

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde
Doutorado

JAQUELINE PESSOA PONTES

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL E MOLECULAR
DA TRANSMISSÃO INTERGERACIONAL DA ESTEATOSE
HEPÁTICA EM UM MODELO DE EXPOSIÇÃO MATERNO-
FETAL AO CONSUMO EXCESSIVO DE SACAROSE**

São Luís
2024

JAQUELINE PESSOA PONTES

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL E MOLECULAR
DA TRANSMISSÃO INTERGERACIONAL DA ESTEATOSE
HEPÁTICA EM UM MODELO DE EXPOSIÇÃO MATERNO-
FETAL AO CONSUMO EXCESSIVO DE SACAROSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), com a finalidade de obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes

Co-orientadora: Prof. Dra. Camila de Fátima Carvalho Brito

São Luís

2024

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Pessoa Pontes, Jaqueline.

CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL E MOLECULAR DA
TRANSMISSÃO INTERGERACIONAL DA ESTEATOSE HEPÁTICA EM UM
MODELO DE EXPOSIÇÃO MATERNO-FETAL AO CONSUMO EXCESSIVO DE
SACAROSE / Jaqueline Pessoa Pontes. - 2024.

82 f.

Coorientador(a) 1: Camila de Fátima Carvalho Brito.

Orientador(a): Antonio Marcus de Andrade Paes.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2024.

1. Dohad. 2. Esteatose Hepática. 3. Síndrome
Metabólica. 4. Perigestacional. I. de Andrade Paes,
Antonio Marcus. II. de Fátima Carvalho Brito, Camila.
III. Título.

JAQUELINE PESSOA PONTES

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL E MOLECULAR
DA TRANSMISSÃO INTERGERACIONAL DA ESTEATOSE
HEPÁTICA EM UM MODELO DE EXPOSIÇÃO MATERNO-
FETAL AO CONSUMO EXCESSIVO DE SACAROSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) com a finalidade de obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dra. Cristiane Matté
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Karla Frida Torres Flister
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Lucas Martins França
Universidade Federal do Maranhão

Profª. Dra. Adalgisa de Sousa Paiva Ferreira
Universidade Federal do Maranhão

"Todos os dias determinados para mim foram escritos no teu livro antes de qualquer um deles existir".

Salmos 139:16

Dedico este trabalho aos meus pais
e à minha irmã Janaína, cujo apoio
inabalável acompanharam cada
passo do trajeto até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelo dom da vida. Ao meu orientador, **Marcus Paes**, por toda a orientação, paciência e incentivo ao longo desses anos. Sua dedicação e expertise foram essenciais para que eu pudesse crescer academicamente e pessoalmente durante todo o processo desta tese. À minha coorientadora, **Camila Brito**, expresso minha profunda gratidão pelo suporte técnico e intelectual. Sua contribuição foi de grande importância para a construção deste trabalho, sempre com conselhos valiosos e uma disposição admirável para ajudar em cada etapa.

Agradeço de coração à minha família, em especial meu pai **João Filho** por todo incentivo e palavras positivas ao longo da caminhada, à minha mãe **Maria Antônia**, por todo o apoio emocional, paciência e amor incondicional e à minha irmã **Janaína Pontes**, a quem dedico a minha tese, sua inspiração em resiliência me incentivaram até aqui. Ao meu namorado **Jarlen Ribeiro**, pelo apoio e encorajamento, que me deram a confiança necessária para enfrentar os desafios deste caminho. Vocês estiveram ao meu lado em todos os momentos, proporcionando o suporte necessário para que eu chegasse ao fim desse ciclo, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos, **Júlia, Max, Marlon**, sou grata por todas as palavras de encorajamento e pelas vezes em que me ajudaram a manter a sanidade em meio a tantas responsabilidades. Vocês foram minha base de alegria e leveza durante essa jornada.

Um agradecimento especial à família **Lefisio**. Aos meus colegas que ajudaram diretamente nos experimentos, **Bruno, Rômulo, João Lucas, Thamys, Fernanda, Lucas, Rafael, Nayra, Nathalia, Jonas, Odara, Lúcia, Perla** por toda a colaboração, pelas longas horas de trabalho conjunto e por compartilharem suas experiências e conhecimentos. Sem o apoio de vocês, muitos dos resultados alcançados não seriam possíveis.

Por fim, agradeço às instituições que proporcionaram o suporte necessário para a realização deste estudo: à **Universidade Federal do Maranhão (UFMA)**, por fornecer a infraestrutura e o ambiente acadêmico que permitiram o desenvolvimento desta pesquisa, e às agências de fomento, a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo apoio financeiro e ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS)**.

RESUMO

Condições adversas no metabolismo durante os estágios iniciais da vida estão ligadas a um maior risco de doenças crônicas não transmissíveis, conforme fundamentado no estudo sobre *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD). O consumo excessivo desses açúcares durante a gravidez por parte das mães tem efeitos negativos nos indicadores metabólicos de saúde de seus filhos. A Síndrome Metabólica (SM), que se manifesta no fígado como doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), tem sido associada ao aumento no consumo de açúcares adicionados. Este trabalho busca investigar os mecanismos metabólicos que levam à instalação precoce da esteatose hepática na prole de ratas expostas a uma dieta rica em sacarose (DRS) durante o período perigestacional. Foram utilizadas ratas fêmeas (*Rattus norvegicus*) alimentadas com DRS ou dieta padrão por 12 semanas. A exposição à dieta abrangeu os períodos de pré-concepção, gestação e lactação. Após o desmame, a prole foi alimentada com uma dieta controle, sendo subdividida em dois grupos: os que foram eutanasiados aos 30 ou 90 dias de vida. Foram avaliadas características ponderais, morfológicas e bioquímicas das mães (F0) e descendentes, além de análises moleculares realizadas nos descendentes. A geração F0 DRS no período pré-gestacional apresentou diferenças significativas no peso durante o período perigestacional de forma pontual e menor peso do fígado quando comparado ao grupo CTR, além disso apresentou hipertrigliceridemia, aumento no índice de TyG e no teste oral de tolerância à glicose (GTT). Não foi observado esteatose hepática nas mães. No que se refere a prole (fêmeas e machos) os descendentes das mães DRS apresentaram aumento no peso corporal na prole de machos. A prole de fêmeas expostas à DRS apresentou, aos 30 dias, diferenças significativas no peso dos ovários e pâncreas em comparação ao grupo CTR. Nos machos, aos 30 dias, houve um aumento significativo na gordura periepídídima e, aos 90 dias, na gordura retroperitoneal em relação ao grupo CTR. Ambos os sexos, aos 30 e 90 dias, desenvolveram esteatose hepática. Nas fêmeas, houve aumento dos triglicerídeos hepáticos aos 30 dias e maior acúmulo de gordura no fígado aos 90 dias, enquanto nos machos, aos 90 dias, também foi observado aumento dos triglicerídeos hepáticos. As fêmeas apresentaram maior expressão de genes lipogênicos, como FASN aos 30 e 90 dias e PPAR- γ aos 90 dias, além de genes de beta-oxidação, como PGC1 α e PPAR- α especialmente aos 90 dias. Em contraste, os machos mostraram uma redução na expressão de PPAR- γ . Este estudo revelou que a exposição perigestacional das ratas a uma dieta rica em sacarose causou importantes alterações metabólicas nas mães e seus descendentes, destacando a instalação precoce de esteatose hepática e mudanças na expressão de genes ligados à lipogênese, especialmente nas fêmeas. As respostas adaptativas diferiram entre os sexos, particularmente na regulação de genes lipogênicos e no acúmulo de gordura no fígado. Esses achados reforçam a importância de estratégias preventivas durante o período perigestacional, evidenciando os impactos adversos do consumo excessivo de sacarose na saúde metabólica materna e na programação metabólica da prole, com implicações específicas de sexo.

Palavras-chave: DOHaD; Esteatose hepática; Síndrome metabólica; Perigestacional.

ABSTRACT

Adverse metabolic conditions during early life stages are linked to an increased risk of non-communicable chronic diseases, as established by the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) study. Excessive sugar consumption during pregnancy by mothers negatively affects their offspring's metabolic health indicators. Metabolic Syndrome (MS), which manifests in the liver as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), has been associated with increased consumption of added sugars. This study aims to investigate the metabolic mechanisms leading to the early onset of hepatic steatosis in the offspring of rats exposed to a high-sucrose diet (HSD) during the perigestational period. Female rats (*Rattus norvegicus*) were fed either an HSD or a standard diet for 12 weeks. Diet exposure spanned pre-conception, gestation, and lactation periods. After weaning, the offspring were fed a control diet and divided into two groups: those euthanized at 30 or 90 days of life. Weight, morphological, and biochemical characteristics of the mothers (F0) and offspring were evaluated, along with molecular analyses in the offspring. The F0 HSD generation in the pregestational period showed significant differences in body weight during the perigestational period and lower liver weight compared to the CTR group, along with hypertriglyceridemia, an increase in the TyG index, and in the glucose tolerance test (GTT). Hepatic steatosis was not observed in the mothers. Regarding the offspring (males and females), the male offspring of HSD mothers showed an increase in body weight. The female offspring exposed to HSD showed significant differences in ovary and pancreas weight at 30 days compared to the CTR group. In males, at 30 days, there was a significant increase in periepididymal fat and, at 90 days, in retroperitoneal fat compared to the CTR group. Both sexes, at 30 and 90 days, developed hepatic steatosis. In females, there was an increase in hepatic triglycerides at 30 days and a greater accumulation of liver fat at 90 days, while in males, an increase in hepatic triglycerides was also observed at 90 days. Females showed greater expression of genes involved in de novo lipogenesis, such as FASN at 30 and 90 days, and PPAR- γ , PGC1 α , and PPAR- α at 90 days. In contrast, males showed a reduction in PPAR- γ expression. This study revealed that perigestational exposure to a high-sucrose diet caused significant metabolic changes in the mothers and their offspring, highlighting the early onset of hepatic steatosis and changes in the expression of genes related to lipogenesis, particularly in females. Adaptive responses differed between sexes, especially in the regulation of lipogenic genes and fat accumulation in the liver. Investigating the involved signaling pathways through Western blot analysis is essential to validate and quantify the proteins associated with these genes, elucidating the molecular mechanisms of hepatic steatosis. These findings underscore the importance of preventive strategies during the perigestational period, highlighting the adverse impacts of excessive sucrose consumption on maternal metabolic health and the metabolic programming of offspring, with sex-specific implications.

Keywords: DOHaD; Hepatic steatosis; Metabolic syndrome; Perigestational.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACACA	Acetil-CoA carboxilase
ACLY	ATP-Citrato liase
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AGL	Ácidos graxos livres
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ChoREs	Elemento responsivo a carboidratos
ChREBP	Carbohydrate-responsive element-binding protein
CTR	Controle
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	Doenças cardiovasculares
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM2	Diabetes melito tipo 2
DNL	Lipogênese <i>de novo</i>
DPN	Dia pós-natal
DOHaD	Origens desenvolvimentistas da saúde e doença
DRS	Dieta rica em sacarose
EH	Esteatose hepática
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
FASN	Ácido graxo sintase
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GLUT2	Transporte facilitador de glicose 2
GLUT4	Transportador de glicose tipo 4
GLUT5	Transporte facilitador de glicose 5
GTT	Teste oral de tolerância à glicose
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina e eosina
HFCS	Xarope de milho rico em frutose
IMC	Índice de massa corporal
ITT	Teste oral de tolerância à insulina
IGF-I	Fator de crescimento insulínico tipo 1
IL-6:	Interleucina 6

LPS	Lipopolissacarídeo
NaCl	Cloreto de sódio (salina a 0,9%)
NCEP-ATP III	Painel III de Tratamento de Adultos do Programa Nacional de Educação sobre Colesterol
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Solução tampão salina de fosfato
PGC1 α	Coativador 1 de receptor ativado por peroxissoma 1 alfa
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomas
PPAR α	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa
PPAR γ	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama
RI	Resistência à insulina
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SCD1	Estearoil-CoA desaturase 1
SGLT1	Co-transportador de sódio-glicose 1
SGLT1	Transportador de sódio-glicose 1
SM	Síndrome metabólica
SREBP-1c	Sterol regulatory element-binding protein 1c
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
TLR4	Receptor de Toll-like 4
TNF- α :	Fator de necrose tumoral alfa
VLDL	Lipoproteínas de densidade muito baixa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espectro da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)	23
Figura 2. Lipogênese de <i>novo</i>	25
Figura 3. Esquema do desenho experimental	31
Figura 4. Exposição perigestacional à DRS	38
Figura 5. Parâmetros bioquímicos de ratas na pré-concepção e pós-lactação	39
Figura 6. Análise histológica e do conteúdo de gordura hepática da geração F0	40
Figura 7. Análise histopatológica hepática de mães CTR e DRS	41
Figura 8. Evolução ponderal da prole aos 30 e 90 dias	42
Figura 9. Parâmetros morfométricos de órgãos e tecidos da prole 30 e 90 dias	43
Figura 10. Parâmetros morfométricos de órgãos e tecidos da prole 30 dias	44
Figura 11. Parâmetros bioquímicos da prole 30 e 90 dias	45
Figura 12. Análise histológica e do conteúdo de gordura hepática da Prole fêmeas e machos 30 dias	46
Figura 13. Análise histológica e do conteúdo de gordura hepática da Prole fêmeas e machos 90 dias	48
Figura 14. Análise histológica hepática da prole fêmeas de 30 dias	49
Figura 15. Análise histológica hepática da prole machos de 30 dias	49
Figura 16. Análise histológica hepática de fêmeas aos 90 dias	50
Figura 17. Análise histológica hepática de machos aos 90 dias	51
Figura 18. Expressão gênica de marcadores lipogênicos hepáticos no fígado	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Origens Desenvolvimentistas da Saúde e Doença: DOHaD.....	16
2.2 Mecanismos inter e transgeracionais da programação metabólica	18
2.3 Síndrome metabólica.....	20
2.4 Doença Hepática Gordurosa Não Alcohólica	22
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Desenho experimental.....	30
4.2 Dieta rica em sacarose (DRS)	32
4.3 Avaliação da prenhez	33
4.4 Análises Morfométricas	33
4.4.1 Índice de Lee.....	33
4.4.2 Coleta de órgãos.....	33
4.5 Avaliação do Perfil Bioquímico	34
4.5.1 Homeostase glicêmica e resistência à insulina	34
4.6 Extração e quantificação de lipídeos hepáticos.....	34
4.7 Análise histológica	35
4.8 Avaliação da expressão gênica por RT-PCR	35
4.9 Análises Estatísticas	36
5 RESULTADOS	36
5.1 Impacto da dieta rica em açúcares sobre o ganho de peso materno, parâmetros morfométricos e bioquímicos.....	36
5.2 Análise Histopatológica e Quantificação do Conteúdo de Gordura Hepática Materno .	40
5.3 Efeito da dieta materna sobre o perfil ponderal da prole	41
5.4 Efeito da dieta materna sobre o perfil morfométrico da prole durante a infância e idade adulta jovem.....	42

5.5 Efeito da dieta materna sobre o perfil bioquímico da prole durante o período da infância e idade adulta	44
5.6 Influência da exposição materna à dieta rica em açúcares no perfil histopatológico e no acúmulo de gordura hepática dos descendentes	45
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO.....	61
8 PRODUÇÕES ACADÊMICAS DURANTE O DOUTORADO	62
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXO A.....	75
ANEXO B.....	76
ANEXO C	77
ANEXO D.....	78
ANEXO E	79
ANEXO F	80
ANEXO G.....	81

1 INTRODUÇÃO

Condições metabólicas desfavoráveis durante os estágios iniciais da vida do indivíduo, que incluem a fecundação, gestação, infância e adolescência, estão correlacionadas ao aumento do risco de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como síndrome metabólica (SM), diabetes melito tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares (DCV), esteatose hepática, entre outras (Hoffman *et al.*, 2021). Esse conceito serve como base para o estudo das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e Doença (Developmental Origins of Health and Diseases - DOHaD), proposto pelo Dr. David Barker (1938 – 2013) (Barker, 1995). Pesquisas fundamentadas no conceito DOHaD têm destacado que alterações nos padrões nutricionais, tanto em termos de deficiência quanto de excesso de nutrientes, podem contribuir para o surgimento precoce das doenças mencionadas (Fukuoka *et al.*, 2015; Charles *et al.*, 2016).

Dentro desse contexto, a SM, definida como a presença de pelo menos três das seguintes comorbidades: obesidade central, hiperglicemia, dislipidemia, resistência à insulina (RI) e hipertensão, emerge como um importante fator de risco para as DCNT, cuja prevalência tem aumentado tanto no Brasil quanto no mundo (Coelho *et al.*, 2021; Muniz *et al.*, 2022). O significativo aumento da incidência da SM está intimamente relacionado ao consumo elevado de carboidratos, especialmente açúcares de adição (sacarose e frutose) utilizados como edulcorantes em alimentos processados e refrigerantes (Tappy *et al.*, 2010, Malik *et al.*, 2010).

No contexto hepático, a SM se manifesta como a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), afetando cerca de um terço da população adulta global (García-Compean *et al.*, 2022). Variando desde a esteatose simples até a esteato-hepatite (EHNA), o aumento na prevalência da DHGNA tem sido associado ao aumento do consumo dos mencionados açúcares de adição (Zhang *et al.*, 2020). De modo preocupante, essa prevalência tem seguido uma tendência semelhante em crianças e adolescentes (Arenaza *et al.*, 2019; Geurtsen *et al.*, 2021), sendo agravada pela associação ao consumo materno destes açúcares (Sekkarie *et al.*, 2021). Bebês nascidos de mães obesas apresentam maior acúmulo de gordura nas células hepáticas, aumentando significativamente o risco de desenvolver obesidade, DHGNA, problemas cardiovasculares e carcinoma hepático na fase adulta (Houghton *et al.*, 2016).

Transitando do cenário clínico-epidemiológico para a pesquisa em animais, nosso grupo tem se dedicado a compreender os mecanismos fisiopatológicos subjacentes aos desdobramentos metabólicos resultantes do consumo excessivo de açúcares. Demonstramos que a introdução precoce de uma dieta rica em sacarose, logo após o desmame, promove o

rápido desenvolvimento da DHGNA, ativando vias de estresse do retículo endoplasmático que potencializam mecanismos lipogênicos hepáticos (Flister *et al.*, 2018). Em situações semelhantes, evidenciamos que a disfunção do tecido adiposo visceral, com aumento subsequente na secreção de ácidos graxos livres, contribui para a geração de sinais inflamatórios, agravando a condição hepática com progressão da DHGNA de esteatose para EHNA (França *et al.*, 2020). Além dos desfechos hepáticos, demonstramos ainda que a introdução precoce de açúcar na dieta antecipa a puberdade (Melo *et al.*, 2021) e acelera o envelhecimento neuronal (Pinto *et al.*, 2022), entre outros desdobramentos deletérios à saúde.

Dando continuidade a estes achados, a presente tese buscou aprofundar a compreensão dos mecanismos subjacentes que conectam a exposição materna a açúcares de adição ao desenvolvimento de esteatose na prole, explorando tais impactos sob o ponto de vista do dimorfismo sexual e em diferentes fases do desenvolvimento. Sendo assim, este trabalho visou esclarecer os caminhos metabólicos envolvidos, com foco em alterações no metabolismo lipídico que contribuem para a instalação e progressão da DHGNA. A investigação desses mecanismos também fornece novos conhecimentos valiosos para a identificação de potenciais alvos para intervenções preventivas que minimizem os riscos de disfunções metabólicas na prole.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Origens Desenvolvimentistas da Saúde e Doença: DOHaD

O conceito DOHaD, do inglês *Developmental Origins of Health and Disease*, estuda como experiências adversas em fases iniciais de vida podem impactar a saúde do adulto por meio de efeitos programados durante o desenvolvimento fetal (Gluckman *et al.*, 2008). Esse período crítico de programação inclui os primeiros 1000 dias de vida, desde a concepção até os dois primeiros anos, sendo amplamente reconhecido como essencial para moldar a saúde do indivíduo (Rabadán-Diehl *et al.*, 2013). Este conceito surgiu a partir dos estudos do Dr. David Barker em 1986, os quais mostraram que a má nutrição antes do nascimento aumenta o risco de doenças na idade adulta (Barker *et al.*, 1986). Antes de Barker, durante a década de 1970, Forsdahl (1977) já havia observado que crianças e adolescentes que viveram em condições de pobreza e depois experimentaram um ambiente mais próspero tinham maior probabilidade de morrer de doenças cardiovasculares na idade adulta. Paralelamente, estudos como o de Ravelli, Stein e Susser (1976) também destacaram que mulheres que enfrentaram desnutrição no início

da gravidez, particularmente durante a fome holandesa em 1944, tiveram filhos com maior tendência à obesidade.

Essas descobertas foram posteriormente ampliadas por estudos mais extensivos conduzidos pelo grupo de Barker (Godfrey, 2006). Em 1990 com a publicação da “hipótese da origem fetal” ou “hipótese do fenótipo econômico”, propôs que as condições adversas no ambiente intrauterino, como desnutrição materna, poderiam programar o organismo do feto, preparando-o para um ambiente pós-natal de escassez (Denver et., 1998). Esses achados se ampliaram com o conceito de “genótipo poupador”, que sugere que o feto se adapta a um ambiente intrauterino de restrição nutricional ao ajustar seu metabolismo para maximizar a economia de energia (Hales & Barker, 1992).

Essas adaptações, úteis em um ambiente de escassez, tornam-se prejudiciais quando o indivíduo nasce ou se desenvolvem em um ambiente de abundância, levando ao fenômeno descrito pela hipótese do *match/mismatch*. Segundo essa hipótese, a incompatibilidade entre o ambiente fetal de escassez e o ambiente pós-natal de abundância pode aumentar significativamente o risco de doenças metabólicas (Gluckman *et al.*, 2006). Essas adaptações iniciais no metabolismo do feto, conhecidas como “programação metabólica”, têm efeitos duradouros sobre o metabolismo, contribuindo para o desenvolvimento de doenças como DHGNA, obesidade e RI (Gluckman & Hanson, 2005).

