN 1759-507X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28163307> >.

HERSKOVITS, A. Z.; GUARENTE, L. Sirtuin deacetylases in neurodegenerative diseases of aging. **Cell Res**, v. 23, n. 6, p. 746-58, Jun 2013. ISSN 1748-7838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23689277> >.

HERZIG, S. et al. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 179-83, Sep 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11557984> >.

HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **J Clin Invest**, v. 109, n. 9, p. 1125-31, May 2002. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11994399> >.

HOUTKOOPEL, R. H.; PIRINEN, E.; AUWERX, J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 4, p. 225-238, Mar 2012. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22395773> >.

HU, L. et al. The hepatic uptake of VLDL in Irf-1/-Irf-1 mice is regulated by LPL activity and involves proteoglycans and SR-BI. **J Lipid Res**, v. 49, n. 7, p. 1553-61, Jul 2008. ISSN 0022-2275. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18367731> >.

HUANG, J.; MANNING, B. D. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. **Biochem Soc Trans**, v. 37, n. Pt 1, p. 217-22, Feb 2009. ISSN 1470-8752. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19143635> >.

HUANG, Y. et al. Maternal high-fat diet during pregnancy and lactation affects hepatic lipid metabolism in early life of offspring rat. **J Biosci**, v. 42, n. 2, p. 311-319, Jun 2017. ISSN 0973-7138. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28569254> >.

HUANG, Y. H. et al. Maternal high-fat diet impairs glucose metabolism, β -cell function and proliferation in the second generation of offspring rats. **Nutr Metab (Lond)**, v. 14, p. 67, 2017. ISSN 1743-7075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29118817> >.

HUBBARD, S. R. The insulin receptor: both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, n. 3, p. a008946, Mar 2013. ISSN 1943-0264. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23457259> >.

JAMES, O. F.; DAY, C. P. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): a disease of emerging identity and importance. **J Hepatol**, v. 29, n. 3, p. 495-501, Sep 1998. ISSN 0168-8278. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9765002> >.

JIANG, W. et al. Acetylation regulates gluconeogenesis by promoting PEPCK1 degradation via recruiting the UBR5 ubiquitin ligase. **Mol Cell**, v. 43, n. 1, p. 33-44, Jul 2011. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21726808> >.

KELLY, G. A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: part 1. **Altern Med Rev**, v. 15, n. 3, p. 245-63, Sep 2010. ISSN 1089-5159. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21155626> >.

KERELIUK, S. M.; BRAWERMAN, G. M.; DOLINSKY, V. W. Maternal Macronutrient Consumption and the Developmental Origins of Metabolic Disease in the Offspring. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 7, Jul 2017. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28684678> >.

KERR, T. A.; DAVIDSON, N. O. Cholesterol and nonalcoholic fatty liver disease: renewed focus on an old villain. **Hepatology**, v. 56, n. 5, p. 1995-8, Nov 2012. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23115010> >.

KIM, J.; KWON, Y. H. Effects of disturbed liver growth and oxidative stress of high-fat diet-fed dams on cholesterol metabolism in offspring mice. **Nutr Res Pract**, v. 10, n. 4, p. 386-92, Aug 2016. ISSN 1976-1457. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27478544> >.

KIM, J. K.; SAMARANAYAKE, M.; PRADHAN, S. Epigenetic mechanisms in mammals. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 4, p. 596-612, Feb 2009. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18985277> >.

KNOTTNERUS, S. J. G. et al. Disorders of mitochondrial long-chain fatty acid oxidation and the carnitine shuttle. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 19, n. 1, p. 93-106, 03 2018. ISSN 1573-2606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29926323> >.

KURYLOWICZ, A. In Search of New Therapeutic Targets in Obesity Treatment: Sirtuins. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 4, Apr 2016. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27104517> >.

LAMBERT, J. E. et al. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 146, n. 3, p. 726-35, Mar 2014. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24316260> >.

LAURENT, G. et al. SIRT4 represses peroxisome proliferator-activated receptor α activity to suppress hepatic fat oxidation. **Mol Cell Biol**, v. 33, n. 22, p. 4552-61, Nov 2013. ISSN 1098-5549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24043310> >.