A programação metabólica refere-se aos impactos duradouros de fatores nutricionais e ambientais, particularmente durante fases críticas do desenvolvimento, como o início da vida, sobre o metabolismo e a saúde futura de um indivíduo (Fall *et al.*, 2019). Estes impactos são particularmente atribuídos a modificações epigenéticas que influenciam a expressão gênica por meio de alterações na metilação do DNA e modificações das histonas (Waterland; Michels, 2007; Tobi *et al.*, 2018). Alterações epigenéticas podem ocorrer em diferentes fases da vida e modular o grau de expressão de certos genes, fazendo-os ser mais ativados ou desativados, resultando em um fenótipo modificado, enquanto o genótipo permanece inalterado. Elas parecem ser especialmente ativas durante a gravidez ou nos primeiros anos de vida, desempenhando um papel significativo na determinação do estado de saúde e doença ao longo do ciclo vital (Agarwal *et al.*, 2018; Jazwiec, P. A. e Sloboda, D. M., 2019).

Nesse sentido, estudos de experimentação animal e epidemiológicos vêm demonstrando, de forma consistente, associações entre o ambiente nutricional inicial e a saúde futura. Estudos com animais geralmente investigam a influência de dietas inadequadas durante a gestação, como aquelas ricas em açúcar, gorduras ou fast-food, assim como a obesidade da mãe e disfunções metabólicas nos filhos (Hsu; Tain, 2022). Tais estudos vêm sugerindo que a

obesidade e a DHGNA podem começar a se desenvolver ainda no útero devido ao consumo elevado de açúcar durante a gestação, predispondo o feto a problemas metabólicos na vida adulta (Ashino *et al.*, 2012; Kitsiou-Tzeli *et al.*, 2017; Araújo *et al.*, 2022).

Numa perspectiva populacional, o consumo de uma dieta rica em calorias durante a gestação pode causar ganho de peso nas mães e afetar o metabolismo de seus filhos (Lê *et al.*, 2009). Além disso, o nível de gordura no fígado do recém-nascido e a quantidade total de gordura estão relacionados ao índice de massa corporal (IMC) da mãe, considerando o sexo do bebê e o tempo de gestação (Modi *et al.*, 2011). A obesidade tem sido vista com maior prevalência em mulheres do que em homens, o que contribui para o crescimento no índice de pacientes grávidas com o IMC elevado (Flegal *et al.*, 2016; Muscogiuri *et al.*, 2024). Tal condição torna-se um fator de risco crucial para o desenvolvimento de disfunções metabólicas, tais como a SM, refletindo um enorme impacto desde o desenvolvimento fetal até a fase adulta.

2.2 Mecanismos inter e transgeracionais da programação metabólica

A programação metabólica, mediada por fatores intrauterinos e pós-natais, tem sido amplamente associada a mecanismos inter e transgeracionais, nos quais alterações epigenéticas desempenham um papel central (Guénard *et al.*, 2013). A continuidade de desfechos metabólicos prejudiciais afeta a saúde de várias gerações, mesmo na ausência da exposição direta aos fatores ambientais iniciais (Lillicrop *et al.*, 2014).

O ganho de peso fetal influenciado pela dieta materna, especialmente rica em gordura e açúcar, pode promover modificações permanentes nas vias centrais que regulam o apetite, afetando o desenvolvimento neural do hipotálamo e aumentando a predisposição para distúrbios metabólicos futuros (Lawlor *et al.*, 2007). Revisões sistemáticas e meta-análises demonstram que a obesidade pré-gestacional e o ganho de peso excessivo durante a gravidez estão significativamente associados a riscos aumentados de peso ao nascer elevado e macrosomia, além de perpetuar o ciclo de sobrepeso e obesidade nos descendentes ao longo da vida (Yu *et al.*, 2013).

Além disso, as consequências adversas de uma dieta materna inadequada não se restringem apenas às disfunções metabólicas. Filhos de mães com diabetes gestacional, por exemplo, apresentam maior risco de desenvolver doenças cardiovasculares, independentemente de histórico familiar e fatores sociodemográficos, ampliando as repercussões intergeracionais da nutrição materna inadequada (Yu *et al.*, 2019). Uma análise combinada de informações provenientes de 162.129 mães e seus filhos, compilada a partir de 37 estudos de coorte

relacionados à gravidez e ao nascimento, revelou que o IMC mais elevado antes da gravidez e o ganho de peso gestacional estavam correlacionados ao aumento no risco de sobrepeso/obesidade na infância, com possíveis repercussões em fases subsequentes da vida (Voerman *et al.*, 2019).

Estudos experimentais em modelos animais indicam que a exposição materna a dietas ricas em gordura pode alterar o sistema regulador do apetite no hipotálamo da prole, levando a um aumento na ingestão alimentar em fases posteriores da vida, o que contribui para um maior risco de obesidade e distúrbios metabólicos (Peleg-Raibstein *et al.*, 2016). Essas alterações estão ligadas a mudanças nos sinais mediados por hormônios como leptina e insulina, que desempenham papéis cruciais na regulação do apetite e na formação dos padrões alimentares (Barrios *et al.*, 2018). A programação do desenvolvimento neural do hipotálamo, influenciada por esses fatores neuroendócrinos, resulta em uma predisposição a um aumento do apetite, maior ingestão calórica e maior adiposidade após o nascimento (Lawlor *et al.*, 2007).

Em camundongos, dietas ricas em gordura causam aumento no comprimento corporal da prole e diminuição da sensibilidade à insulina, com efeitos observados até a terceira geração (Eileen *et al.*, 2024). A exposição a esta dieta durante a gestação e lactação, afeta os embriões dos descendentes, onde os animais machos e fêmeas quando adultos aumentam de tamanho. O estudo foi estendido até a terceira geração, considerando possíveis efeitos nas células germinativas primordiais. A dieta influenciou o peso e o comprimento das fêmeas, além do aumento nos níveis plasmáticos de Fator de Crescimento Insulínico Tipo 1 (IGF-I) (Dunn *et al.*, 2009).

Em ratas, a exposição a dietas ricas em gordura foi associada a maior risco de SM nos filhotes, que apresentam hiperinsulinemia, aumento na adiposidade e disfunção hepática (Srinivasan *et al.*, 2006). A exposição aos sinais metabólicos e hormonais decorrentes da supernutrição materna pode induzir aumento na expressão gênica adipogênica, lipogênica e de adipocinas nos tecidos adiposos, sendo que essas modificações podem contribuir para o desenvolvimento da obesidade em fases posteriores da vida. Durante a fase adulta, os filhotes apresentam aumento da adiposidade, peso do fígado elevado, maior conteúdo lipídico hepático, elevação nos níveis de glicose no sangue, triglicerídeos e corticosterona plasmática (D'Alessandro *et al.*, 2014; Kislal *et al.*, 2020).

Além disso, o dimorfismo sexual surge como um papel importante a ser considerado na programação fetal, uma vez que, diferenças no desenvolvimento placentário e no crescimento fetal entre os sexos podem influenciar de forma distinta a suscetibilidade a condições metabólicas em longo prazo (Blomberg *et al.*, 2023). É crucial, portanto, investigar essas

disparidades para uma compreensão mais abrangente dos resultados metabólicos programados intrauterinamente (Bronson *et al.*, 2017; Nugent *et al.*, 2018). Fetos femininos e masculinos adotam estratégias de crescimento distintas, o que resulta em disparidades na sobrevivência e nos desfechos gestacionais (Tarrade *et al.*, 2015). Foi demonstrado que fetos do sexo masculino são mais vulneráveis a condições adversas durante a gestação, manifestando uma maior incidência de parto prematuro, baixo peso ao nascer e desfechos neonatais desfavoráveis (Tamayev *et al.*, 2020).

Ao analisar os efeitos de uma dieta materna rica em carboidratos em machos e fêmeas de forma independente, um estudo observou que a resposta transcricional ao mesmo regime materno difere significativamente entre os sexos durante o desenvolvimento no útero (Riant *et al.*, 2009; Bayol *et al.*, 2010). Essas diferenças não se restringiram a aspectos quantitativos, mas também são qualitativas, envolvendo distintas funções e redes de genes. Nas fêmeas, as alterações transcricionais foram principalmente associadas à sinalização celular, incluindo células imunológicas e ao transporte e metabolismo de aminoácidos. Em contraste, nos machos, as modificações envolveram predominantemente o desenvolvimento e a função do sistema vascular, além do transporte e metabolismo de glicose e ácidos graxos (Gabor *et al.*, 2012).

A predominância de alterações associadas à sinalização celular e ao metabolismo de aminoácidos nas fêmeas sugere uma estratégia adaptativa que pode proteger contra a obesidade e distúrbios metabólicos, enquanto as modificações observadas nos machos, focadas no desenvolvimento do sistema vascular e no metabolismo de glicose e ácidos graxos, podem predispor a uma maior incidência de resistência à insulina e complicações cardiovasculares (Campesi *et al.*, 2023). Esse padrão destaca a importância de investigar como essas diferenças sexuais influenciam não apenas o desenvolvimento fetal, mas também as trajetórias de saúde na vida adulta, elucidando os mecanismos moleculares que podem contribuir para a manifestação da SM em populações distintas.

2.3 Síndrome metabólica

A SM é um conjunto de desordens metabólicas que aumentam o risco para o desenvolvimento de obesidade central, dislipidemia aterogênica, hiperglicemia, diabetes e doenças cardiovasculares no indivíduo, onde a RI é considerada o principal fator por trás das várias irregularidades da síndrome (Martínez, 2021). Nas últimas décadas, a SM tem sido vista como um grande problema de saúde pública, atingindo cerca de 25% da população mundial independente de gênero, etnia e classe social (Lira *et al.*, 2017). A sua origem é complexa e, até

o momento, não está completamente elucidada. Contudo, a combinação de um estilo de vida pouco ativo, hábitos alimentares não saudáveis e a obesidade durante a infância, em conjunto com predisposições genéticas, são apontados como influências cruciais para sua manifestação (Obeidat *et al.*, 2024).

O diagnóstico clínico da SM se dá pela presença de pelo menos três dos seguintes componentes: circunferência abdominal elevada, hiperglicemia, hiperinsulinemia, HDL-colesterol baixo, hipertrigliceridemia e hipertensão arterial (Alberti *et al.*, 2009). Os critérios para o diagnóstico são baseados nas diretrizes da Organização Mundial de Saúde (OMS) e nas recomendações do Painel III de Tratamento de Adultos do Programa Nacional de Educação sobre Colesterol (NCEP-ATP III) (Russell *et al.*, 2024). Há diferenças entre esses critérios, mas uma ligação notável é a RI. A RI está associada à hiperinsulinemia e ao diabetes tipo 2, além de poder causar danos aos vasos sanguíneos, desequilíbrios nos níveis de lipídios e o surgimento de doenças cardíacas relacionadas à aterosclerose. Adicionalmente, a RI pode resultar em acúmulo de gordura em órgãos como o coração, rins, fígado e pâncreas (Kim *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2023). Importante destacar que o aumento da gordura visceral, mesmo quando não há obesidade pelo índice de massa corporal, está ligada também à RI (Lee *et al.*, 2007; Nonaka *et al.*, 2024).

A SM é uma entidade clínica de substancial heterogeneidade, que não se restringe aos adultos, uma vez que sua prevalência em populações mais jovens está crescendo em paralelo à obesidade infantil, aumentando-se o risco de doenças metabólicas na fase adulta (Farias *et al.*, 2018). Com o crescimento da obesidade, também houve um aumento na DHGNA. Esta condição, relacionada ao acúmulo de gordura no fígado, está diretamente ligada às manifestações da SM (Dietrich; Hellerbrand, 2014). A DHGNA tem recebido destaque não apenas devido a problemas ligados à obesidade, mas também por avançar para EHNA, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (Romeiro e Santos, 2019). A SM e DHGNA têm características semelhantes, especialmente em como afetam o fígado (Dietrich; Hellerbrand, 2014).

Estudos epidemiológicos apontam que a prevalência de DHGNA na população com SM é significativamente maior do que em indivíduos com SM, mas sem acometimento hepático (Chalasani *et al.*, 2018). Segundo Younossi *et al.* (2016), a prevalência de DHGNA em indivíduos com SM chega a 70-80%, enquanto a prevalência de SM na população geral é de cerca de 25%. No entanto, apesar dessa forte associação, a DHGNA não é considerada um critério diagnóstico para a SM nas diretrizes clínicas estabelecidas (Alberti *et al.*, 2009). Mesmo sem ser critério diagnóstico, a presença de DHGNA em pacientes com SM reflete um estado

avançado de disfunção metabólica, que pode evoluir para complicações hepáticas mais graves (Zhang *et al.*, 2020).

2.4 Doença Hepática Gordurosa Não Alcóolica

A DHGNA é caracterizada pelo acúmulo de gordura no fígado, principalmente de triglicerídeos, representando entre 5 a 10% do peso total do órgão (Melo *et al.*, 2013). Esta doença engloba uma variedade de sinais e sintomas, marcados principalmente pelo acúmulo de gordura no fígado em ausência de consumo exagerado de álcool (Chalasani *et al.*, 2018). A incidência da DHGNA tem experimentado um aumento expressivo em nações ocidentais, atingindo uma prevalência global de 25% da população (Araújo *et al.*, 2018).

Esse distúrbio hepático está emergindo como uma condição crônica das mais frequentes em países industrializados do Ocidente, especialmente entre indivíduos que apresentam obesidade central, diabetes tipo 2 (DM2), dislipidemia e SM (Ahmed *et al.*, 2015). No entanto, a DHGNA não pode ser classificada como uma condição prevalente apenas em nações ocidentais economicamente desenvolvidas. Isso se deve ao fato de que elevadas taxas da doença são registradas no Oriente Médio (32%) e na América do Sul (31%), seguidas pela Ásia (27%).

A DHGNA abrange desde uma forma mais leve, conhecida como esteatose simples, até a EHNA, que representa um quadro mais grave e está acompanhada por inflamação lobular e apoptose, processos que podem predispor o indivíduo à fibrose e eventual cirrose hepática (Machado e Diehl, 2016). A inflamação hepática é um importante fator na patogênese da DHGNA. A ativação das células de Kupffer, a infiltração de células inflamatórias, como neutrófilos, macrófagos e linfócitos, e a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, contribuem para a progressão da EHNA (Theel *et al.*, 2022). Essas distintas condições dentro do espectro da DHGNA ressaltam a complexidade e a variedade de apresentações clínicas associadas a esses distúrbios hepáticos (Younossi *et al.*, 2018).

A avaliação histopatológica é o método mais preciso para o diagnóstico da esteatose (Chalasani *et al.*, 2018). O exame histopatológico mostra a presença de vacúolos lipídicos no citoplasma dos hepatócitos, além de alterações inflamatórias e fibrose hepática. A esteatose é categorizada como leve quando afeta 5-33% do tecido hepático, moderada entre 34-66%, e grave quando ultrapassa 66%. Quando a presença de gordura é escassa, ela se concentra na zona centrolobular do hepatócito (zona 3), e em casos mais intensos, ocorre de maneira paracinar. O envolvimento da zona periportal (zona 1) está associado à progressão para cirrose, resultando

em uma distribuição desigual ou perda completa de depósitos de gordura esteatótica. A inflamação e/ou fibrose são caracterizadas por um infiltrado inflamatório crônico mononuclear, com maior presença de linfócitos e macrófagos, e um número reduzido de plasmócitos e monócitos. O lipogranuloma hepático refere-se ao hepatócito central com acúmulo de gordura e à presença periférica de células mononucleares ou macrófagos (Kleiner *et al.*, 2015).

A fibrose hepática é um evento importante na progressão da esteatose para a doença hepática avançada (Kleiner *et al.*, 2005) (Figura 1). A elastografia hepática é um método não invasivo que avalia a fibrose hepática em pacientes com esteatose. Esse método utiliza ondas de ultrassom para avaliar a rigidez hepática, que está diretamente relacionada com a fibrose hepática (Demes *et al.*, 2020). A bioquímica sérica também é utilizada para avaliar a esteatose (Cruz *et al.*, 2016). A elevação das enzimas hepáticas, como alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), é um sinal de lesão hepática (Kobayashi, A.; Suzuki, Y.; Sugai, 2020).

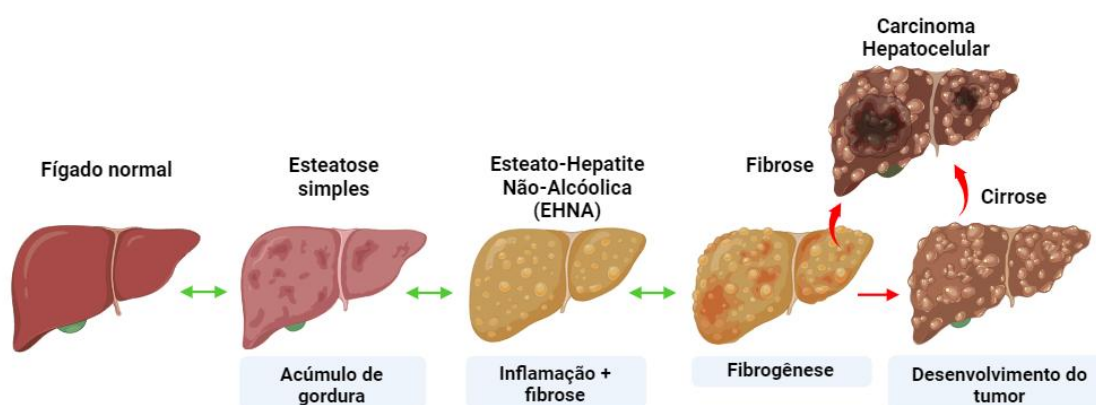


Figura 1. Espectro da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA). fonte: adaptada de Gluchowski; Becuwe; Walther; Farese JR (2017).

Além disso, com a perspectiva de que mais de dois bilhões de indivíduos em todo o mundo apresentarão excesso de peso ou obesidade até 2030, a DHGNA emergiu como a condição hepática crônica mais proeminente do século 21 em adultos e jovens (Bloomgarden *et al.*, 2024).

Nesse contexto, é crucial considerar que não apenas a quantidade de carboidratos consumidos, mas também a qualidade desses carboidratos, desempenha um papel fundamental na lipogênese de novo (DNL) (Song *et al.*, 2018). Foi demonstrado que os açúcares simples são mais eficazes do que os carboidratos complexos na estimulação da DNL hepática (Ter Horst *et al.*, 2017).

A lipogênese *de novo* (DNL) é o processo metabólico responsável pela conversão de carboidratos, principalmente glicose, em ácidos graxos, que são então armazenados como triglicerídeos no tecido adiposo (Jensen-Urstad & Semenkovich, 2012). Essa via ocorre predominantemente no fígado e no tecido adiposo, contribuindo para a homeostase lipídica, embora em condições normais represente uma contribuição menor para a manutenção do conteúdo lipídico sérico (Björntorp *et al.*, 1978). No entanto, uma dieta rica em carboidratos, especialmente açúcar, pode aumentar significativamente a contribuição da DNL para os níveis de triglicerídeos no sangue (Schwarz *et al.*, 2003).

O processo inicia-se com a absorção da glicose, que é metabolizada via glicólise para gerar piruvato. Este, por sua vez, é convertido em acetil-CoA, que pode ser direcionado ao ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) ou à DNL (Smith & Tsai, 2007). O acetil-CoA, uma vez formado, é convertido em citrato, que, ao sair da mitocôndria, é transformado de volta em acetil-CoA pela ATP-citrato liase (ACLY). Este acetil-CoA é então carboxilado pela acetil-CoA carboxilase (ACACA) para formar malonil-CoA, o substrato crucial para a síntese de ácidos graxos pela enzima limitante da taxa, a ácido graxo sintase (FASN) (Brindley, Matsumura & Bloch, 1969). O aumento na disponibilidade de glicose e, conseqüentemente, de acetil-CoA e malonil-CoA, resulta em um incremento na lipogênese, favorecendo a síntese de palmitato e outros ácidos graxos (Bianchi *et al.*, 1990; Maier, Leibundgut & Ban, 2008) (Figura 2). Essa regulação da DNL é crítica, pois a desregulação dessa via pode levar a condições patológicas como obesidade e resistência à insulina, evidenciando a importância do controle da ingestão de açúcar para a manutenção da saúde metabólica (Ameer *et al.*, 2014).

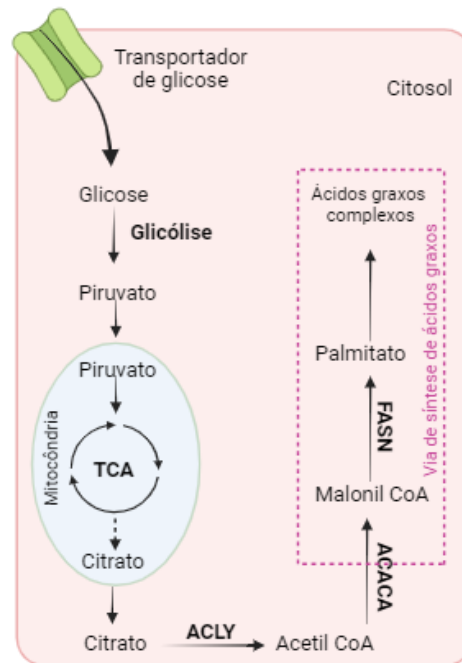


Figura 2. Lipogênese de novo. Fonte: Adaptada de Ameer *et al.*, (2014).

Desregulações na via lipogênica ocorrem em diversas condições patológicas e fisiológicas. A DNL demonstrou ser altamente sensível a alterações na dieta (Alves-Bezerra *et al.*, 2017). A ingestão excessiva de glicose estimula a DNL por meio de vários mecanismos. Primeiramente, o metabolismo da glicose pela via glicolítica fornece os carbonos necessários para a síntese de ácidos graxos (Petersen *et al.*, 2018). Além disso, a glicose aumenta a expressão de enzimas lipogênicas no fígado. Esse processo é mediado principalmente pela ativação do fator de transcrição *ChREBP* (proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidratos), que é ativado por modificações pós-traducionais, como acetilação e O-glicosilação, em resposta ao aumento da glicose nas células hepáticas. Uma vez ativado, o *ChREBP* é transportado para o núcleo, onde se liga aos elementos responsivos a carboidratos (ChoREs) presentes nos promotores de genes lipogênicos, promovendo sua expressão (Sakers *et al.*, 2022).

Além disso, os altos níveis de glicose plasmática estimulam a secreção de insulina e inibem o glucagon, aumentando ainda mais a lipogênese (Lee *et al.*, 2022). A insulina, por sua vez, regula a expressão de genes lipogênicos por meio da ativação do *SREBP-1c* (proteína de ligação ao elemento regulador de esteróis-1) (Burhans *et al.*, 2022). Esse fator de transcrição é ativado pela insulina tanto no nível transcricional quanto pós-traducional, sendo transportado do retículo endoplasmático para o núcleo, onde se liga aos promotores de genes-alvo envolvidos na síntese de ácidos graxos. Essa regulação desbalanceada da DNL no fígado, promovida por

glicose e insulina, contribui para o acúmulo de triglicerídeos no fígado, uma característica central da DHGNA (Rinaldi *et al.*, 2021).

Na resistência à insulina, ocorre uma disfunção na sinalização da insulina em tecidos periféricos, como músculos e tecido adiposo, resultando em uma diminuição na captação de glicose (Jensen-Urstad *et al.*, 2012). Isso ocorre devido a alterações nas vias de sinalização da insulina, que afetam a ação do transportador de glicose GLUT4 e a fosforilação de proteínas reguladoras (Sano *et al.*, 2023). No entanto, o fígado mantém sua capacidade de responder à insulina, especialmente no que diz respeito à ativação da lipogênese de novo (DNL). Nesse contexto, a insulina ainda se liga aos seus receptores hepáticos, ativando a via de sinalização que envolve o fator de transcrição *SREBP-1c*. A ativação do *SREBP-1c* resulta em sua translocação para o núcleo, onde se liga aos elementos reguladores nos promotores de genes lipogênicos, aumentando a expressão de enzimas essenciais para a síntese de ácidos graxos, como a acetil-CoA carboxilase (ACC) e a FASN. O acúmulo desses ácidos graxos se converte em triglicerídeos, resultando na esteatose hepática (Polyzos *et al.*, 2014).

À medida que essa condição tem sido amplamente associada a fatores alimentares e metabólicos, surge uma preocupação crescente com as mudanças nos padrões de saúde populacional, especialmente no que diz respeito à obesidade infantil. Ao longo das últimas décadas, observou-se um aumento significativo no início precoce da obesidade na infância relacionado ao consumo precoce de açúcares e gorduras, representando uma ameaça séria à saúde dos jovens. Esse cenário suscita a importante questão de como o surgimento precoce do excesso de peso impactará a carga e o manejo da DHGNA mais tarde na vida (Souza *et al.*, 2020).

2.5 Impacto de açúcares de adição na homeostase hepática

O alto consumo de dietas ricas em açúcar vem chamando atenção por estar correlacionado positivamente com o desenvolvimento de disfunções metabólicas com impacto negativo sobre a função normal do fígado. Alimentos processados e ultraprocessados frequentemente contêm altos teores de açúcares como a sacarose (50% glicose: 50% frutose) ou o xarope de milho com alto teor de frutose (HFCS) (45% de glicose e 55% de frutose). A indústria de alimentos opta pelo HFCS em bebidas açucaradas devido ao seu custo mais acessível e facilidade de manuseio químico em relação à sacarose (Nielsen; Popquin, 2004). A indústria também sabe que a retirada de gordura torna os alimentos processados menos

saborosos, por isso, lançando produtos com baixo teor de gordura, mas ainda saborosos, pelo incremento de edulcorantes

Uma particularidade importante das últimas décadas e que tem sido foco de investigação em muitas pesquisas é o aumento do consumo de alimentos e bebidas açucarados, ricos em calorias, sendo esse comportamento alimentar associado positivamente com maior quantidade de crianças, adolescentes e adultos enfrentando sobrepeso, obesidade e consequentemente a SM. Dessa forma, a obesidade durante a infância e a adolescência está interligada a problemas metabólicos, incluindo principalmente gordura abdominal, níveis elevados de insulina, alterações nos lipídios hepáticos e extra-hepáticos e hipertensão arterial (Bloch *et al.*, 2016). Dietas ricas em gorduras e carboidratos aliadas à diminuição dos níveis de atividade física, são também fortemente fatores contribuintes (Bovolini *et al.*, 2021).

A frutose e a glicose, embora compartilhem da mesma fórmula molecular ($C_6H_{12}O_6$), apresentam absorção intestinal e metabolização hepática distintas, visto que o transporte de glicose é um processo que requer energia, enquanto a frutose se move através de um transporte passivo facilitado (Douard *et al.*, 2013). A absorção intestinal de glicose é realizada pelo co-transportador de sódio-glicose 1 (SGLT1) presente na membrana apical dos enterócitos, enquanto difunde-se do enterócito através do membro da família do transporte facilitador de glicose 2 (GLUT2) que está localizado exclusivamente na membrana basolateral, levando ao transporte transepitelial de glicose do lúmen para a circulação portal. Por outro lado, a frutose dietética se move do lúmen intestinal para a circulação através de um transporte passivo através do GLUT5 presente na membrana dos enterócitos (Ferraris *et al.*, 2018). Após absorção intestinal, a frutose chega ao fígado através da veia porta hepática, também usando o GLUT5 e sofre metabolização nos hepatócitos (Yu *et al.*, 2021).

A visão atual do metabolismo intestinal da frutose, do ponto de vista de experimentação animal, destaca que, sob condições de consumo dietético de baixas doses de frutose, a maior parte desse monossacarídeo é metabolizada à glicose-6-fosfato no enterócito, aparecendo na circulação portal principalmente como glicose e ácidos orgânicos. Nesse sentido, um estudo interessante abordou o papel do intestino delgado no metabolismo da frutose dietética como tendo função protetora do fígado em virtude da exposição tóxica à frutose (Jang *et al.*, 2018). A maior parte da frutose é metabolizada no intestino delgado, aparecendo na circulação portal como glicose e lactato (~60%) e o restante como frutose (<20%). Em contraste, altas doses de frutose saturam a absorção e o catabolismo da frutose no intestino delgado, levando ao transbordamento da frutose para o fígado (> 30%), exacerbando assim o acúmulo de gordura

hepática consequente à metabolização da frutose que é um substrato para a via de lipogênese de novo (Diggle *et al.*, 2010).

O consumo de frutose está associado a alterações na microbiota e na integridade intestinal, levando à passagem de endotoxinas, como o lipopolissacarídeo (LPS), para o fígado pela circulação portal. Essas endotoxinas, também chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), podem ativar o receptor de Toll-Like 4 (TLR4), levando à ativação das células de Kupffer e subsequente inflamação. A ingestão elevada de frutose pode aumentar a produção de ácidos graxos, como o palmitato, que também sinalizam via TLR4. A ativação de TLR4 e o acúmulo de gordura, podem ativar o inflamasoma, resultando na liberação de citocinas inflamatórias culminando na DHGNA (Lambertz *et al.*, 2017).

Em um outro estudo, foi demonstrado que a frutose, mesmo sem causar ganho de peso, aumentou tanto a passagem de bactérias, quanto os níveis de endotoxinas no sangue e danos hepáticos (Kavanagh *et al.*, 2013). Para confirmar essa teoria, foram detectados níveis elevados de substâncias inflamatórias, como $\text{TNF}\alpha$, e de endotoxinas no sangue que vão para o fígado (Kelishadi *et al.* 2014). Essas endotoxinas originárias de bactérias, são associadas ao acúmulo de gordura e inflamação no fígado, principais características da DHGNA (Bergheim *et al.*, 2008). O consumo de frutose pode alterar as bactérias intestinais e, consequentemente, a produção desses ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (Lambertz *et al.*, 2017). Especificamente o acetato, produzido quando as bactérias metabolizam a frutose, é transformado em Acetil-coenzima A (acetil-CoA), que contribui para a produção de gordura no fígado (Moffett *et al.*, 2020).

A esteatose hepática resultante do consumo excessivo de frutose e glicose ocorre principalmente quando há um desequilíbrio metabólico. Esse desequilíbrio pode se manifestar por meio de um aumento anormal no acúmulo de lipídios no fígado via ativação do processo de lipogênese de novo ou por uma redução na capacidade de metabolizar ácidos graxos via β -oxidação (Gaemers e Groen, 2006). O metabolismo de glicose e frutose hepática, por exemplo, são eficientes na ativação de fatores como *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c* (*SREBP1-c*) e *Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein* (*ChREBP*), que estimulam a formação de gordura (Mastrocola *et al.*, 2016).

As evidências apresentadas demonstram claramente o impacto da má nutrição como fator desencadeante de alterações metabólicas sistêmicas e hepáticas, sendo o aumento significativo no consumo de alimentos processados ricos em açúcares adicionados fortemente associado ao crescimento das doenças metabólicas emergentes entre populações cada vez mais jovens. Diante desse contexto, a hipótese deste trabalho é que a exposição materna a uma dieta

rica em açúcares durante a gestação e lactação promove alterações metabólicas na prole, predispondo ao desenvolvimento de doenças metabólicas, como esteatose hepática de forma sexo-dependente.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar os mecanismos metabólicos responsáveis pela instalação precoce de esteatose hepática na prole de ratas expostas a uma dieta rica em sacarose durante a perigestação.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as alterações metabólicas em ratas expostas a uma dieta rica em sacarose durante a perigestação e na sua prole.
- Compreender a participação de marcadores moleculares metabólicos, como PPAR γ , SREBP-1c, ChREBP e FASN, como moduladores da atividade lipogênica hepática nestes mesmos animais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho experimental

Os animais utilizados neste estudo foram mantidos no Biotério de Farmacologia da Pós-graduação do CCBS, durante todo o período experimental, com livre acesso a água e ração, ciclo claro-escuro de 12 horas e controle de temperatura e umidade segundo o que preconiza os guias nacionais e internacionais de cuidado e bem-estar dos animais, além das regras definidas pelo CONCEA e pela CEUA/UFMA nº 23115.002915/2023-62 (ANEXO A).

Foram utilizadas ratas fêmeas (*Rattus norvegicus*) jovens e nulíparas expostas a uma dieta rica em sacarose (DRS n=4) ou dieta padrão (CTR n=3) por um período total de 12 semanas. Iniciando aos 30 dias de vida, o estudo abrangeu 06 semanas de exposição pré-concepção, 03 semanas de exposição gestacional e 03 semanas de exposição lactacional à DRS. Após as primeiras 06 semanas de exposição às dietas DRS ou CTR, as ratas foram acasaladas com ratos CTR de mesma idade (fase 1, Figura 3). O dia 0 (zero) da gestação foi identificado pela presença de espermatozoide no lavado vaginal das ratas, coletado na manhã seguinte ao acasalamento. A exposição às dietas seguiu durante a gestação e a lactação, com acompanhamento ponderal duas vezes por semana e do consumo de ração três vezes por semana. Entretanto, durante a gestação e lactação as mães foram pesadas diariamente.

Na manhã seguinte aos partos, os filhotes foram medidos e pesados, bem como submetidos a verificação da genitália para sexagem, medida ano-genital e caracterização dos parâmetros de nascimento. Os filhotes foram pesados em até 24 horas após o nascimento, no 7º, 14º, 21º dia pós-natal (DPN). No desmame (DPN 21), os 47 filhotes foram divididos por sexo e padrão nutricional, sendo 12 machos e 12 fêmeas oriundos de mães DRS e 11 machos e 12 fêmeas oriundos de mães CTR, totalizando 4 grupos de no mínimo 11 animais cada (fase 2, Figura 3).

A partir do desmame todos os grupos foram alimentados com dieta CTR. Estes animais foram acompanhados para avaliação ponderal e consumo de ração e seguiram para análise das características fisiopatológicas da evolução da DHGNA, sendo um grupo eutanasiado aos 30 dias e outro aos 90 dias de vida, com a finalidade estudar o impacto da dieta materna na homeostase metabólica da prole no período que compreende a pré-adolescência (30 dias) e idade adulta jovem (90 dias). As proles de 30 e 90 dias foram separadas e divididas em 4 grupos, sendo:

Prole 30 dias:

- CTR/CTR machos (n = 5): ratos de mães controle com dieta padrão.
- CTR/CTR fêmeas (n = 6): ratas de mães controle com dieta padrão.
- DRS/CTR machos (n = 6): ratos de mães DRS com dieta padrão.
- DRS/CTR fêmeas (n = 6): ratas de mães DRS com dieta padrão.

Prole 90 dias:

- CTR/CTR machos (n = 6): ratos de mães controle com dieta padrão.
- CTR/CTR fêmeas (n = 6): ratas de mães controle com dieta padrão.
- DRS/CTR machos (n = 6): ratos de mães DRS com dieta padrão.
- DRS/CTR fêmeas (n=6): ratas de mães DRS com dieta padrão.

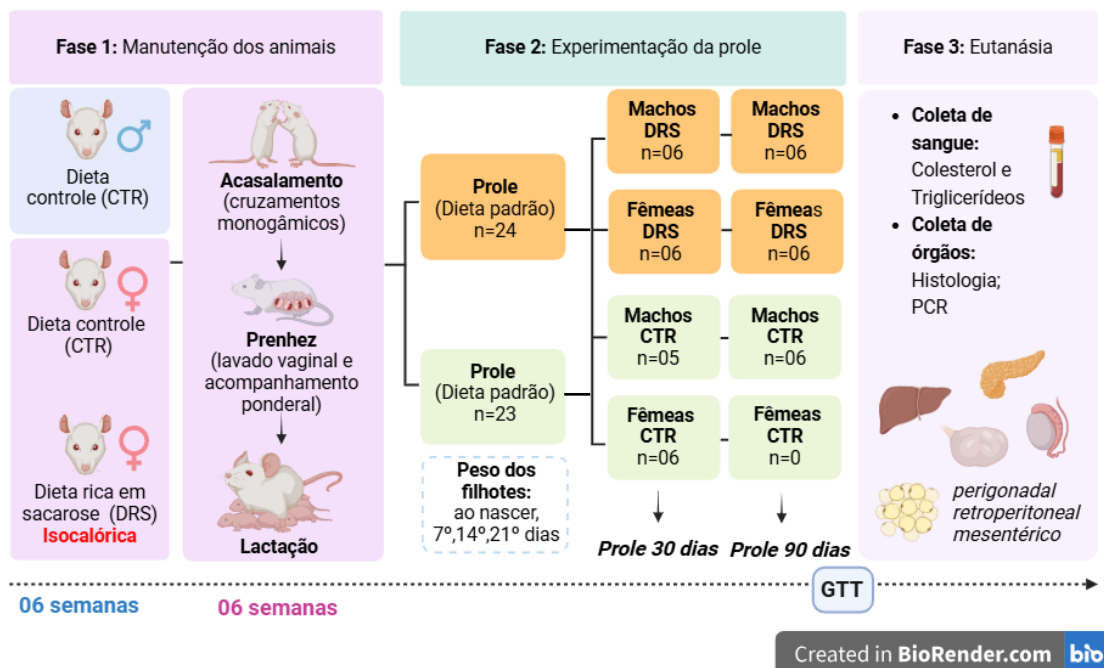


Figura 3. Esquema do desenho experimental. Fonte: Autora (2024).

Durante o período pré-gestacional, foram realizados dosagem de glicemia em jejum (os animais foram colocados em jejum durante 8 horas) e pós-prandial, triglicerídeos séricos e medida do índice de Lee nas mães (fase 1, Figura 3). No período pós-lactacional, foram dosados triglicerídeos e colesterol total séricos e medida do índice de Lee (fase 2, Figura 3). Em seguida, as ratas foram eutanasiadas. Na semana entre o desmame e a eutanásia da prole de 30 dias, os animais passaram por testes bioquímicos. Aos 30 e 90 dias completos, os animais foram

colocados em jejum por 8 horas, anestesiados com solução de cetamina e xilazina (nas doses de 75 e 10mg/kg respectivamente) e tiveram suas medidas naso-anal registradas para calcular o índice de Lee. Posteriormente, foram laparotomizados para coleta de sangue por punção aórtica e eutanásia por exsanguinação. Em seguida foram coletados: sangue, gordura retroperitoneal, mesentérica, periepídidimal, periovariana, fígado, pâncreas e gônadas (ovário e testículo). Os órgãos coletados foram pesados para estudos morfométricos e guardados para análise histológica ou congelados a -80°C . Amostras de fígado, pâncreas e coxins adiposos foram preservados em RNAlater® da Invitrogen para futuras análises moleculares (fase 3, Figura 3).

4.2 Dieta rica em sacarose (DRS)

Para a elaboração da DRS, empregou-se a metodologia proposta por De Lima *et al.* (2008). Nesse processo, 40% do pó da ração padrão para roedores da marca Nuvilab® (Nuvital, Brasil) foi combinado com 8,5% de açúcar refinado e 40% de leite condensado (Tabela 1). Após atingir homogeneidade, a mistura foi moldada em formato cilíndrico, assemelhando-se à ração padrão, e submetida a uma estufa a 45°C por 3 dias. Posteriormente, a DRS foi armazenada em geladeira, por no máximo 7 dias.

No demonstrativo das dietas observamos que CTR e DRS apresentam valores energéticos por grama muito próximos de 352 Kcal/100g para a dieta padrão e 348 Kcal/100g para a dieta rica em sacarose, podendo então ser consideradas dietas isocalóricas. Enquanto a CTR apresenta uma proporção mais elevada de proteínas e uma menor quantidade de carboidratos, a DRS caracteriza-se por uma quantidade significativamente maior de carboidratos, especialmente de sacarose.

Tabela 1. Percentuais Nutricionais: Dieta Padrão versus Dieta com alto teor de Sacarose

Composição centesimal	Dieta padrão (CTR)	Dieta Rica em Sacarose (DRS)
<i>Carboidratos</i>	55,4%	65%
<i>Sacarose</i>	10%	25%
<i>Proteína</i>	21%	12,3%
<i>Lipídios</i>	5,2%	4,3%
<i>Valor energético</i>	352 Kcal/100g	348 Kcal/100g

*Composição centesimal das dietas utilizadas no estudo. Comparação entre a dieta padrão (CTR) e a dieta rica em sacarose (DRS), evidenciando as diferenças na porcentagem de carboidratos, sacarose, proteínas, lipídios e valor energético.

4.3 Avaliação da prenhez

Ratas adultas e saudáveis, em idade reprodutiva, foram selecionadas para acasalamento pelo método de Poiley (1960) para evitar consanguinidade. Na 6ª semana, um macho foi introduzido individualmente em cada gaiola de fêmeas por 24 horas (acasalamento monogâmico). O acasalamento foi confirmado pelo lavado vaginal matinal, utilizando 10 µl de solução salina (NaCl 0,9%) introduzida e aspirada do canal vaginal, seguida de análise microscópica para verificar espermatozoides. Após a confirmação, iniciou-se a avaliação da prenhez, com pesagem das ratas grávidas, que apresentam aumento progressivo de peso. A palpação abdominal foi usada como método complementar para identificar alterações físicas associadas à gestação. Observações comportamentais, como a construção de ninhos, serviram como indicadores comportamentais de prenhez.

4.4 Análises Morfométricas

4.4.1 Índice de Lee

Para a avaliação do índice de Lee, o animal foi anestesiado em decúbito ventral utilizando Cetamina e Xilazina (75 e 10 mg/kg). Em seguida colocado em posição dorsal e estendendo-o completamente. Foi calculado através da técnica de Crown Rump. Após a coleta dos dados, o comprimento nasoanal foi obtido através do quociente da raiz cúbica do peso corporal (g) pelo comprimento nasoanal (mm), multiplicado por 10 (Bernardis e Patersson, 1968).

4.4.2 Coleta de órgãos

Para a coleta de órgãos, no dia previsto para eutanásia, após um período de jejum de 8 horas, os animais foram submetidos à anestesia intraperitoneal utilizando uma solução composta por Cetamina e Xilazina, nas dosagens 75 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente. Em seguida, foi realizada uma laparotomia para a coleta de sangue por meio de punção aórtica abdominal, seguida de eutanásia através de exsanguinação. Dentre os órgãos e tecidos coletados incluíram-se fígado, pâncreas, gonadas (testículos e ovários), depósitos de tecido adiposo branco (perigonadal, retroperitoneal e mesentérico).

Posteriormente, os órgãos e tecidos foram lavados com solução PBS, secos com papel filtro, pesados e armazenados. Para análises futuras, porções do fígado (quadrante médio do

lobo direito), pâncreas (porção da cabeça do pâncreas), gordura periepídídima, periovariana e testículo foram preservados em solução de formaldeído a 10% e o ovário direito conservado em paraformaldeído a 4%; porções equivalentes do fígado e pâncreas foram separadas em eppendorfs com ou sem RNA later e devidamente armazenados para posterior análise de expressão gênica e/ou proteica. O sangue coletado foi centrifugado, e amostras de soro foram aliqüotadas e armazenadas para posteriores dosagens.

4.5 Avaliação do Perfil Bioquímico

As amostras de soro foram obtidas após coagulação espontânea e centrifugação (3500 rpm; 10 min; 25°C) e dosagens de triglicerídeos e os níveis de colesterol total foram medidas pelo método colorimétrico (espectrofotometria) usando kits comerciais sensíveis e específicos de acordo com as instruções do fabricante (Labtest®, Lagoa Santa (MG), Brasil).

4.5.1 Homeostase glicêmica e resistência à insulina

Durante a última semana de experimentação correspondente a cada período, a homeostase glicêmica foi avaliada através dos testes de dosagem de glicemia e teste de tolerância à glicose (GTT).