LECOUTRE, S. et al. Transgenerational Epigenetic Mechanisms in Adipose Tissue Development. **Trends Endocrinol Metab**, v. 29, n. 10, p. 675-685, 10 2018. ISSN 1879-3061. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30104112> >.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 464-78, 1990. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1978225> >.

_____. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 346-57, 1994. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8015469> >.

LI, J. et al. Accumulation of endoplasmic reticulum stress and lipogenesis in the liver through generational effects of high fat diets. **J Hepatol**, v. 56, n. 4, p. 900-7, Apr 2012. ISSN 1600-0641. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22173165> >.

LI, Y. et al. Hepatic SIRT1 attenuates hepatic steatosis and controls energy balance in mice by inducing fibroblast growth factor 21. **Gastroenterology**, v. 146, n. 2, p. 539-49.e7, Feb 2014. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24184811> >.

LIN, H. V.; ACCILI, D. Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease. **Cell Metab**, v. 14, n. 1, p. 9-19, Jul 2011. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21723500> >.

LOMAS-SORIA, C. et al. Maternal obesity has sex-dependent effects on insulin, glucose and lipid metabolism and the liver transcriptome in young adult rat offspring. **J Physiol**, v. 596, n. 19, p. 4611-4628, Oct 2018. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29972240> >.

LOPASCHUK, G. D. et al. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. **Physiol Rev**, v. 90, n. 1, p. 207-58, Jan 2010. ISSN 1522-1210. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20086077> >.

LUO, Z. C. et al. Tracing the origins of "fetal origins" of adult diseases: programming by oxidative stress? **Med Hypotheses**, v. 66, n. 1, p. 38-44, 2006. ISSN 0306-9877. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16198060> >.

MADESH, M.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. **Indian J Biochem Biophys**, v. 35, n. 3, p. 184-8, Jun 1998. ISSN 0301-1208. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9803669> >.

MATTHEWS, D. R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412-9, Jul 1985. ISSN 0012-186X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3899825> >.

MCCURDY, C. E. et al. Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. **J Clin Invest**, v. 119, n. 2, p. 323-35, Feb 2009. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19147984> >.

MCGARRY, J. D.; MANNAERTS, G. P.; FOSTER, D. W. A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. **J Clin Invest**, v. 60, n. 1, p. 265-70, Jul 1977. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/874089> >.

MILIĆ, S.; STIMAC, D. Nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation and treatment. **Dig Dis**, v. 30, n. 2, p. 158-62, 2012. ISSN 1421-9875. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22722431> >.

MODI, N. et al. The influence of maternal body mass index on infant adiposity and hepatic lipid content. **Pediatr Res**, v. 70, n. 3, p. 287-91, Sep 2011. ISSN 1530-0447. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21629154> >.

MORIGI, M.; PERICO, L.; BENIGNI, A. Sirtuins in Renal Health and Disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 29, n. 7, p. 1799-1809, Jul 2018. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29712732> >.

MORRIS, B. J. Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. **Free Radic Biol Med**, v. 56, p. 133-71, Mar 2013. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23104101> >.

MUKAI, Y.; KUMAZAWA, M.; SATO, S. Fructose intake during pregnancy up-regulates the expression of maternal and fetal hepatic sterol regulatory element-binding protein-1c in rats. **Endocrine**, v. 44, n. 1, p. 79-86, Aug 2013. ISSN 1559-0100. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23065593> >.

MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Non-alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: an update. **Obes Rev**, v. 11, n. 6, p. 430-45, Jun 2010. ISSN 1467-789X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19845871> >.

NAKAE, J.; PARK, B. C.; ACCILI, D. Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a Wortmannin-sensitive pathway. **J Biol Chem**, v. 274, n. 23, p. 15982-5, Jun 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10347145> >.

NASRIN, N. et al. SIRT4 regulates fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression in liver and muscle cells. **J Biol Chem**, v. 285, n. 42, p. 31995-2002, Oct 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20685656> >.

NGUYEN, L. T. et al. Sirtuins-mediators of maternal obesity-induced complications in offspring? **FASEB J**, v. 30, n. 4, p. 1383-90, Apr 2016. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26667041> >.