Para o GTT, os animais foram submetidos a jejum de 8 horas, antes da administração de 2g/kg de glicose, via intraperitoneal. Em seguida, as gotas sanguíneas das veias da cauda foram coletadas imediatamente antes (tempo 0) e 15, 30, 60 e 120 minutos após a carga de glicose dada, para a medição da glicemia através do glicosímetro (Accu check Active®, Roche Diagnostic, Alemanha). A resistência à insulina foi inferida a partir do cálculo do Índice TyG (triglicerídeos e glicose) $[\ln(\text{glicose em jejum (mg / dL)} \times \text{triglicerídeos em jejum (mg / dL)}) / 2]$ (Simental-Mendía *et al.*, 2008).

4.6 Extração e quantificação de lipídeos hepáticos

Para avaliação posterior do acúmulo de gordura hepática, as amostras de fígado (coletadas do quadrante médio do lobo direito) armazenadas, foram homogeneizadas em NaCl 1 M (100 mg/500 L). O homogeneizado foi extraído com 3 mL de clorofórmio/solução de metanol (2:1) e 0,5 mL de NaCl 1 M. A fase orgânica foi coletada e deixada para secar para a medição do conteúdo da gordura total (mg/g de tecido). A gordura total foi ressuspensa em 0,5

Ml de Triton X/metanol (2:1) para medição de colesterol total e triacilglicerol, conforme descrito anteriormente (Freedman *et al.*, 2005).

4.7 Análise histológica

Foram coletadas amostras de tecido hepático (quadrante médio do lobo direito), pancreático (porção da cabeça do pâncreas), depósitos de tecido adiposo branco (perigonadal, mesentérico e retroperitoneal) e gônadas (testículo e ovário). As amostras foram fixadas em solução de formaldeído a 10% ou paraformaldeído 4% embebidas em parafina. Os fígados foram seccionados em cortes de 5 µm e corados por hematoxilina-eosina (HE). Para a pontuação de atividade de DHGNA foi aplicada a análise semi-quantitativa dos quatro critérios definidores de EHNA: esteatose (0-3), balonização (0-4), inflamação lobular (0-3) e inflamação portal (0-3) (Pai *et al.*, 2022).

4.8 Avaliação da expressão gênica por RT-PCR

Foram quantificados níveis de mRNA envolvidos em diferentes vias de acúmulo de lipídio hepático, tais como genes lipogênicos (FASN, SCD1, DGAT, PPAR- γ), fatores de transcrição (ChREBP-1, SREBP1-c) e genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos (PPAR- α , Pgc1- α) Tabela 1. Tais quantificações foram feitas por PCR em tempo real nas proles de 30 e 90 dias.

Tabela 2. Sequência de Primers

Genes*	Sense	Antisense	GenBank nº
GAPDH	GAGACAGCCGCATCTTCTTGT	CGACCTTCACCATCTTGTCTATGA	NM_017008.4
PPAR α	TTCCTGAACTTGACCTTCT	CTCATTGTTGTACTGGTTGG	NM_031347.1
PPAR γ	CATATCAGAGGGACAAGGAT	GAACCTTCACAGCAAACCTCAA	NM_001145366.1
FASN	CTCCACAGCTCTTACAGTGA	CACACTGCTGTTTCTCTCTA	NM_017332.2
SCD1	AAGAGCAACAGAGTCTGGTG	GCTGGACAGGAGATGAGGAC	NM_003233.2
SREBP-1c	GGCCTTCGAGACAAATCAGC	TTGCCGTTGCGGTAATGATG	NM_001276708.1
ChREBP	TCTGCTCCATCCACAGATGG	AGGAGCTGAGCCGCTTTGAG	NM_001104642.2

* **PPAR α** : receptor ativado por proliferadores de peroxissomas do tipo alfa; **PPAR γ** : receptor ativado por proliferadores de peroxissomas do tipo gama; **FASN**: ácido graxo sintase; **SCD1**: Estearoil-CoA Desaturase 1; **SREBP-1c**: Proteína de Ligação ao Elemento Regulatório de Esterol 1c; **ChREBP**: Proteína de Ligação ao Elemento Responsivo a Carboidratos.

Amostras de fígado foram usadas para extração de RNA usando Trizol® (Invitrogen, Alemanha) conforme instruções do fabricante. O pellet de RNA foi diluído em 50µl de água

livre de nuclease e a quantidade e pureza determinadas pela medição de A260/A280 proporções com um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, EUA), seguida de eletroforese em gel de agarose (0,8%). As amostras de RNA foram armazenadas a -80 °C. Amostras de RNA (3 µg) foram convertidas em cDNA usando Super Script II Reverse Transcriptase® (Invitrogen, Alemanha). Os primers foram projetados usando o software Primer Express® (Applied Biosystem, EUA) e fabricado pela Invitrogen Brasil. A amplificação qPCR e Platinum® SYBR® Verde qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Alemanha) foram realizadas usando o 7500 Realtime PCR Applied Biosystems®, EUA. As reações foram incubadas a 50°C por 2 min e 95 °C por 2 min (estágio de espera) seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s (desnaturação) e 60° C por 1 min (recozimento e extensão). Para derreter o estágio da curva, as reações foram incubadas a 95°C por 15s, 60°C por 60 min e 95°C por 15 s. Todas as amostras foram normalizadas para o relativo níveis de GAPDH e os resultados foram expressos como a mudança de vezes (FC) valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$, conforme determinado por tempo real amplificação.

4.9 Análises Estatísticas

Os dados analisados foram expressos como média $\pm$ EPM e submetidos a teste de normalidade (Shapiro-Wilk) seguido de análise paramétrica através de test t não-pareado (one-tailed) ou Kolmogorov-Smirnov seguido de análise não paramétrica através de test t não-pareado (one-tailed); two-way ANOVA (Pós-teste Bonferroni), além das análises de correlação já mencionadas, para um nível de significância de 5% ($p < 0.05$) usando o GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., USA).

5 RESULTADOS

5.1 Impacto da dieta rica em açúcares sobre o ganho de peso materno, parâmetros morfométricos e bioquímicos

Inicialmente, testamos se uma alimentação materna com alto teor de sacarose, no período perigestacional, pode ser um fator predisponente ao desenvolvimento de disfunção metabólica materna. Na Figura 4, nota-se que, a partir da 5ª semana (59 dias de vida) de indução da DRS, o peso corporal das ratas DRS_{F0} apresentou-se estatisticamente maior que o peso das ratas CTR_{F0} (CTR_{F0} 184,0 $\pm$ 3,96g vs. DRS_{F0} 200,2 $\pm$ 5,23g, $p < 0,05$), efeito que se manteve até

o final do segundo terço da gestação e durante o início da lactação. Ao final da lactação, as ratas CTR_{F0} apresentaram ganho de peso adicional fazendo com que a diferença de peso entre os grupos não chegasse até o final.

Com relação à análise das massas relativas de órgãos após o período lactacional, não foi observada diferença significativa no peso dos coxins adiposos (mesentérico, retroperitoneal e gonadal), dos ovários e do pâncreas (Figura 4B-H) entre os dois grupos, embora seja possível observar uma tendência a aumento de peso nesses tecidos nas mães DRS_{F0}, com exceção da gordura mesentérica. A ausência de diferença estatística pode ser explicada pelo número pequeno de ratas, uma limitação em nosso estudo.

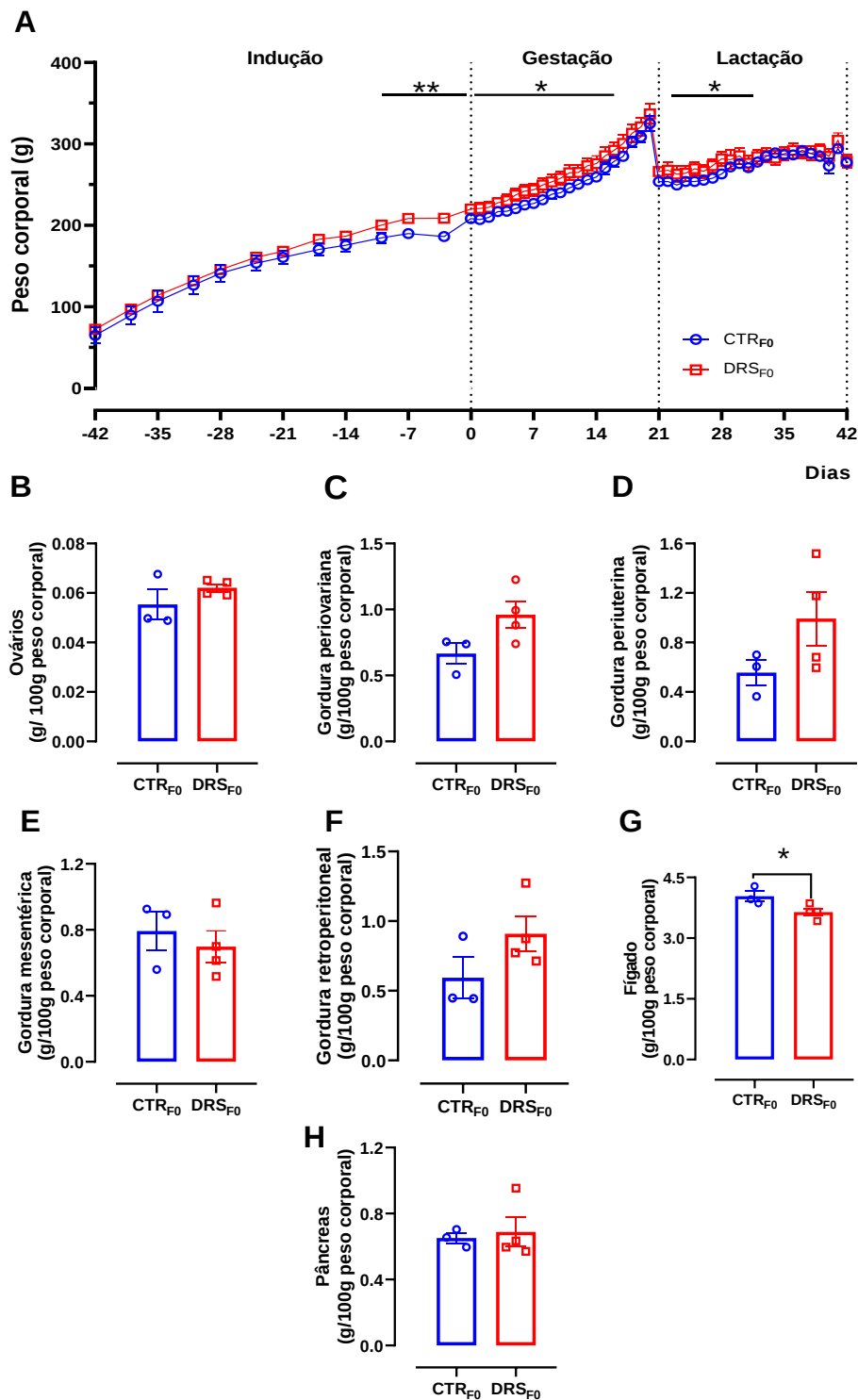


Figura 4. Exposição perigestacional à DRS. (A) Peso corporal de ratas DRS e CTR no período perigestacional; (B) Peso dos Ovários; (C) Peso da Gordura periovariana; (D) Peso da Gordura periuterina; (E) Peso da Gordura mesentérica; (F) Peso da Gordura retroperitoneal; (G) Peso do Fígado; (H) Peso do Pâncreas. Os valores foram expressos com média $\pm$ e.p.m., sendo CTR (n= 3) e DRS (n=4). A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle.

A fim de estabelecer quais os efeitos da DRS sobre os parâmetros bioquímicos das mães, foram medidos a glicemia, os níveis de triglicerídeos e colesterol em duas fases: i) durante o período de pré-concepção (6 semanas de indução com a dieta), as ratas pertencentes ao grupo DRS_{F0} não apresentaram diferenças nos níveis de glicemia (Figura 5A) e de TGs séricos comparadas ao grupo CTR_{F0} (Figura 5D) o que resultou em ausência de diferença no índice de TyG (Figura 5E); ii) no período pós-lactação (12 semanas de indução com a dieta), apesar de não haver diferença estatística na glicemia em jejum (Figura 5F), as ratas DRS_{F0} apresentaram um perfil anormal de captação de glicose com diferença estatística, demonstrado pelo Teste Oral de Tolerância à Glicose (GTT) (CTR 583,3 ± 32,91 mg/dL vs. DRS 756,9 ± 16,40 mg/dL, $p = 0,0036$) (Figura 5G-H). Adicionalmente exibiram níveis de TGs significativamente maiores do que o grupo CTR_{F0} (Figura 5I) (CTR_{F0} 85,23 ± 31,82 mg/dL vs. DRS_{F0} 166,7 ± 3,144 mg/dL, $p = 0,0291$) resultando em diferença estatística no índice de TyG (Figura 5J) (CTR 8,23 ± 0,36 vs. DRS 9,03 ± 0,03, $p = 0,04$).

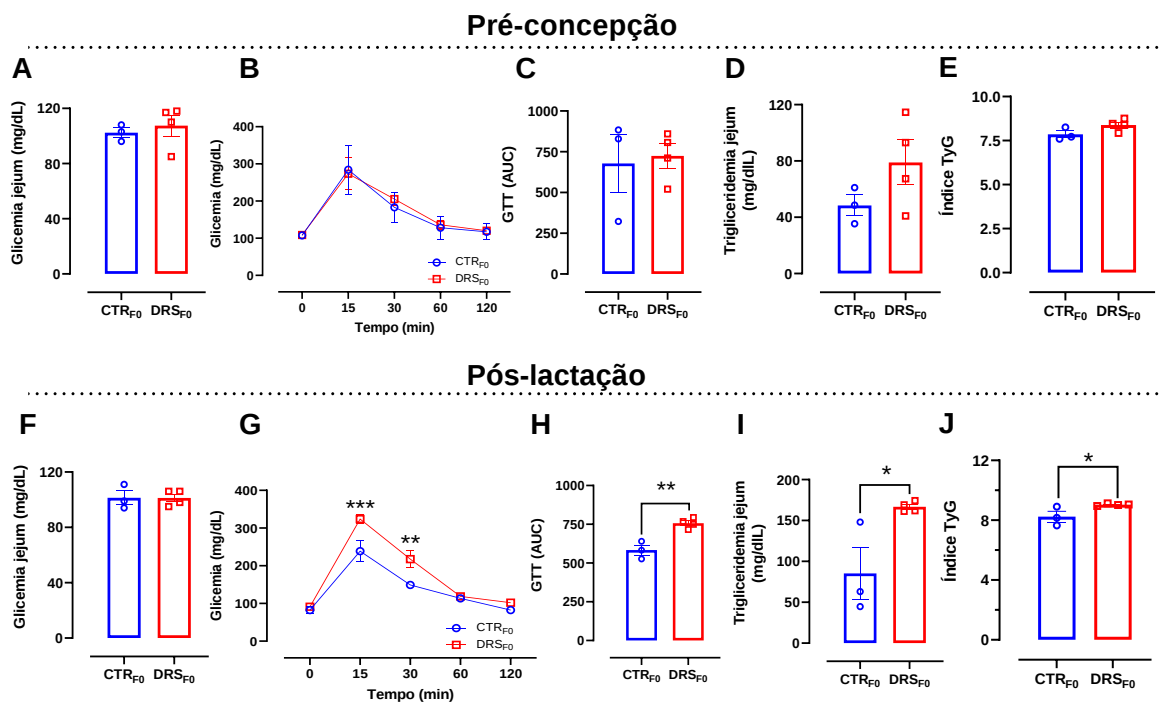


Figura 5. Parâmetros bioquímicos de ratas na pré-concepção e pós-lactação. Ratas pré-concepção: (A) Glicemia em jejum; (B) Teste de tolerância à glicose; (C) Área sobre a curva; (D) triglicerídeos; (E) Índice de TyG. Ratas pós-lactação: (F) Glicemia em jejum; (G) Teste de tolerância à glicose; (H) Área sobre a curva; (I) triglicerídeos; (J) índice de TyG. Os valores foram expressos com média ± e.p.m., sendo CTR (n= 3) e DRS (n= 4). A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.

5.2 Análise Histopatológica e Quantificação do Conteúdo de Gordura Hepática Materno

Foram realizadas análises histopatológicas e de quantificação de gordura hepática com o objetivo de verificar o impacto da DRS no desenvolvimento de DHGNA nas mães. Os grupos de mães CTR e DRS não apresentaram diferença estatística na avaliação histológica do conteúdo de gordura hepática por coloração com Oil red-O (Figura 6 A e B). O mesmo resultado foi encontrado quando foi quantificado o conteúdo de gordura hepática dos grupos CTR e DRS, que não demonstraram diferença da quantidade de gordura hepática total nem de triglicerídeo hepático (Figuras 6D e E).

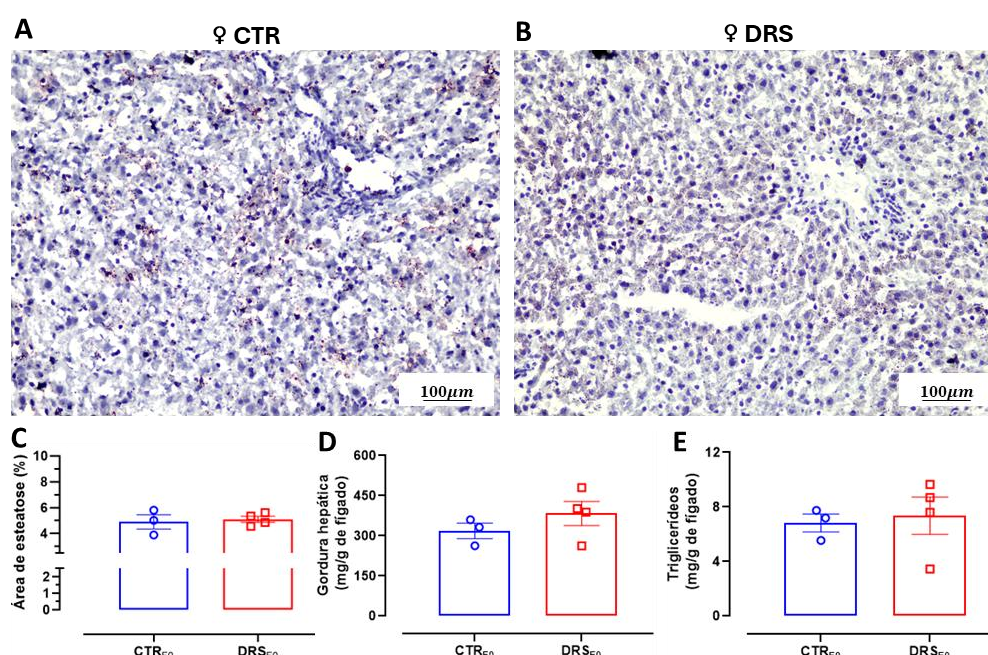
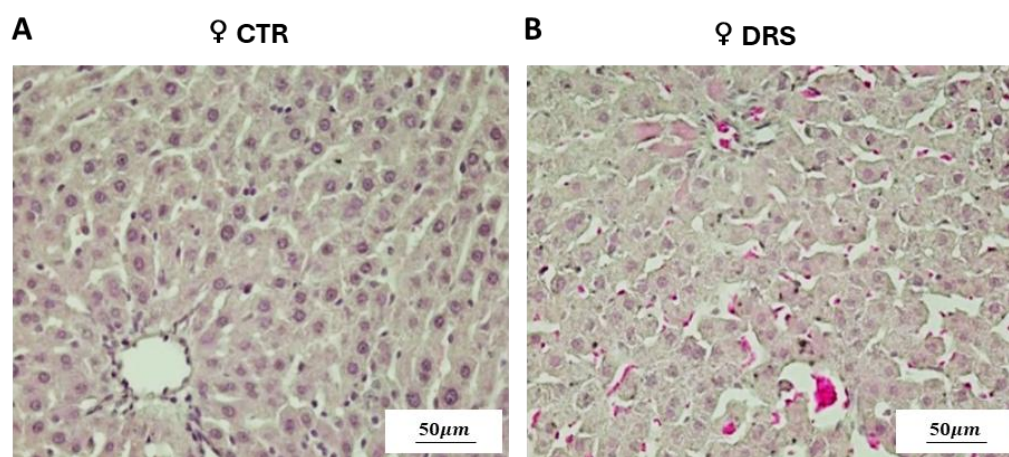


Figura 6. Análise histológica e do conteúdo de gordura hepática da geração F0. Seções de amostras de fígado coradas em Oil red - O na objetiva de 20x. (A) Grupo CTR; (B) Grupo DRS; (C) Área de esteatose; (D) Gordura hepática; (E) Triglicerídeos. Sendo CTR (n= 3) e DRS (n=4). A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. Os valores foram expressos com média $\pm$ e.p.m.

Embora não tenha sido observado diferença no acúmulo de gordura hepática, a análise histopatológica de lâminas coradas com H&E foi realizada para avaliação do volume hepatocelular e da possível presença de infiltração inflamatória. Como pode ser observado, a exposição perinatal à DRS não promoveu o desenvolvimento da DHGNA materna, visto que não houve diferenças no grau de esteatose, balonização e presença de infiltrado inflamatório comparado ao CTR, embora tenha causado aumento de peso e hipertrigliceridemia (Figura 7A-B).



Mães	Grupos	
	CTR	DRS
Esteatose hepática	0,66±0,66	1,25±0,47
Balonização	0,66±0,66	0,75±0,47
Inflamação Lobular	0,00±0,00	0,00±0,00
Inflamação Portal	0,00±0,00	0,00±0,00
Total	1,33±1,33	2,00±0,81

Figura 7. Análise histopatológica hepática de mães CTR e DRS. Seções de amostras de fígado coradas com H&E na objetiva de 40x. (A) Grupo CTR; (B) Grupo DRS. Para visualização das morfologias dos hepatócitos e pontuação para esteatose, balonismo e inflamação, avaliados em ratas alimentadas com ração padrão CTR (n=3) e dieta rica em sacarose DRS (n=4). Valores expressos com média $\pm$ e.p.m.

5.3 Efeito da dieta materna sobre o perfil ponderal da prole

Baseado no impacto da influência de dietas sob o ponto de vista intergeracional, verificamos qual a implicação da dieta materna DRS sobre a saúde metabólica da prole, avaliando os descendentes machos e fêmeas aos 30 e 90 dias de vida alimentados com dieta padrão após o desmame.

Com o objetivo de verificar se havia diferença de peso entre os descendentes de mães CTR e DRS, a prole foi pesada nos dias pós-natal 0, 7, 14, 21, além de dois dias na semana após o desmame. Até o 30º dia de vida não houve influência da DRS no peso da prole de ambos os sexos, como evidenciado nas Figuras 8A-B. No entanto, na prole masculina oriunda de mães DRS foi observado aumento de peso comparada à prole de mães CTR a partir do 49º dia de vida até a eutanásia aos 90 dias (CTR $366,2 \pm 225,6$ g vs. DRS $432,2 \pm 248,0$ g, $p=0,001$) (Figura 8B).

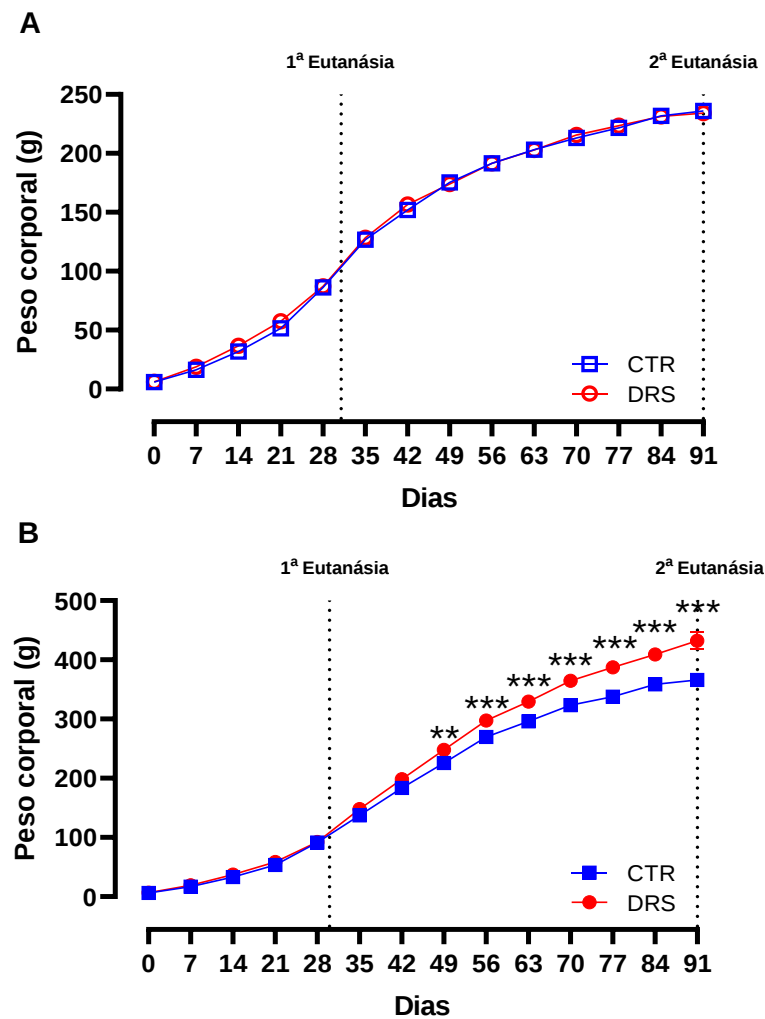


Figura 8. Evolução ponderal da prole aos 30 e 90 dias. (A) Fêmeas: Evolução ponderal no período lactacional e pós-desmame; (B) Machos: Evolução no mesmo período. Linhas vazadas representam fêmeas e linhas cheias representam machos. Valores expressos com média $\pm$ e.p.m., sendo prole 30 dias: CTR (♀n=6), DRS (♀n=6); CTR (♂n=5) DRS (♂n=6). Prole 90 dias: CTR (♀n=6), DRS (♀n=6); CTR (♂n=6) DRS (♂n=6). A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.

5.4 Efeito da dieta materna sobre o perfil morfométrico da prole durante a infância e idade adulta jovem

Aos 30 e 90 dias de vida, a prole, tanto fêmeas quanto machos, foi eutanasiada para a coleta de sangue e órgãos. As figuras 9A-F mostram a análise morfométrica dos órgãos das proles fêmeas aos 30 e 90 dias, descendentes de mães CTR_{F0} e DRS_{F0}. Aos 30 dias, observou-se diferença significativa apenas no peso dos ovários (CTR $0,055 \pm 0,006$ g vs. DRS $0,062 \pm 0,001$ g, $p = 0,01$) e do pâncreas (CTR $0,60 \pm 0,04$ g vs. DRS $0,71 \pm 0,02$ g, $p = 0,03$) com aumento nos órgãos das descendentes de mães DRS_{F0}.

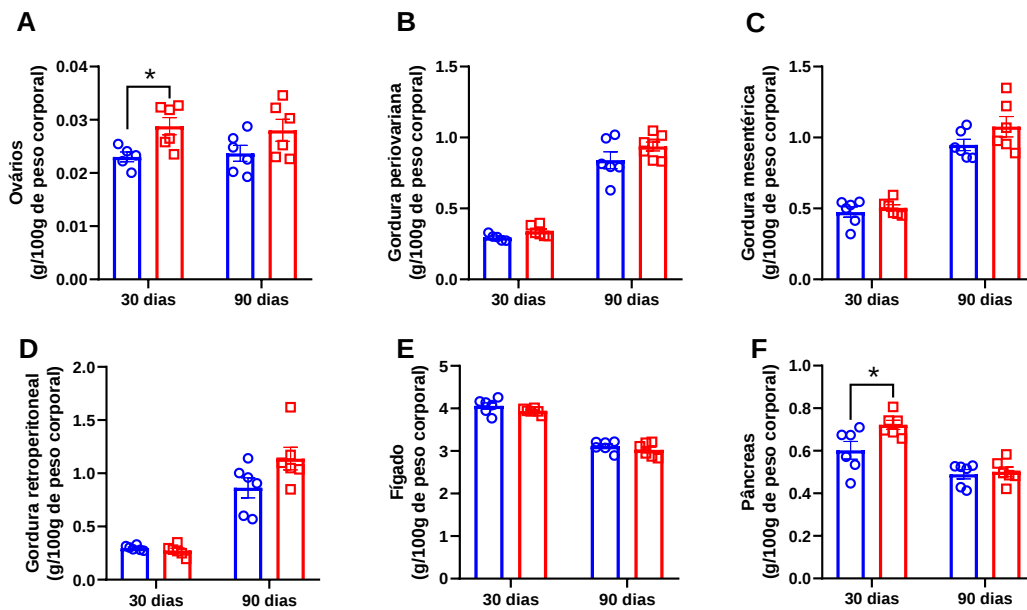


Figura 9. Parâmetros morfométricos de órgãos e tecidos da prole 30 e 90 dias. Fêmeas: (A) Ovários; (B) Gordura periovariana; (C) Gordura periuterina; (D) Gordura mesentérica; (E) Gordura Retroperitoneal; (F) Fígado (G) Pâncreas. Valores expressos com média $\pm$ e.p.m., sendo prole 30 dias: CTR ($\varnothing$ n=6), DRS ($\varnothing$ n=6). Prole 90 dias: CTR ($\varnothing$ n=6), DRS ($\varnothing$ n=6). A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

Na análise morfométrica da prole de machos descendentes de mães CTR_{F0} e DRS_{F0} representadas nas figuras 10A-F, observou-se que aos 30 dias apenas a gordura periepídimal dos machos DRS₃₀ aumentou comparado ao CTR₃₀ (CTR $0,37 \pm 0,00$ g vs. DRS $0,40 \pm 0,00$ g, $p = 0,01$) (Fig. 10B). Aos 90 dias, constatou-se que apenas a gordura retroperitoneal dos machos DRS₉₀ aumentou estatisticamente comparado ao CTR₉₀ (CTR $1,49 \pm 0,18$ g vs. DRS $2,09 \pm 0,14$ g, $p = 0,02$), (Figura 10D). O peso dos outros órgãos não apresentou diferenças significativas entre os grupos.

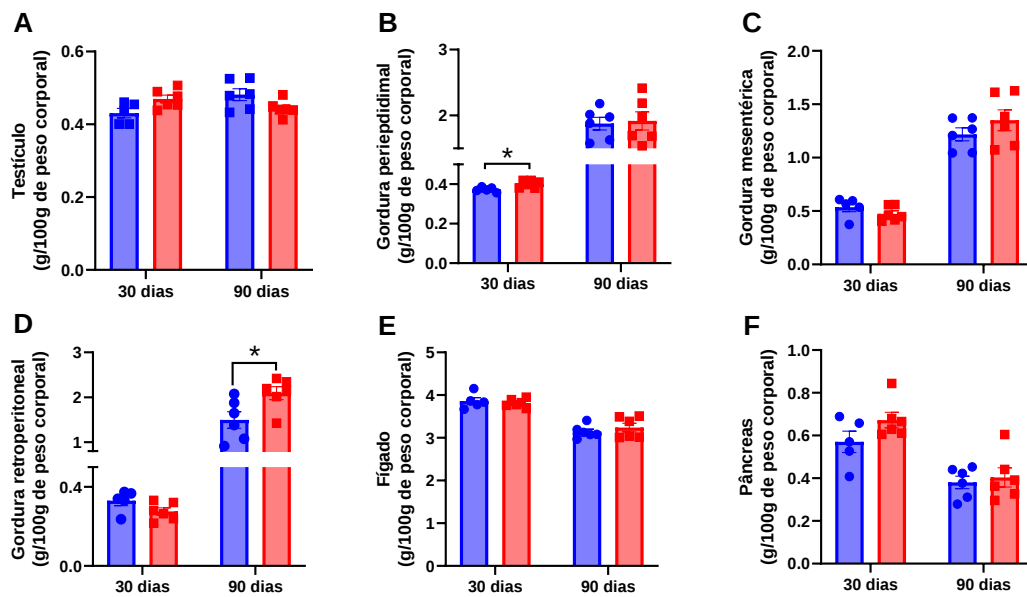


Figura 10. Parâmetros morfométricos de órgãos e tecidos da prole 30 dias. Machos: (A) Testículo; (B) Gordura periepídimal; (C) Gordura mesentérica; (D) Gordura retroperitoneal; (E) Fígado; (F) Pâncreas. Valores foram expressos com média $\pm$ e.p.m., sendo prole 30 dias: CTR (♂ n=5) DRS (♂ n=6). Prole 90 dias: CTR (♂ n=6) DRS (♂ n=6). A análise estatística foi realizada através do teste t de Student. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

5.5 Efeito da dieta materna sobre o perfil bioquímico da prole durante o período da infância e idade adulta

No panorama bioquímico da prole descendente de mães CTR_{F0} e DRS_{F0}, observou-se um perfil distinto de resposta entre os grupos, sexos e idades. Aos 30 dias, foi observada uma diferença significativa nos níveis de glicemia em jejum pós-lactação nas fêmeas de mães DRS comparada àquelas de mães CTR (CTR=120.0 $\pm$ 3.16 mg/dL vs. DRS=131.0 $\pm$ 3.26 mg/dL, $p=0,04$), sendo essa diferença perdida aos 90 dias (Figura 11A). Nestes mesmos animais aos 30 e 90 dias, não houve alteração nos níveis de colesterol e triglicerídeos e no índice TyG (Figuras 11B-C). Nos machos, os resultados apresentaram diferenças notáveis comparados ao perfil bioquímico das fêmeas: enquanto não houve diferença significativa nos níveis de glicemia, observou-se um aumento significativo nos triglicerídeos dos machos DRS₃₀ e DRS₉₀ (CTR₃₀=43,10 $\pm$ 8,49 mg/dL vs. DRS₃₀=74,17 $\pm$ 10,18 mg/dL, $p=0,04$ / CTR₉₀=113,0 $\pm$ 15,20 mg/dL vs. DRS₉₀= 192,4 $\pm$ 17,90 mg/dL, $p < 0,01$), sem diferença estatística nos níveis de colesterol (Figuras 11D-E). Os machos DRS₃₀ e DRS₉₀ ainda apresentaram com alteração no índice TyG (CTR₃₀=7,74 $\pm$ 0,19 vs. DRS₃₀=8,38 $\pm$ 0,14, $p=0,02$ / CTR₉₀=8,68 $\pm$ 0,16 vs. DRS₉₀=

$9,34 \pm 0,15$, $p=0,01$) quando comparados aos grupos controles, indicando menor sensibilidade à ação da insulina (Figura 11F).

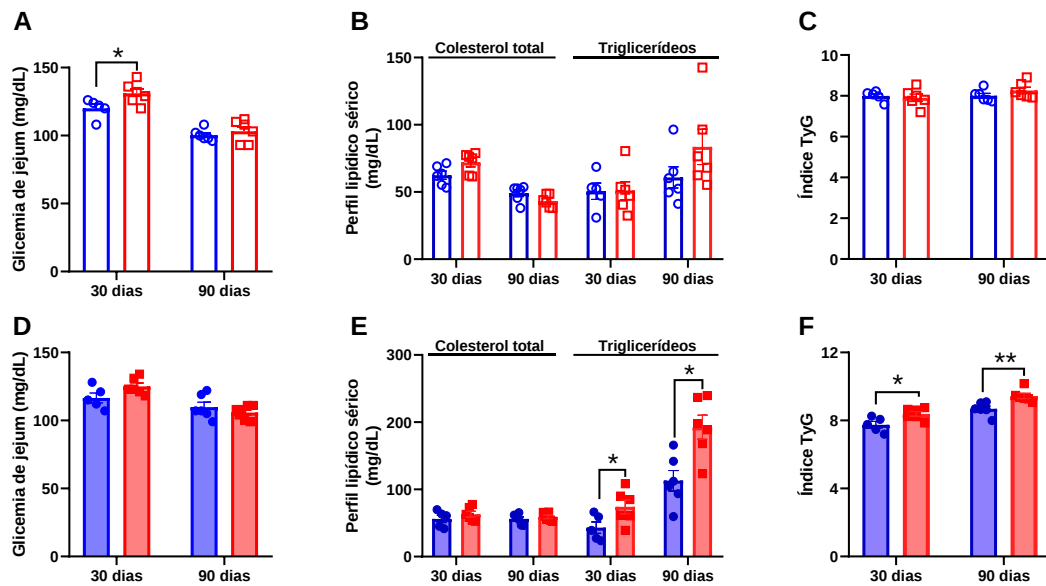


Figura 11. Parâmetros bioquímicos da prole 30 e 90 dias. Fêmeas: (A) Glicemia em jejum pós lactação; (B) Perfil lipídico sérico; (C) Índice de TyG. Machos: (D) Glicemia em jejum pós lactação; (E) Perfil lipídico sérico; (F) Índice de TyG. Barras vazadas representam fêmeas e barras cheias representam machos. Valores expressos com média $\pm$ e.p.m., sendo prole 30 dias: CTR (♀n=6), DRS (♀n=6); CTR (♂n=5) DRS (♂n=6). Prole 90 dias: CTR (♀n=6), DRS (♀n=6); CTR (♂n=6) DRS (♂n=6). A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ quando comparado ao grupo controle.

5.6 Influência da exposição materna à dieta rica em açúcares no perfil histopatológico e no acúmulo de gordura hepática dos descendentes

Para determinar o impacto da DRS materna no surgimento e desenvolvimento de DHGNA nos seus descendentes, foram conduzidas análises histopatológicas e de acúmulo de gordura hepática em fígados coletados após eutanásia aos 30 e 90 dias. O conteúdo de gordura hepática foi analisado através da marcação das gotículas de gordura com corante Oil Red-O, padrão ouro para avaliar esteatose. Na prole aos 30 dias, os resultados obtidos demonstraram esteatose significativa nas fêmeas e nos machos oriundos de mães DRS, comparadas aos animais CTR (fêmeas: CTR = $1,78 \pm 0,09\%$ vs. DRS = $2,74 \pm 0,22\%$, $p<0,01$, Figura 12 A-C) e (machos: CTR = $1,86 \pm 0,27\%$ vs. DRS = $3,13 \pm 0,24\%$, $p<0,01$, Figura 12 F-H). O consumo de DRS materno não impactou no conteúdo de gordura hepática total em machos e fêmeas como demonstrado nas figuras 12 D e I, respectivamente. Em contrapartida, o conteúdo de triglicerídeos hepático foi significativamente maior nas fêmeas descendentes de mães DRS

comparadas às CTR (CTR = $11,12 \pm 0,51$ mg/g vs. DRS = $19,92 \pm 2,91$ mg/g, $p = 0,02$), porém esta resposta não foi observada nos machos.

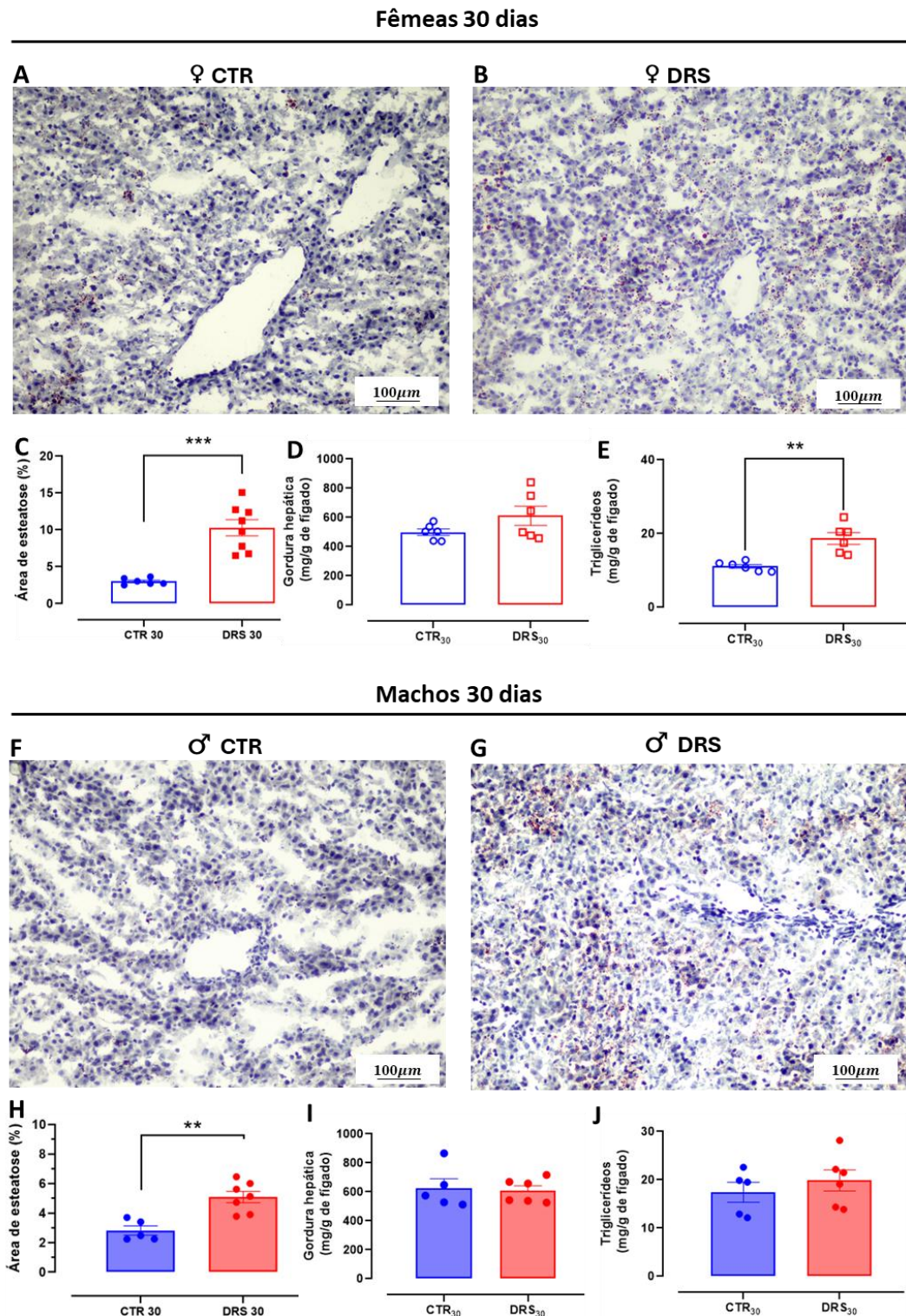


Figura 12. Análise histológica e do conteúdo de gordura hepática da Prole fêmeas e machos 30 dias. Seções de amostras de fígado coradas em Oil red - O na objetiva de 20x. Fêmeas: (A) CTR; (B) DRS; (C) Área de esteatose; (D) Gordura hepática; (E) Triglicerídeos. Machos: (F) CTR; (G) Área de esteatose; (H) Gordura hepática (I) Triglicerídeos. Barras vazadas representam fêmeas e barras cheias representam machos. Valores expressos com média $\pm$ e.p.m., sendo prole 30 dias: CTR (♀n=6), DRS (♀n=6); CTR (♂n=5) DRS (♂n=6). A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.