_____. SIRT1 overexpression attenuates offspring metabolic and liver disorders as a result of maternal high-fat feeding. **J Physiol**, v. 597, n. 2, p. 467-480, Jan 2019. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30381838> >.

OH, K. J. et al. CREB and FoxO1: two transcription factors for the regulation of hepatic gluconeogenesis. **BMB Rep**, v. 46, n. 12, p. 567-74, Dec 2013. ISSN 1976-670X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24238363> >.

OHTA, T. et al. Maternal high-fat diet promotes onset of diabetes in rat offspring. **Anim Sci J**, v. 88, n. 1, p. 149-155, Jan 2017. ISSN 1740-0929. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27145882> >.

OLIVEIRA, C. P. et al. Nutrition and Physical Activity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **J Diabetes Res**, v. 2016, p. 4597246, 2016. ISSN 2314-6753. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26770987> >.

PARK, J. et al. SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways. **Mol Cell**, v. 50, n. 6, p. 919-30, Jun 2013. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23806337> >.

PEREIRA, T. J. et al. Maternal obesity characterized by gestational diabetes increases the susceptibility of rat offspring to hepatic steatosis via a disrupted liver metabolome. **J Physiol**, v. 593, n. 14, p. 3181-97, Jul 2015. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25922055> >.

PETERSEN, K. F. et al. The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 31, p. 12587-94, Jul 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17640906> >.

PFLUGER, P. T. et al. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 28, p. 9793-8, Jul 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599449> >.

PILKIS, S. J.; CLAUS, T. H. Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes. **Annu Rev Nutr**, v. 11, p. 465-515, 1991. ISSN 0199-9885. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1892710> >.

PILKIS, S. J.; EL-MAGHRABI, M. R.; CLAUS, T. H. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Annu Rev Biochem**, v. 57, p. 755-83, 1988. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3052289> >.

PONUGOTI, B. et al. SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. **J Biol Chem**, v. 285, n. 44, p. 33959-70, Oct 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20817729> >.

POSTIC, C.; GIRARD, J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. **Diabetes Metab**, v. 34, n. 6 Pt 2, p. 643-8, Dec 2008. ISSN 1262-3636. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19195625> >.

PUPPALA, S. et al. Primate fetal hepatic responses to maternal obesity: epigenetic signalling pathways and lipid accumulation. **J Physiol**, v. 596, n. 23, p. 5823-5837, Dec 2018. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29516496> >.

PURUSHOTHAM, A. et al. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. **Cell Metab**, v. 9, n. 4, p. 327-38, Apr 2009. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19356714> >.

QIU, X. et al. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. **Cell Metab**, v. 12, n. 6, p. 662-7, Dec 2010. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21109198> >.

RAMNANAN, C. J. et al. Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism. **Diabetes Obes Metab**, v. 13 Suppl 1, p. 118-25, Oct 2011. ISSN 1463-1326. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21824265> >.

RAVELLI, G. P.; STEIN, Z. A.; SUSSER, M. W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **N Engl J Med**, v. 295, n. 7, p. 349-53, Aug 1976. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/934222> >.

RIZZA, R. A. Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: implications for therapy. **Diabetes**, v. 59, n. 11, p. 2697-707, Nov 2010. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20705776> >.

RODEN, M. et al. Effects of free fatty acid elevation on postabsorptive endogenous glucose production and gluconeogenesis in humans. **Diabetes**, v. 49, n. 5, p. 701-7, May 2000. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10905476> >.

RONNETT, G. V. et al. Fatty acid metabolism as a target for obesity treatment. **Physiol Behav**, v. 85, n. 1, p. 25-35, May 2005. ISSN 0031-9384. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15878185> >.

RUI, L. Energy metabolism in the liver. **Compr Physiol**, v. 4, n. 1, p. 177-97, Jan 2014. ISSN 2040-4603. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24692138> >.

SAHINI, N.; BORLAK, J. Recent insights into the molecular pathophysiology of lipid droplet formation in hepatocytes. **Prog Lipid Res**, v. 54, p. 86-112, Apr 2014. ISSN 1873-2194. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24607340> >.