Na prole aos 90 dias, as fêmeas descendentes de mães DRS não apresentaram diferença estatística no grau de esteatose comparada às fêmeas CTR, embora seja possível sugerir uma tendência a maior área de esteatose por influência da DRS materna. Essa tendência é amparada pelos maiores níveis de gordura hepática (CTR₉₀ = 369,4 ± 9,04% vs. DRS₉₀ = 445,1 ± 30,07%, $p = 0,02$) e triglicerídeos hepáticos (CTR₉₀ = 15,61 ± 1,64% vs. DRS₉₀ = 23,23 ± 1,30%, $p < 0,01$) nas fêmeas DRS₉₀ (Figura 13 A-E). A prole de machos de mães DRS, por sua vez, apresentou significativa esteatose hepática comparado aos descendentes de mães CTR (CTR₉₀ = 0,88 ± 0,19% vs. DRS₉₀ = 2,59 ± 0,22%, $p < 0,01$), acompanhado de aumento de TGs hepático (CTR₉₀ = 18,76 ± 0,69 mg/g vs. DRS₉₀ = 23,48 ± 1,53 mg/g, $p = 0,02$), embora não tenha sido notado aumento de gordura hepática total (Figura 13 F-J).

A análise microscópica de cortes histológicos de fígado corados com H&E de acordo com o escore de atividade da DHGNA descrito por Pai *et al.* mostrou que, após 30 dias de vida, a prole de fêmeas DRS apresentou esteatose hepática microvesicular e presença de balonização dos hepatócitos comparado às fêmeas CTR (Figura 14), enquanto os machos de mães DRS apresentaram somente esteatose hepática microvesicular, comparados aos machos CTR (Figura 15).

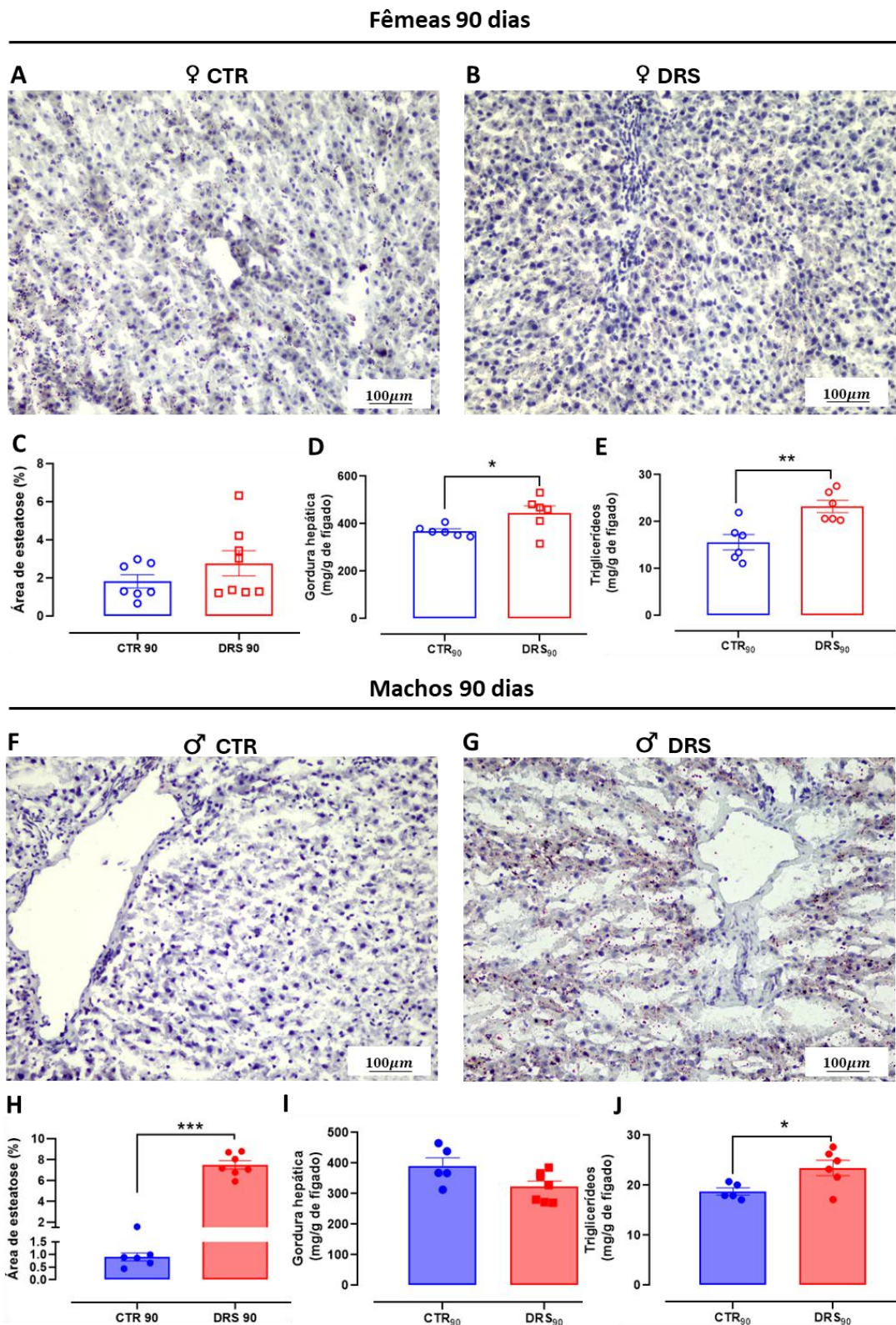
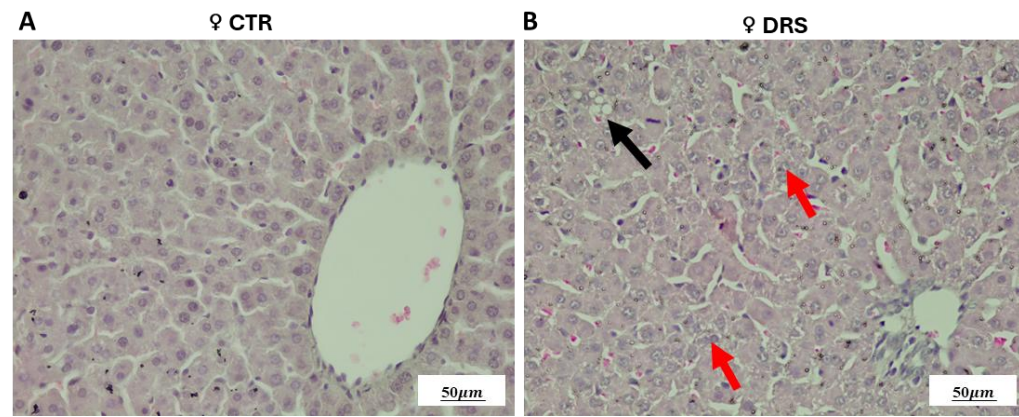
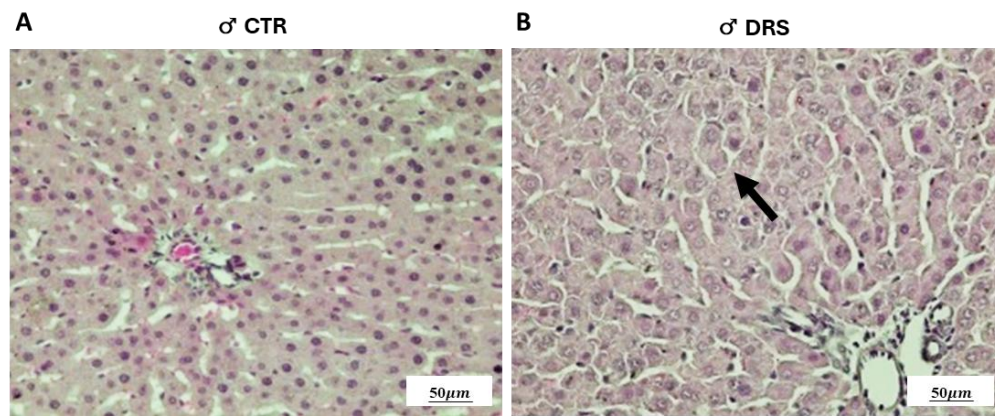


Figura 13. Análise histológica e do conteúdo de gordura hepática da Prole fêmeas e machos 90 dias. Seções de amostras de fígado coradas em Oil red - O na objetiva de 20x. Fêmeas: (A) CTR; (B) DRS; (C) Área de esteatose; (D) Gordura hepática; (E) Triglicerídeos. Machos: (F) CTR; (G) Área de esteatose; (H) Gordura hepática (I) Triglicerídeos. Barras vasadas foram utilizadas para a prole fêmea e barras cheias para os machos. Valores expressos com média $\pm$ e.p.m., sendo Prole 90 dias: CTR (♀n=6), DRS (♀n=6); CTR (♂n=5) DRS (♂n=6). A análise estatística foi realizada através do teste t de Student. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.



Prole 30 dias	Grupos	
	Fêmeas	
	CTR	DRS
Esteatose hepática	0,60 ± 0,24	1,87 ± 0,22**
Balonização	0,20 ± 0,20	2,00 ± 0,26***
Inflamação Lobular	0,60 ± 0,24	0,75 ± 0,31
Inflamação Portal	0,00 ± 0,00	0,12 ± 0,12
Total	1,40 ± 0,60	4,75 ± 0,49**

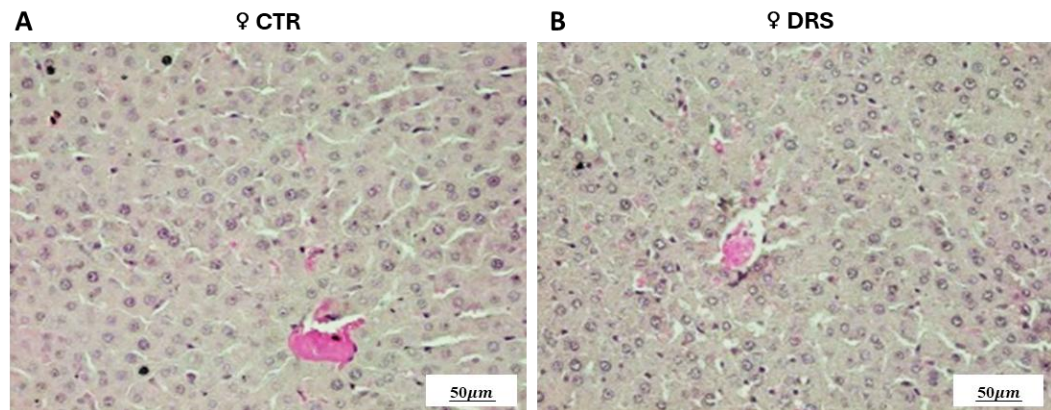
Figura 14. Análise histológica hepática da prole fêmeas de 30 dias. Seções de amostras de fígado coradas com H&E na objetiva de 40x para visualização das morfologias dos hepatócitos e pontuação para esteatose, balonismo e inflamação avaliados em ratos. As setas na cor preta indicam esteatose, e as setas vermelhas, balonização. Sendo fêmeas (CTR=6 e DRS=6). Valores expressos com média ± e.p.m. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.



Prole 30 dias	Grupos	
	Machos	
	CTR	DRS
Esteatose hepática	0,20 ± 0,20	1,50 ± 0,37*
Balonização	0,60 ± 0,24	1,75 ± 0,41
Inflamação Lobular	0,80 ± 0,37	1,37 ± 0,37
Inflamação Portal	0,00 ± 0,00	0,25 ± 0,16
Total	1,60 ± 0,67	4,87 ± 1,00*

Figura 15. Análise histológica hepática da prole machos de 30 dias. Seções de amostras de fígado coradas com H&E na objetiva de 40x para visualização das morfologias dos hepatócitos e pontuação para esteatose, balonismo e inflamação avaliados em ratos. As setas na cor preta indicam esteatose, e as setas vermelhas, balonização. Sendo machos (CTR=5 e DRS=6). Valores expressos com média ± e.p.m. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

No entanto, aos 90 dias de vida, o perfil observado foi invertido: as fêmeas apresentaram apenas esteatose hepática simples comparado ao grupo CTR (Figura 16), enquanto os machos apresentaram esteatose e balonização (Figura 17). Em nenhuma das proles em diferentes idades foi observada diferença estatística significativa em infiltrado lobular e portal.



Prole 90 dias	Grupos	
	Fêmeas	
	CTR	DRS
Esteatose hepática	0,33 ± 0,21	1,33 ± 0,33*
Balonização	0,00 ± 0,00	0,83 ± 0,40
Inflamação Lobular	0,50 ± 0,22	0,83 ± 0,40
Inflamação Portal	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Total	0,83 ± 0,40	2,66 ± 0,61*

Figura 16. Análise histológica hepática de fêmeas aos 90 dias. Seções de amostras de fígado coradas com H&E na objetiva de 40x para visualização das morfologias dos hepatócitos e pontuação para esteatose, balonismo e inflamação avaliados em ratos. Sendo, fêmeas (CTR=6 e DRS=6). Valores expressos com média ± e.p.m. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

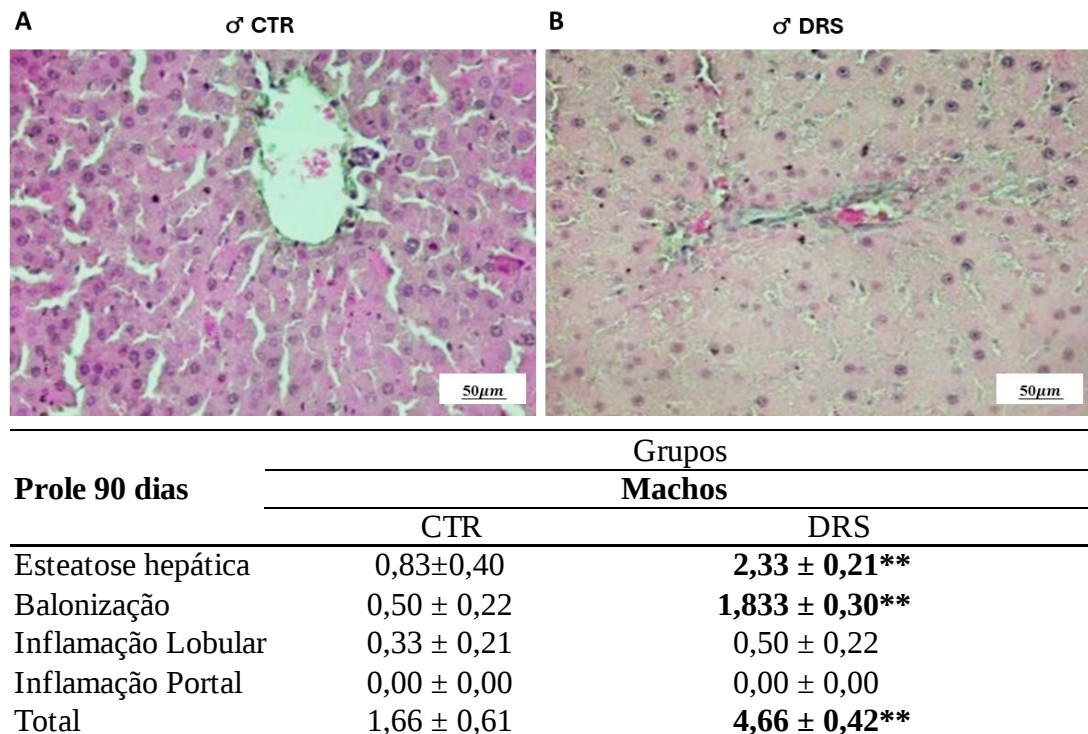


Figura 17. Análise histológica hepática de machos aos 90 dias. Seções de amostras de fígado coradas com H&E na objetiva de 40x para visualização das morfologias dos hepatócitos e pontuação para esteatose, balonismo e inflamação avaliados em ratos. Sendo, machos (CTR=6 e DRS=6). Valores expressos com média $\pm$ e.p.m. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle.

5.7 Expressão gênica de marcadores do metabolismo lipídico hepático

Para avaliar os efeitos da exposição materna à DRS no metabolismo lipídico do fígado da prole, realizamos a expressão gênica de marcadores moleculares envolvidos nas vias de síntese e degradação de ácidos graxos, bem como de fatores de transcrição envolvidos na lipogênese de novo.

Tomando como ponto de partida a via de lipogênese, nos descendentes de mães DRS, as fêmeas de 30 e 90 dias de vida apresentaram aumento significativo na expressão de FASN ($p < 0,01$ e $p < 0,0001$, respectivamente). De modo interessante, a expressão de *PPAR- γ* foi significativamente elevada nas fêmeas somente aos 90 dias ($p < 0,001$) (Figura 18A). Curiosamente, nos machos de 30 e 90 dias não houve diferença significativa na expressão dos genes lipogênicos entre a prole oriunda de mães DRS *versus* CTR, com exceção da menor expressão de *PPAR- γ* aos 30 dias ($p < 0,05$) (Figura 18D).

Na análise da via de beta-oxidação, houve regulação positiva dos genes *PGC1 α* ($p < 0,05$) e *PPAR α* ($p < 0,01$) nas fêmeas apenas aos 90 dias (Figura 18B), no entanto, sem

diferença na expressão de genes dessa via em machos de mães DRS, aos 30 e 90 dias de vida (Figura 18 E).

Quanto à expressão dos fatores de transcrição, não houve diferença estatística entre as descendências de mães DRS e CTR, tanto nas fêmeas (Figura 18 C) quanto nos machos, embora possa ser observada uma tendência a regulação positiva dos genes *ChREBP* e *SREBP-1c* nos machos DRS aos 30 e 90 dias de vida (Figura 18 F).

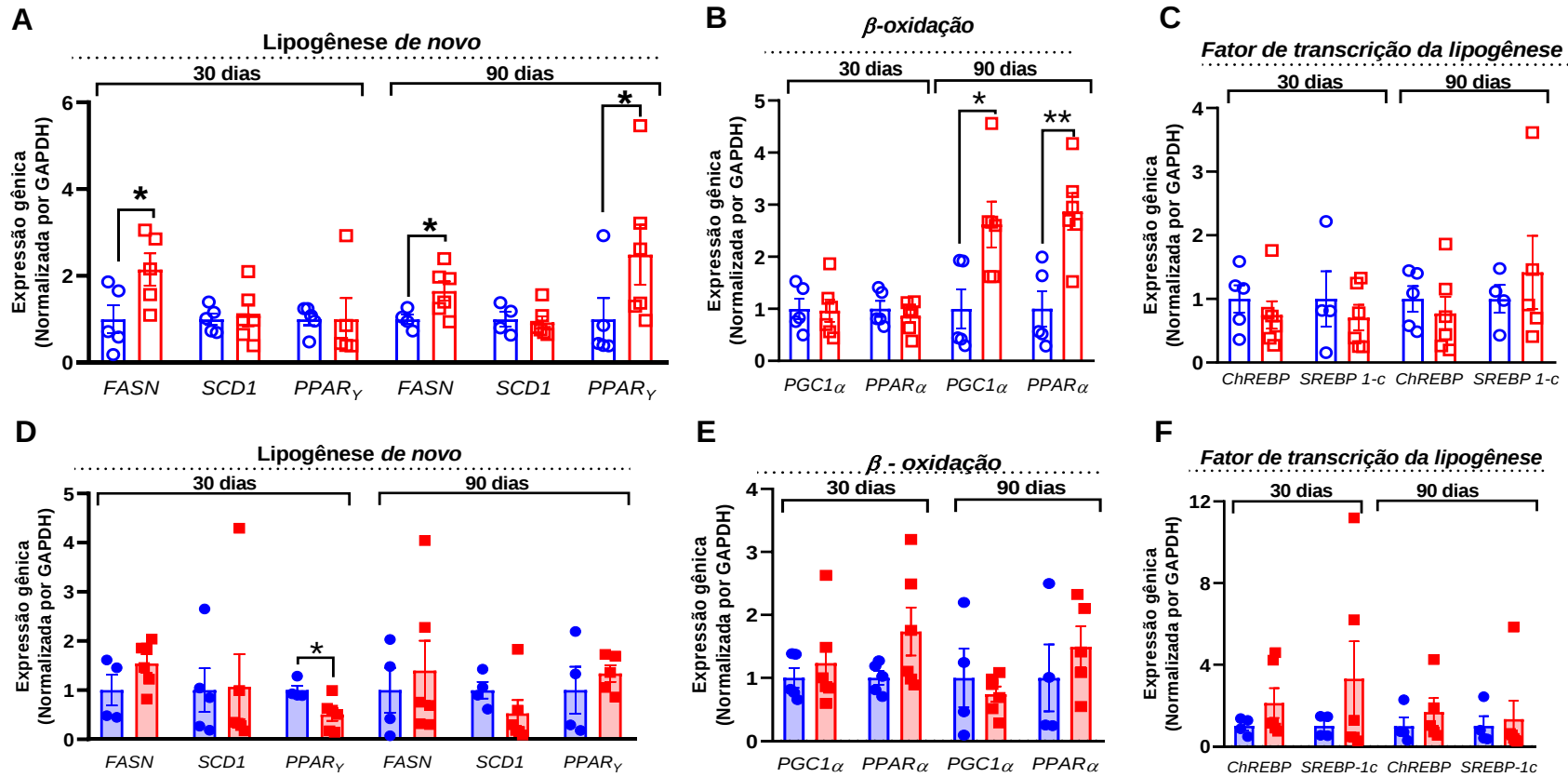


Figura 18. Expressão gênica de marcadores lipogênicos hepáticos no fígado. Genes envolvidos na lipogênese de novo (FASN, SCD1, PPAR γ) (A-D), oxidação de ácidos graxos (PGC1- α , PPAR- α) (B-E) e fator de transcrição (ChREBP-1c, SREBP-1c) (C-F). As barras vasadas foram utilizadas para a prole fêmea e barras cheias para os machos. Sendo prole 30 dias: CTR (♀n=4), DRS (♀n=5); CTR (♂n=4), DRS (♂n=5). Prole 90 dias: CTR (♀n=4), fêmeas DRS (♀n=5); CTR (♂n=4), DRS (♂n=5). Todas as expressões gênicas foram normalizadas para os níveis de GAPDH e expressas como valores de alteração de dobra de $2^{-\Delta\Delta TC}$, conforme determinado pela amplificação em tempo real. Valores foram expressos com média $\pm$ e.p.m. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ quando comparado ao grupo controle.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos os efeitos da exposição materna a uma dieta rica em sacarose durante o período perigestacional no desenvolvimento precoce de disfunções metabólicas, como a esteatose hepática, na prole. Observamos que as mães alimentadas com DRS desde o desmame até o fim da lactação, apresentaram disfunção metabólica significativa, com ganho de peso, hipertrigliceridemia e resistência à insulina, o que impactou a prole de maneira sexo-específica. Os machos mostraram maior suscetibilidade metabólica aos 30 e 90 dias, com aumento de triglicerídeos hepáticos e resistência à insulina. Em contraste, as fêmeas apresentaram atenuação na esteatose hepática na fase adulta, possivelmente devido à ação protetora do estrogênio, que favorece a beta-oxidação e a quebra lipídica. Esses mecanismos hormonais podem explicar a menor prevalência e gravidade da DHGNA em fêmeas, enquanto os machos permanecem mais vulneráveis aos efeitos adversos da dieta materna.

O ganho de peso materno observado neste trabalho está diretamente relacionado ao consumo excessivo de açúcares de adição durante a gestação, conforme demonstrado em outros estudos (Ruchat *et al.*, 2018). A hipertrigliceridemia resulta da síntese e secreção aumentada de triglicerídeos de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) pelo fígado e redução na depuração extra-hepática (Rodríguez *et al.*, 2013). A RI materna, um mediador central da obesidade e diabetes, reforça a conexão entre a dieta materna e a disfunção metabólica (Thomas *et al.*, 2019).

Estudos em diferentes espécies animais já exploraram como a obesidade materna e dietas obesogênicas, especialmente ricas em açúcares, afetam o ambiente intrauterino em períodos distintos de exposição (Bayol *et al.*, 2010). Esses trabalhos mostram que descendentes de mães obesas apresentam maior propensão a desenvolver disfunções metabólicas, aumentando sua vulnerabilidade à SM e à DHGNA (Seib *et al.*, 2023). Embora a maioria das investigações tenha focado em dietas hiperlipídicas (Lee *et al.*, 2023; Nevzorova *et al.*, 2020) ou ocidentais (Im *et al.*, 2021), dados recentes e ainda não publicados de nosso grupo de pesquisa revelam que a exposição perigestacional à sacarose também induz a SM na prole adulta (Soares, 2022; Ribeiro, 2023).

Ao avaliarmos o impacto da dieta materna sobre o perfil metabólico da prole, identificamos diferenças sexo-dependentes e buscamos compreender os mecanismos pelos quais o consumo excessivo de sacarose durante o período perigestacional afeta negativamente o metabolismo hepática dos descendentes. Um diferencial importante deste estudo foi a

realização de análises longitudinais focadas no fígado, conduzidas em dois períodos distintos: aos 30 e 90 dias de vida da prole. Nossos resultados mostraram que o estado nutricional materno durante o período perinatal pode estar associado a alterações hepáticas observadas aos 30 dias de vida, que podem contribuir para a progressão de distúrbios metabólicos aos 90 dias de vida, com respostas distintas entre machos e fêmeas. Essa diferença sexual também se reflete no desenvolvimento de RI. No nosso estudo, a RI foi avaliada por meio do índice TYG, com diferenças significativas observadas apenas nos machos aos 30 e 90 dias de vida, indicando o início de RI periférica.

A prole de machos exposta à sacarose tanto durante a fase intrauterina quanto na amamentação desenvolveu características clássicas de SM ao longo da vida, incluindo ganho de peso, hiperglicemia, hipertrigliceridemia e RI aos 30 e 90 dias de vida. A exposição precoce à sacarose favoreceu o aumento da gordura periepididimal aos 30 dias de vida e retroperitoneal aos 90 dias de vida, indicativos de adiposidade aumentada. Considerando a relação da gordura periepididimal com o desenvolvimento e a função dos tecidos reprodutivos masculinos, também analisamos o peso dos testículos. No entanto, não identificamos diferença significativa aos 30 dias, embora tenha sido observada uma tendência de aumento no grupo DRS.

Lomas-Soria *et al* (2018), observaram que os efeitos da programação de uma dieta obesogênica materna persistem e se intensificam no período pós-natal, especialmente aos 110 dias, quando os machos apresentam aumentos adicionais de triglicerídeos e RI. A RI periférica, que emerge nesse período, desempenha um papel central no aumento dos triglicerídeos séricos e está fortemente associada ao desenvolvimento da DHGNA (Fabbrini *et al.*, 2010). Os nossos dados experimentais em modelo animal corroboram com os achados de estudos em humanos (Cohen *et al.*, 2023), os quais demonstraram que uma alimentação inadequada durante a gestação está associada a um aumento significativo nas chances de a descendência desenvolver obesidade, diabetes mellitus tipo 2, hiperlipidemia, hipertensão arterial e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Essa concordância entre os resultados reforça a relevância do impacto da nutrição materna sobre a saúde metabólica da prole.

No estudo de Smith *et al.* (2022), foi demonstrado que a exposição fetal a uma ingestão materna excessiva de frutose (10% na água) elevou significativamente os níveis de triglicerídeos na prole masculina na fase adulta. Além disso, foi demonstrado que a exposição da prole a um ambiente pré e pós-natal com alto teor de gordura e sacarose levou ao aumento do peso corporal e da adiposidade nos filhotes (Ingvorsen *et al.*, 2021). Nossos achados também são consistentes com um estudo que investigou influências dietéticas semelhantes, onde dieta contendo 30% de sacarose diluída na água de beber, administradas por 30 dias, resultaram em

aumento do peso testicular em ratos eutanasiados aos 51 dias de vida (León-Ramírez *et al.*, 2021).

Do ponto de vista bioquímico, as implicações metabólicas refletidas na prole podem decorrer do fato de que a sacarose, quando hidrolisada, divide-se em duas moléculas distintas: glicose e frutose. Enquanto a glicose desencadeia uma resposta glicêmica e insulinêmica, a frutose é metabolizada no fígado, convertendo-se em trioses que podem ser utilizadas para a síntese de triglicerídeos e colesterol, influenciando o aumento de peso e adiposidade (Lee *et al.*, 2018). Ao investigarmos a influência de um ambiente intrauterino adverso no metabolismo hepático, nossos dados revelaram um quadro semelhante.

A análise histológica e a avaliação do conteúdo lipídico intra-hepático mostraram que, embora as mães expostas à DRS não tenham desenvolvido esteatose hepática, os machos da prole apresentaram deposição de gordura no fígado aos 30 e 90 dias de vida, acompanhada de elevação dos níveis de triglicerídeos. Foi observada esteatose microvesicular simples nos machos tanto aos 30 quanto aos 90 dias de vida, sem, no entanto, evoluir para NASH, conforme demonstrado pela análise histopatológica. A presença de esteatose microvesicular no fígado é um indicador de pior prognóstico e tem sido associada a um maior risco de balonização, disfunção mitocondrial e um fenótipo de fígado gorduroso mais grave (Tandra *et al.*, 2011).

Em roedores, a DHGNA apresenta variações, e estudos semelhantes aos nossos não relatam aumento na massa hepática, como observado em alguns trabalhos (Pinto *et al.*, 2016; Softic *et al.*, 2017; Flister *et al.*, 2018). No entanto, mesmo sem diferenças significativas no peso do fígado, há evidências de acúmulo de gordura ectópica e disfunção hepática. Esses efeitos estão amplamente associados à RI observada nos machos, que desempenha um papel chave na desregulação da lipogênese de novo. Esse processo, regulado pelo fígado, converte carboidratos em triglicerídeos, promovendo a exportação de lipídios na forma de VLDL (Tahri-Joutey *et al.*, 2021). Isso resulta no aumento da captação de ácidos graxos livres pelo fígado, intensificando a lipogênese e diminuindo a β -oxidação (Fabbrini *et al.*, 2010), levando ao acúmulo de lipídios no fígado e à lipotoxicidade (Liu *et al.*, 2010).

A prole de fêmeas aos 30 dias de vida, apresentou alterações no tamanho do pâncreas, possivelmente associado a adaptações metabólicas (Mizera *et al.*, 2022). Lomba *et al.* (2017) corroboram essa hipótese, demonstrando que dietas ricas em sacarose podem causar hipertrofia do pâncreas em ratos, aumentando a secreção de insulina em resposta às demandas metabólicas. Além disso, foi observada hiperglicemia em jejum nas fêmeas aos 30 dias de vida, o que pode estar relacionado às alterações na morfologia pancreática, embora essa conexão precise ser mais explorada em estudos futuros. Além disso, as fêmeas exibiram um aumento no peso dos ovários,

achado que está em concordância com estudos prévios conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa, os quais demonstraram que a exposição direta à dieta rica em sacarose (DRS) induz alterações ovarianas consistentes com características da síndrome do ovário policístico (DE MELO *et al.*, 2021).

Apesar de não apresentarem diferenças significativas de peso aos 30 e 90 dias de vida ou no perfil bioquímico aos 90 dias, foram detectadas alterações hepáticas nas fêmeas, sugerindo que a dieta pode impactar a função hepática mesmo sem mudanças significativas no peso corporal. Esse resultado corrobora, em parte, os achados de Lomas-Soria *et al.* (2018), que demonstraram que, em uma prole de mães alimentadas com uma dieta contendo 21% de açúcar simples, embora os pesos corporais tenham sido semelhantes entre os sexos, as fêmeas também começam a apresentar aumento nos níveis de triglicerídeos, embora as mudanças sejam menos pronunciadas em comparação com os machos (Lomas-Soria *et al.*, 2018). Isso indica que a gordura corporal e o metabolismo podem ser afetados pela exposição à dieta materna, independentemente do peso inicial entre os sexos.

Foi observada esteatose microvesicular simples nas fêmeas, tanto aos 30 quanto aos 90 dias, sem, no entanto, evoluir para NASH. Nossos resultados evidenciaram a presença de esteatose hepática com perfis diferentes entre a prole machos e fêmeas. Em oposição aos estudos que relatam a não persistência da DHGNA na idade adulta, aqui demonstramos a persistência de conteúdo lipídico no fígado dos animais aos 90 dias, sobretudo nos machos DRS. Além disso, observamos diferenças marcantes entre os sexos, com machos apresentando maior predisposição à esteatose hepática em comparação às fêmeas. Essa diferença entre os sexos pode sugerir uma maior vulnerabilidade metabólica nos machos em resposta à dieta obesogênica materna. A coincidência temporal entre o desenvolvimento da RI e o surgimento da DHGNA é crítica, uma vez que a RI é um fator central na disfunção da SM e está diretamente relacionada ao aumento dos triglicerídeos séricos (Fabbrini *et al.*; 2010).

Para investigar os mecanismos hepáticos que predisõem os descendentes de mães DRS à DHGNA, foi observada a expressão de genes lipogênicos nas fêmeas e machos DRS aos 30 e 90 dias de vida. Houve superexpressão de *FASN* nas fêmeas em ambos os períodos e de *PPAR-γ* aos 90 dias, contribuindo para a patogênese do fígado gorduroso. A este respeito, tem sido observado que ratos alimentados com uma dieta rica em gordura e alto teor de açúcar (HFHS) 7,5% de sacarose, apresentaram esteatose hepática significativa, com aumento de 1,8 vezes nos triglicerídeos hepáticos e regulação positiva do *PPAR-γ* (Abrahams *et al.*, 2023).

Embora tenha ocorrido regulação positiva de genes lipogênicos aos 30 e 90 dias, as fêmeas demonstraram uma atenuação no grau de esteatose hepática aos 90 dias. Esse efeito

pode ser explicado pelo aumento na expressão de genes envolvidos na β -oxidação, como *PGC1 α* e *PPAR α* , especialmente aos 90 dias. Esses genes desempenharam um papel crucial na oxidação de ácidos graxos, sugerindo que, embora o metabolismo hepático das fêmeas esteja propenso à formação de gordura, essa resposta é contrabalanceada ao longo do tempo pela intensificação da quebra lipídica via β -oxidação. O *PPAR α* é o regulador central do metabolismo oxidativo dos ácidos graxos, promovendo a transcrição da CPT-1 α , que catalisa a etapa limitante da taxa na β -oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias (Bougarne *et al.*, 2018). Assim, é razoável inferir que a superexpressão de *PPAR α* em fêmeas DRS aos 90 dias os impediram de desenvolver DHGNA, apesar da alta expressão de *FASN* e *PPAR- γ* .

Na prole de machos submetidos a DRS, tanto aos 30 quanto aos 90 dias de vida, observou-se uma tendência de aumento na expressão de *FASN*, sugerindo uma lipogênese de novo potencialmente disfuncional. Esse aumento pode refletir um processo patológico, uma vez que a síntese exacerbada de ácidos graxos pode contribuir para a disfunção metabólica e hepática (Ng *et al.*, 2022). Estudos, como o de Smith *et al.* (2022), demonstram a regulação positiva de *FASN* na prole adulta de mães alimentadas com uma dieta contendo 10% de frutose, o que reforça a hipótese de que essa alteração na expressão de *FASN* pode estar associada à predisposição ao desenvolvimento de DHGNA e outras disfunções metabólicas.

Curiosamente, aos 30 dias os machos apresentaram redução na expressão de *PPAR- γ* , o que contrapõe muitos estudos visto o papel do *PPAR- γ* na promoção de lipogênese (Gavrilova *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2023). Por outro lado, a expressão de *PPAR- γ* nos tecidos hepáticos de ratos machos alimentado com HFHS durante 6 semanas revelou uma regulação negativa significativa. A regulação negativa está de acordo com vários estudos sobre diferentes tipos de dietas (Dong *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2021). A diminuição dessa expressão está associada à tentativa do organismo de reduzir a síntese de ácidos graxos e lipídios em resposta ao estresse metabólico causado pela dieta (Ragab *et al.*, 2015).

Os resultados que mostram a ausência de alterações significativas na expressão dos genes relacionados à β -oxidação (*PPAR α* e *PGC1 α*) e fatores de transcrição (*ChREBP*, *SREBP1-c*) em machos aos 30 e 90 dias indicam que o desenvolvimento de DHGNA nos machos pode estar sendo mediado por mecanismos distintos das vias clássicas de regulação lipídica. Isso sugere que, ao contrário das fêmeas, os machos podem estar mais susceptíveis a alterações metabólicas que não dependem diretamente da regulação de β -oxidação e lipogênese de novo via *PPAR α* e *ChREBP/SREBP1-c* (Tilg *et al.*, 2008).

Apesar dos mecanismos moleculares que contribuem para a desregulação da DNL não estarem completamente elucidados, é bem estabelecido que a hiperglicemia e a RI, tanto no

fígado quanto nos tecidos periféricos, desempenham um papel crucial (Blüher *et al.*, 2020). O excesso de glicose e insulina interferem no sistema lipogênico hepático, levando à ativação anormal dos fatores de transcrição *SREBP* e *ChREBP*. Essa ativação exagerada aumenta a atividade das enzimas envolvidas na lipogênese e estimula a produção de lipídeos no fígado. Simultaneamente, há uma redução na função do *PPAR-α*, resultando na supressão da beta-oxidação e do transporte de ácidos graxos, o que agrava ainda mais o desenvolvimento da DHGNA (Burgeiro *et al.*, 2017).

Na literatura, estudos com ratos machos expostos a dietas obesogênicas apontam para mecanismos alternativos na progressão da DHGNA, como o aumento do estresse oxidativo e inflamação hepática. Um exemplo disso é o papel de citocinas inflamatórias, como $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6, que podem desencadear a RI e promover o acúmulo de lipídios no fígado, sem necessariamente envolver alterações significativas nos genes clássicos de β -oxidação ou lipogênese (Moayedfard *et al.*, 2022; Pierantonelli *et al.*, 2019). O trabalho de Elchaninov *et al.* (2019) aborda como a ativação de citocinas, como $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6, pode impactar a homeostase hepática sem a regulação direta de vias lipogênicas tradicionais. Diante desse contexto, é fundamental a realização de estudos adicionais para investigar as alterações na expressão proteica das citocinas inflamatórias e suas implicações na DHGNA.

Em nosso estudo, os machos DRS apresentam mudanças fisiológicas, bioquímicas e histológicas mais acentuadas associadas à DHGNA quando comparados às fêmeas, embora tais alterações funcionais não possam ser completamente explicadas pelo padrão de resposta observado dentro do panorama de expressão gênica observado no nosso estudo. Estudos epidemiológicos em humanos indicam que a prevalência de DHGNA é maior em homens do que em mulheres, com sintomas agravados nos homens (Teng *et al.*, 2023). Esse achado está em concordância com pesquisas realizadas em modelos animais, que mostram que ratos machos apresentam maior inflamação hepática e alterações metabólicas, tais como aumento da sensibilidade à insulina e alterações nos perfis lipoproteicos, em comparação com as fêmeas (Clapatiuc *et al.*, 2024).

Um estudo em ovelhas adultas indica que os estrogênios desempenham uma função protetora no fígado, enquanto os andrógenos intensificam a progressão da NASH (Hogg *et al.*, 2011). Adicionalmente, foi demonstrado uma redução nos níveis de testosterona sérica na prole de machos de mães que receberam 31% de açúcar simples (Santos *et al.*, 2015) e um aumento nos níveis de estradiol nas fêmeas.

Nossos resultados revelaram diferenças significativas na evolução da DHGNA entre machos e fêmeas em diferentes períodos, o que provavelmente contribui para as variações

sexuais observadas no fenótipo geral. Nos machos, os desfechos metabólicos parecem ter sido mais preocupantes, com maior predisposição à RI e ao acúmulo de gordura hepática, sugerindo maior vulnerabilidade metabólica nesse grupo. Esse entendimento é crucial para o desenvolvimento de intervenções personalizadas para cada sexo. Além disso, são necessários mais dados para estabelecer a conexão definitiva entre a dieta materna rica em sacarose, o desenvolvimento da DHGNA e as mudanças metabólicas em outros tecidos.

7 CONCLUSÃO

A crescente preocupação com o desenvolvimento da DHGNA na população jovem e adulta ressalta a importância das fases críticas de desenvolvimento para a formação de hábitos saudáveis. O presente estudo evidenciou que a exposição perigestacional a uma dieta rica em sacarose pode induzir o desenvolvimento da SM nas mães, impactando negativamente o metabolismo dos filhotes. Além disso, os resultados revelaram que o ambiente metabólico desfavorável das ratas que consumiram DRS durante períodos críticos de desenvolvimento causou efeitos adversos no perfil bioquímico e no desenvolvimento morfofuncional de sua prole. Isso predispunha os filhotes a condições relacionadas à SM, resultando em aumento da massa de órgãos em fêmeas e acúmulo de tecido adiposo perigonadal em machos. Essas alterações culminaram no desenvolvimento de esteatose hepática durante o período correspondente à infância em ambos os sexos, sendo essa condição mantida apenas nos machos na fase adulta jovem. Esse achado sugere que as fêmeas apresentam maior suscetibilidade no período pré-púbere, mas demonstram maior resistência na fase adulta, possivelmente devido ao papel protetor exercido pelos estrogênios.

Compreender os mecanismos metabólicos envolvidos na transmissão de efeitos adversos da dieta materna para a prole, especialmente em relação à RI e à lipogênese disfuncional, abre novas perspectivas para intervenções preventivas. Além disso, pesquisas futuras devem aprofundar as interações entre dieta, genética e ambiente, bem como avaliar a eficácia de intervenções nutricionais em diferentes populações. Investigações adicionais em modelos experimentais e estudos clínicos serão cruciais para esclarecer as complexas relações entre dieta e saúde metabólica. Assim, espera-se contribuir para um futuro em que a prevenção de DCNTs comece desde a infância, garantindo uma saúde melhor para as próximas gerações.

8 PRODUÇÕES ACADÊMICAS DURANTE O DOUTORADO

Durante o período de doutorado, dediquei-me em grande parte à pesquisa e à produção acadêmica, buscando contribuir de maneira significativa para o avanço do conhecimento em minha área de estudo. Ao longo deste período, tive a oportunidade de participar na elaboração de trabalhos resultando em diversas contribuições. Dentre as quais destaco o artigo intitulado “Analysis of the effect of the TRPC4/TRPC5 blocker, ML204, in sucrose-induced metabolic imbalance” (anexo B), este representou um marco em meu percurso acadêmico onde ampliei o conhecimento sobre os açúcares de adição e participei das análises histológicas apresentadas no artigo. Além disso, o artigo de revisão “An Overview of the TRP-Oxidative Stress Axis in Metabolic Syndrome: Insights for Novel Therapeutic Approaches” (anexo C) também foi de grande relevância, neste participei na elaboração de tópicos contribuindo para a literatura e produção científica. Outra contribuição deu-se no artigo “Cuminaldehyde potentiates the antimicrobial actions of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*” (anexo D), onde tive conhecimento na área de microbiologia participando no cultivo e manuseio de colônias de bactérias. Ainda, no artigo “Monitoring of Peripheral Blood Leukocytes and Plasma Samples: A Pilot Study to Examine Treatment Response to Leflunomide in Rheumatoid Arthritis” (anexo E) pude participar na coleta e análises de materiais biológicos dos pacientes participantes da pesquisa.