SANTOLERI, D.; TITCHENELL, P. M. Resolving the Paradox of Hepatic Insulin Resistance. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**, v. 7, n. 2, p. 447-456, 2019. ISSN 2352-345X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30739869> >.

SCHREURS, M.; KUIPERS, F.; VAN DER LEIJ, F. R. Regulatory enzymes of mitochondrial beta-oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome. **Obes Rev**, v. 11, n. 5, p. 380-8, May 2010. ISSN 1467-789X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19694967> >.

SCHUG, T. T.; LI, X. Sirtuin 1 in lipid metabolism and obesity. **Ann Med**, v. 43, n. 3, p. 198-211, May 2011. ISSN 1365-2060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21345154> >.

SEET, E. L. et al. Maternal high-fat-diet programs rat offspring liver fatty acid metabolism. **Lipids**, v. 50, n. 6, p. 565-73, Jun 2015. ISSN 1558-9307. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25899040> >.

SEMPLE, R. K. et al. Postreceptor insulin resistance contributes to human dyslipidemia and hepatic steatosis. **J Clin Invest**, v. 119, n. 2, p. 315-22, Feb 2009. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19164855> >.

SKOGEN, J. C.; OVERLAND, S. The fetal origins of adult disease: a narrative review of the epidemiological literature. **JRSM Short Rep**, v. 3, n. 8, p. 59, Aug 2012. ISSN 2042-5333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23301147> >.

SONG, D. et al. Androgens are necessary for the development of fructose-induced hypertension. **Hypertension**, v. 43, n. 3, p. 667-72, Mar 2004. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14757778> >.

SPAHIS, S. et al. Oxidative Stress as a Critical Factor in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Pathogenesis. **Antioxid Redox Signal**, v. 26, n. 10, p. 519-541, 04 2017. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27452109> >.

STARLEY, B. Q.; CALCAGNO, C. J.; HARRISON, S. A. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. **Hepatology**, v. 51, n. 5, p. 1820-32, May 2010. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20432259> >.

STEFAN, N.; HÄRING, H. U.; CUSI, K. Non-alcoholic fatty liver disease: causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 7, n. 4, p. 313-324, Apr 2019. ISSN 2213-8595. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30174213> >.

STEFAN, N.; KANTARTZIS, K.; HÄRING, H. U. Causes and metabolic consequences of Fatty liver. **Endocr Rev**, v. 29, n. 7, p. 939-60, Dec 2008. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18723451> >.

SZCZEPANIAK, L. S. et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 288, n. 2, p. E462-8, Feb 2005. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15339742> >.

TAKASAKI, M. et al. Continuous intake of a high-fat diet beyond one generation promotes lipid accumulation in liver and white adipose tissue of female mice. **J Nutr Biochem**, v. 23, n. 6, p. 640-5, Jun 2012. ISSN 1873-4847. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21775120> >.

TANIGUCHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, n. 2, p. 85-96, Feb 2006. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16493415> >.

TER HORST, K. W.; SERLIE, M. J. Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Nutrients**, v. 9, n. 9, Sep 2017. ISSN 2072-6643. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28878197> >.

TITCHENELL, P. M.; LAZAR, M. A.; BIRNBAUM, M. J. Unraveling the Regulation of Hepatic Metabolism by Insulin. **Trends Endocrinol Metab**, v. 28, n. 7, p. 497-505, 07 2017. ISSN 1879-3061. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28416361> >.

TOMITA, K. et al. Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice. **Hepatology**, v. 59, n. 1, p. 154-69, Jan 2014. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23832448> >.

VACCA, M. et al. Fatty Acid and Glucose Sensors in Hepatic Lipid Metabolism: Implications in NAFLD. **Semin Liver Dis**, v. 35, n. 3, p. 250-61, Aug 2015. ISSN 1098-8971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26378642> >.

VAN ABELEN, A. F. et al. Famine exposure in the young and the risk of type 2 diabetes in adulthood. **Diabetes**, v. 61, n. 9, p. 2255-60, Sep 2012. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22648386> >.

VAN ROOYEN, D. M. et al. Hepatic free cholesterol accumulates in obese, diabetic mice and causes nonalcoholic steatohepatitis. **Gastroenterology**, v. 141, n. 4, p. 1393-403, 1403.e1-5, Oct 2011. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21703998> >.

VREDENDAAL, P. J. et al. Human short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase: cloning and characterization of the coding sequence. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 223, n. 3, p. 718-23, Jun 1996. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8687463> >.

WALLACK, L.; THORNBURG, K. Developmental Origins, Epigenetics, and Equity: Moving Upstream. **Matern Child Health J**, v. 20, n. 5, p. 935-40, May 2016. ISSN 1573-6628. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27029539> >.

WANKHADE, U. D. et al. Enhanced offspring predisposition to steatohepatitis with maternal high-fat diet is associated with epigenetic and microbiome alterations. **PLoS One**, v. 12, n. 4, p. e0175675, 2017. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28414763> >.

WATERLAND, R. A. Does nutrition during infancy and early childhood contribute to later obesity via metabolic imprinting of epigenetic gene regulatory mechanisms? **Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program**, v. 56, p. 157-71; discussion 171-4, 2005. ISSN 1661-6677. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16632951> >.

XIAO, C. et al. SIRT6 deficiency results in severe hypoglycemia by enhancing both basal and insulin-stimulated glucose uptake in mice. **J Biol Chem**, v. 285, n. 47, p. 36776-84, Nov 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20847051> >.

YAMAZAKI, Y. et al. Treatment with SRT1720, a SIRT1 activator, ameliorates fatty liver with reduced expression of lipogenic enzymes in MSG mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 297, n. 5, p. E1179-86, Nov 2009. ISSN 1522-1555. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19724016> >.

YAN, S. et al. Long-chain acyl-CoA synthetase in fatty acid metabolism involved in liver and other diseases: an update. **World J Gastroenterol**, v. 21, n. 12, p. 3492-8, Mar 2015. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25834313> >.

YOSHIZAWA, T. et al. SIRT7 controls hepatic lipid metabolism by regulating the ubiquitin-proteasome pathway. **Cell Metab**, v. 19, n. 4, p. 712-21, Apr 2014. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24703702> >.

YOU, M. et al. Sirtuin 1 signaling and alcoholic fatty liver disease. **Hepatobiliary Surg Nutr**, v. 4, n. 2, p. 88-100, Apr 2015. ISSN 2304-3881. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26005675> >.

ZACARIAS, A. C. et al. Swimming training induces liver adaptations to oxidative stress and insulin sensitivity in rats submitted to high-fat diet. **Redox Rep**, v. 22, n. 6, p. 515-523, Nov 2017. ISSN 1743-2928. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28403686> >.

ZEISEL, S. H. Epigenetic mechanisms for nutrition determinants of later health outcomes. **Am J Clin Nutr**, v. 89, n. 5, p. 1488S-1493S, May 2009. ISSN 1938-3207. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19261726> >.

ZHENG, J. et al. Maternal high-fat diet modulates hepatic glucose, lipid homeostasis and gene expression in the PPAR pathway in the early life of offspring. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 9, p. 14967-83, Aug 2014. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25158235> >.

11. ANEXO I



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICES-I, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@ufop.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. 2016/49, intitulado "*Efeitos da exposição de ratos à dieta hiperlipídica e hipercalórica durante a gestação e amamentação sobre parâmetros hemodinâmicos da prole na vida adulta.*", que tem como responsável o/a Prof(a). Dr(a). **Andréia Carvalho Alzamora**, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP - CEUA/UFOP, de acordo com tabela abaixo:

Dados dos Animais Aprovados				
Espécie/Inhagem	N.º de Animais	Idade	Sexo	Procedência
Fisher	332	12 semanas	Macho e fêmeas	CCA

Restrição de dieta: (x) sim () não

Especificar a dieta:

Este Certificado expira em: 11/01/2021

Ouro Preto, 12 de Dezembro de 2016.

Prof.ª Dr.ª Lenice Kappes Becker
Coordenadora da CEUA/UFOP