Ademais, durante meu doutorado, participei de congressos enriquecedores destacando o I Simpósio Nacional em Ciências da Saúde do PPGCS (anexo F) e do 55º Congresso Anual da SBFIS-Encontro Luso Brasileiro de Fisiologia- Symposium Miguel Covian- Latin American DOHaD Chapter, realizado no formato OnLine (anexo G). Além da XXXVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE) com apresentação de trabalho na modalidade oral “Perigestational high-sucrose intake leads to early NAFLD onset in the offspring of wistar rats” (anexo H). Essas experiências proporcionaram um ambiente propício para a troca de conhecimentos e o fortalecimento de parcerias acadêmicas.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, Yoonus *et al.* A high fat, high sugar diet induces hepatic Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha promoter hypermethylation in male Wistar rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 680, p. 25-33, 2023.
- AGARWAL, Prasoon *et al.* Maternal obesity, diabetes during pregnancy and epigenetic mechanisms that influence the developmental origins of cardiometabolic disease in the offspring. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 55, n. 2, p. 71-101, 2018.
- AHMED, Aijaz; WONG, Robert J.; HARRISON, Stephen A. Nonalcoholic fatty liver disease review: diagnosis, treatment, and outcomes. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 12, p. 2062-2070, 2015.
- ALBERTI, Kurt GMM *et al.* Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute; American heart association; world heart federation; international atherosclerosis society; and international association for the study of obesity. **Circulation**, v. 120, n. 16, p. 1640-1645, 2009.
- ALVES-BEZERRA, Michele; COHEN, David E. Metabolismo de triglicerídeos no fígado. **Comprehensive physiology**, v. 8, n. 1, p. 1, 2017.
- AMEER, Fatima *et al.* De novo lipogenesis in health and disease. **Metabolism**, v. 63, n. 7, p. 895-902, 2014.
- ARAÚJO, Ana Ruth *et al.* Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. **Liver International**, v. 38, p. 47-51, 2018.
- ARAÚJO, Sângela Maria Pereira *et al.* Pathways in the association between added sugar consumption, obesity in mother-child dyads, and chronic oral disease burden in early childhood. **European Journal of Oral Sciences**, v. 130, n. 2, p. e12847, 2022.
- ARENAZA, Lide *et al.* Dietary determinants of hepatic fat content and insulin resistance in overweight/obese children: a cross-sectional analysis of the Prevention of Diabetes in Kids (PREDIKID) study. **British Journal of Nutrition**, v. 121, n. 10, p. 1158-1165, 2019.
- ASHINO, Nicole G. *et al.* Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 23, n. 4, p. 341-348, 2012.
- BARKER, David JP. The fetal and infant origins of disease. **European journal of clinical investigation**, v. 25, n. 7, p. 457-463, 1995.
- BARKER, David JP; OSMOND, Clive. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **The Lancet**, v. 327, n. 8489, p. 1077-1081, 1986.

BARRIOS-CORREA, Alberto A.; ESTRADA, José A.; CONTRERAS, Irazú. Leptin signaling in the control of metabolism and appetite: lessons from animal models. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 66, n. 3, p. 390-402, 2018.

BAYOL, Stephanie A. *et al.* A maternal “junk food” diet in pregnancy and lactation promotes nonalcoholic fatty liver disease in rat offspring. **Endocrinology**, v. 151, n. 4, p. 1451-1461, 2010.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527-528, 1968.

BERGHEIM, Ina *et al.* Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. **Journal of hepatology**, v. 48, n. 6, p. 983-992, 2008.

BIANCHI, Antonella *et al.* Identification of an isozymic form of acetyl-CoA carboxylase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 3, p. 1502-1509, 1990.

BJÖRNTORP, Per; SJÖSTRÖM, Lars. Carbohydrate storage in man: speculations and some quantitative considerations. **Metabolism**, v. 27, n. 12, p. 1853-1865, 1978.

BLOCH, Katia Vergetti *et al.* ERICA: prevalences of hypertension and obesity in Brazilian adolescents. **Revista de saúde pública**, v. 50, p. 9s, 2016.

BLOMBERG, Jack *et al.* Sexual dimorphic gene expression profile of perirenal adipose tissue in ovine fetuses with growth restriction. **Frontiers in Physiology**, v. 14, p. 1179288, 2023.

BLOOMGARDEN, Zachary T. What will we see in diabetes in the next 10 years?. **Journal of Diabetes**, v. 16, n. 6, 2024.

BLÜHER, Matthias. Metabolically healthy obesity. **Endocrine reviews**, v. 41, n. 3, p. bnaa004, 2020.

BOUGARNE, Nadia *et al.* Molecular actions of PPAR α in lipid metabolism and inflammation. **Endocrine reviews**, v. 39, n. 5, p. 760-802, 2018.

BOVOLINI, António *et al.* Fisiopatologia da síndrome metabólica e fatores predisponentes. **Revista internacional de medicina desportiva**, v. 42, n. 03, p. 199-214, 2021.

BRINDLEY, D. N.; MATSUMURA, S.; BLOCH, K. Mycobacterium phlei fatty acid synthetase—a bacterial multienzyme complex. **Nature**, v. 224, n. 5220, p. 666-669, 1969.

BRONSON, Stefanie L.; CHAN, Jennifer C.; BALE, Tracy L. Sex-specific neurodevelopmental programming by placental insulin receptors on stress reactivity and sensorimotor gating. **Biological psychiatry**, v. 82, n. 2, p. 127-138, 2017.

BURGEIRO, Ana *et al.* Glucose and lipid dysmetabolism in a rat model of prediabetes induced by a high-sucrose diet. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 638, 2017.

- BURHANS, Maggie S. *et al.* Contribution of adipose tissue inflammation to the development of type 2 diabetes mellitus. *Comprehensive Physiology*, v. 9, n. 1, p. 1, 2018.
- CAMPESI, Ilaria *et al.* Sex-Gender-Based Differences in Metabolic Diseases. In: **Sex and Gender Effects in Pharmacology**. Cham: Springer International Publishing, 2023. p. 241-257.
- CHALASANI, Naga *et al.* The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 67, n. 1, p. 328-357, 2018.
- CHARLES, Marie-Aline; DELPIERRE, Cyrille; BREANT, Bernadette. Developmental origin of health and adult diseases (DOHaD): evolution of a concept over three decades. **médecine/sciences**, v. 32, n. 1, p. 15-20, 2016.
- CLAPATIUC, Valentin *et al.* A New Genetic Mouse Model of Lean NAFLD Uncovers a Sexual Dimorphism for Hepatic Damages and Cardiometabolic Impairments. **Physiology**, v. 39, n. S1, p. 469, 2024.
- COHEN, Catherine C. *et al.* Maternal diet quality during pregnancy and offspring hepatic fat in early childhood: the healthy start study. **The Journal of Nutrition**, v. 153, n. 4, p. 1122-1132, 2023.
- CRUZ, Josilda Ferreira *et al.* Relação entre a esteatose hepática não alcoólica e as alterações dos componentes da síndrome metabólica e resistência à insulina. **Rev Soc Bras Clin Med**, v. 14, n. 2, p. 79-83, 2016.
- D'ALESSANDRO, María Eugenia *et al.* Maternal sucrose-rich diet and fetal programming: changes in hepatic lipogenic and oxidative enzymes and glucose homeostasis in adult offspring. **Food & function**, v. 5, n. 3, p. 446-453, 2014.
- DA SILVA COELHO, Carla Cristine Nascimento *et al.* Incidence of metabolic syndrome in adults with healthy weight, normal weight obesity, and overweight/obesity. **Nutrition**, v. 85, p. 111134, 2021.
- DE LEÓN-RAMÍREZ, Yeimy Mar *et al.* Histomorphological testicular changes and decrease in the sperm count in pubertal rats induced by a high-sugar diet. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 235, p. 151678, 2021.
- DE LIMA, Daniel Carvalho *et al.* The enhanced hyperglycemic response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex. **Metabolic brain disease**, v. 23, p. 361-373, 2008.
- DE MELO, GB; SOARES, JF, COSTA, TCL, *et al.* Early Exposure to High-Sucrose Diet Leads to Deteriorated Ovarian Health. **Front Endocrinol (Lausanne)**. 2021;12:656831. Published 2021 Apr 19. doi:10.3389/fendo.2021.656831
- DE MELO PORTELA, Clarissa Lima; DE MELO, Maria Luisa Pereira; DE CARVALHO SAMPAIO, Helena Alves. Aspectos fisiopatológicos e nutricionais da doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA). **Rev Bras Nutr Clin**, v. 28, n. 1, p. 54-60, 2013.

DE SOUZA, Lidia Maria Oliveira *et al.* Prevalência de sobrepeso e obesidade em escolares de 7 a 10 anos e seus determinantes associados. **Saúde e Desenvolvimento Humano**, v. 8, n. 2, p. 29-37, 2020.

DEMES, Caio Alberto *et al.* O uso de métodos não invasivos na predição de fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica: uma revisão bibliográfica. 2020.

DENVER, Robert J.; MIRHADI, Nooshan; PHILLIPS, Marnie. Plasticidade adaptativa na metamorfose de anfíbios: Resposta de *Scaphiopus Hammondi* a dessecação do habitat. **Ecology**, v. 79, n. 6, p. 1859-1872, 1998.

DIETRICH, Peter; HELLERBRAND, Claus. Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. **Best practice & research Clinical gastroenterology**, v. 28, n. 4, p. 637-653, 2014.

DIGGLE, Christine P. *et al.* Both isoforms of ketohexokinase are dispensable for normal growth and development. **Physiological genomics**, v. 42, n. 4, p. 235-243, 2010.

DONG, Shi-Fen *et al.* Berberine attenuates cardiac dysfunction in hyperglycemic and hypercholesterolemic rats. *European journal of pharmacology*, v. 660, n. 2-3, p. 368-374, 2011.

DOUARD, Veronique; FERRARIS, Ronaldo P. The role of fructose transporters in diseases linked to excessive fructose intake. **The Journal of physiology**, v. 591, n. 2, p. 401-414, 2013.

DUNN, Gregory A.; BALE, Tracy L. Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice. **Endocrinology**, v. 150, n. 11, p. 4999-5009, 2009.

EILEEN, Lindsey; PETERSON, Maria. High-Fat Diets Fed during Pregnancy Cause Changes to Pancreatic Tissue DNA Methylation and Protein Expression in the Offspring: A Multi-Omics Approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 13, p. 7317, 2024.

ELCHANINOV, Andrey V. *et al.* Phenotypical and functional polymorphism of liver resident macrophages. **Cells**, v. 8, n. 9, p. 1032, 2019.

FALL, Caroline HD; KUMARAN, Kalyanaraman. Metabolic programming in early life in humans. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 374, n. 1770, p. 20180123, 2019.

FARIAS, C.R.L. *et al.* Persistent metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease in children and adolescents. *Rev. Bras. Enferm*, v. 71, n. 3, p. 1013-1021, 2018.

FERRARIS, Ronaldo P.; CHOE, Jun-yong; PATEL, Chirag R. Intestinal absorption of fructose. **Annual review of nutrition**, v. 38, n. 1, p. 41-67, 2018.

FLEGAL, Katherine M. *et al.* Trends in obesity among adults in the United States, 2005 to 2014. **Jama**, v. 315, n. 21, p. 2284-2291, 2016.

FLISTER, Karla Frida Torres *et al.* Long-term exposure to high-sucrose diet down-regulates hepatic endoplasmic reticulum-stress adaptive pathways and potentiates de novo lipogenesis in weaned male mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 62, p. 155-166, 2018.

FORSDAHL, Anders. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease?. **British journal of preventive & social medicine**, v. 31, n. 2, p. 91, 1977.

FRANÇA, Lucas Martins *et al.* Post-weaning exposure to high-sucrose diet induces early non-alcoholic fatty liver disease onset and progression in male mice: role of dysfunctional white adipose tissue. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 11, n. 5, p. 509-520, 2020.

FREEDMAN, Bethany D. *et al.* A dominant negative peroxisome proliferator-activated receptor- γ knock-in mouse exhibits features of the metabolic syndrome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 17, p. 17118-17125, 2005.

FUKUOKA, Hideoki. Fetal and neonatal origins for mental and developmental disorders from the stand point of DOHaD theory. **No to Hattatsu= Brain and Development**, v. 47, n. 3, p. 230-232, 2015.

GABORY, Anne *et al.* Maternal diets trigger sex-specific divergent trajectories of gene expression and epigenetic systems in mouse placenta. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e47986, 2012.

GAEMERS, Ingrid C.; GROEN, Albert K. New insights in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. **Current opinion in lipidology**, v. 17, n. 3, p. 268-273, 2006.

GARCÍA-COMPEÁN, Diego; JIMÉNEZ-RODRÍGUEZ, Alan Rafael. NAFLD VS MAFLD. The evidence-based debate has come. Time to change?. **Annals of Hepatology**, v. 27, n. 6, p. 100765, 2022.

GEURTSSEN, Madelon L. *et al.* Associations between intake of sugar-containing beverages in infancy with liver fat accumulation at school age. **Hepatology**, v. 73, n. 2, p. 560-570, 2021.

GLUCKMAN, Peter D. *et al.* Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. **New England journal of medicine**, v. 359, n. 1, p. 61-73, 2008.

GLUCKMAN, Peter D.; HANSON, Mark A.; SPENCER, Hamish G. Predictive adaptive responses and human evolution. **Trends in ecology & evolution**, v. 20, n. 10, p. 527-533, 2005.

GODFREY, Keith. The 'developmental origins' hypothesis: Epidemiology. 2006.

GAVRILOVA, Oksana *et al.* Liver peroxisome proliferator-activated receptor γ contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 36, p. 34268-34276, 2003.

GUÉNARD, Frédéric *et al.* Differential methylation in glucoregulatory genes of offspring born before vs. after maternal gastrointestinal bypass surgery. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 28, p. 11439-11444, 2013.

HALES, C. Nicholas; BARKER, David JP. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 35, p. 595-601, 1992.

HOFFMAN, Daniel J. *et al.* Developmental origins of metabolic diseases. **Physiological reviews**, v. 101, n. 3, p. 739-795, 2021.

HOGG, Kirsten *et al.* The in utero programming effect of increased maternal androgens and a direct fetal intervention on liver and metabolic function in adult sheep. **PLoS one**, v. 6, n. 9, p. e24877, 2011.

HOUGHTON, L. C. *et al.* Maternal weight gain in excess of pregnancy guidelines is related to daughters being overweight 40 years later. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 215, n. 2, p. 246. e1-246. e8, 2016.

IM, Yu Ri *et al.* A systematic review of animal models of NAFLD finds high-fat, high-fructose diets most closely resemble human NAFLD. **Hepatology**, v. 74, n. 4, p. 1884-1901, 2021.

INGVORSEN, Camilla *et al.* Effects of maternal high-fat/high sucrose diet on hepatic lipid metabolism in rat offspring. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 48, n. 1, p. 86-95, 2021.

JANG, Cholsoon *et al.* The small intestine converts dietary fructose into glucose and organic acids. **Cell metabolism**, v. 27, n. 2, p. 351-361. e3, 2018.

JAZWIEC, Patrycja A.; SLOBODA, Deborah M. Nutritional adversity, sex and reproduction: 30 years of DOHaD and what have we learned?. **Journal of Endocrinology**, v. 242, n. 1, p. T51-T68, 2019.

JENSEN-URSTAD, Anne PL; SEMENKOVICH, Clay F. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger?. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 5, p. 747-753, 2012.

KAVANAGH, Kylie *et al.* Dietary fructose induces endotoxemia and hepatic injury in calorically controlled primates. **The American journal of clinical nutrition**, v. 98, n. 2, p. 349-357, 2013.

KELISHADI, Roya *et al.* A randomized triple-masked controlled trial on the effects of synbiotics on inflammation markers in overweight children. **Jornal de Pediatria**, v. 90, n. 02, p. 161-167, 2014.

KLEINER, David E. *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313-1321, 2005.

KLEINER, David E.; MAKHLOUF, Hala R. Histology of NAFLD and NASH in adults and children. **Clinics in liver disease**, v. 20, n. 2, p. 293, 2015.

KIM, Maengkyu. Tissue Specific-Metabolism of Lipids for Ectopic Deposition. **The Korean Journal of Obesity**, v. 20, n. 3, p. 99-106, 2011.

KISLAL, Sezen; SHOOK, Lydia L.; EDLOW, Andrea G. Exposição perinatal à obesidade materna: Impacto cardiometabólico duradouro na prole. **Diagnóstico pré-natal**, v. 40, n. 9, p. 1109-1125, 2020.

KITSIOU-TZELI S., TZETIS M. Epigenética materna e crescimento fetal e neonatal. Curr. Opinião. Endocrinol. **Diabetes Obesos**. 2017; 24 (1):43–46.

KOBAYASHI, Akio; SUZUKI, Yusuke; SUGAI, Shoichiro. Specificity of transaminase activities in the prediction of drug-induced hepatotoxicity. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 45, n. 9, p. 515-537, 2020.

LAMBERTZ, Jessica *et al.* Fructose: a dietary sugar in crosstalk with microbiota contributing to the development and progression of non-alcoholic liver disease. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1159, 2017.

LAWLOR, Debbie A. *et al.* Epidemiologic evidence for the fetal overnutrition hypothesis: findings from the mater-university study of pregnancy and its outcomes. **American journal of epidemiology**, v. 165, n. 4, p. 418-424, 2007.

LÊ, Kim-Anne *et al.* Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. **The American journal of clinical nutrition**, v. 89, n. 6, p. 1760-1765, 2009.

LEE, Gwang-Hoon *et al.* Multiple time-dependent pathophysiological changes in a rabbit model of high-fat diet-induced hyperlipidemia. **FEBS Open bio**, v. 13, n. 6, p. 1027-1040, 2023.

LEE, Ho Jun; JANG, Yong Ju. Recent understandings of biology, prophylaxis and treatment strategies for hypertrophic scars and keloids. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 3, p. 711, 2018.

LEE, Samuel M. *et al.* Role of hepatic peroxisome proliferator-activated receptor γ in non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Endocrinology**, v. 257, n. 1, 2023.

LEE, Shin-Hae; PARK, Shi-Young; CHOI, Cheol Soo. Insulin resistance: from mechanisms to therapeutic strategies. **Diabetes & metabolism journal**, v. 46, n. 1, p. 15-37, 2022.

LEE, SoJung *et al.* Insulin resistance: link to the components of the metabolic syndrome and biomarkers of endothelial dysfunction in youth. **Diabetes Care**, v. 30, n. 8, p. 2091-2097, 2007.

LIRA, José Cláudio Garcia *et al.* Prevalência da Síndrome Metabólica em pessoas com Diabetes Mellitus tipo 2. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 70, p. 265-270, 2017.

LILLYCROP, Karen A.; BURDGE, Graham C. Environmental challenge, epigenetic plasticity and the induction of altered phenotypes in mammals. **Epigenomics**, v. 6, n. 6, p. 623-636, 2014.

LIU, Qing; BENGMARK, Stig; QU, Shen. The role of hepatic fat accumulation in pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Lipids in health and disease**, v. 9, p. 1-9, 2010.

LOMAS-SORIA, Consuelo *et al.* Maternal obesity has sex-dependent effects on insulin, glucose and lipid metabolism and the liver transcriptome in young adult rat offspring. **The Journal of physiology**, v. 596, n. 19, p. 4611-4628, 2018.

MACHADO, Mariana Verdelho; DIEHL, Anna Mae. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Gastroenterology**, v. 150, n. 8, p. 1769-1777, 2016.

MAIER, Timm; LEIBUNDGUT, Marc; BAN, Nenad. The crystal structure of a mammalian fatty acid synthase. **Science**, v. 321, n. 5894, p. 1315-1322, 2008.

MALIK, Vasanti S. *et al.* Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. **Circulation**, v. 121, n. 11, p. 1356-1364, 2010.

MARTÍNEZ, María Peinado; VERGARA, Isaac Dager; MOLANO, Karol Quintero; *et al.* Síndrome metabólico en adultos: Revisión narrativa de la literatura. **Archivos de medicina**, v. 17, n. 2, p. 4, 2021.

MASTROCOLA, Raffaella *et al.* High-fructose intake as risk factor for neurodegeneration: Key role for carboxy methyllysine accumulation in mice hippocampal neurons. **Neurobiology of Disease**, v. 89, p. 65-75, 2016.

MIZERA, Jozef *et al.* Perturbação da homeostase do glutamato no cérebro da prole de ratos induzida pela exposição pré-natal e pós-natal precoce à dieta materna rica em açúcar. **Nutrients**, v. 14, n. 11, p. 2184, 2022.

MOAYEDFARD, Zahra *et al.* The role of the immune system in the pathogenesis of NAFLD and potential therapeutic impacts of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. **Stem cell research & therapy**, v. 13, n. 1, p. 242, 2022.

MODI, Neena *et al.* The influence of maternal body mass index on infant adiposity and hepatic lipid content. **Pediatric research**, v. 70, n. 3, p. 287-291, 2011.

MOFFETT, John R. *et al.* Acetate revisited: A key biomolecule at the nexus of metabolism, epigenetics and oncogenesis—Part 1: Acetyl-CoA, acetogenesis and acyl-CoA short-chain synthetases. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 580167, 2020.

MUNIZ, Stephanie CRS *et al.* Dietary pattern changes, obesity and excess body fat in adults of a Brazilian birth cohort. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 36, n. 1, p. 191-202, 2023.

MUSCOGIURI, Giovanna *et al.* Obesity: a gender-view. **Journal of endocrinological investigation**, v. 47, n. 2, p. 299-306, 2024.

NEVZOROVA YA, Boyer-Diaz Z, Cubero FJ, Gracia-Sancho J: Animal models 477 for liver disease—a practical approach for translational research. *Journal of 478 hepatology* 2020;73:423-440

NG, Cheng Han; HUANG, Daniel Q.; NGUYEN, Mindie H. Nonalcoholic fatty liver disease versus metabolic-associated fatty liver disease: Prevalence, outcomes and implications of a change in name. **Clinical and Molecular Hepatology**, v. 28, n. 4, p. 790, 2022.

NIELSEN, Samara Joy; POPKIN, Barry M. Changes in beverage intake between 1977 and 2001. **American journal of preventive medicine**, v. 27, n. 3, p. 205-210, 2004.

NONAKA, Yudai *et al.* Effects of rapid or slow body weight reduction on glucose tolerance during equivalent weight loss in rats fed high-fat diet. **The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine**, v. 13, n. 3, p. 85-93, 2024.

NUGENT, Bridget M. *et al.* Placental H3K27me3 establishes female resilience to prenatal insults. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 2555, 2018.

OBEIDAT, Ahmad A. *et al.* Developmental Trends of Metabolic Syndrome in the Past Two Decades: A Review. 2024.

PAI, Rish K. *et al.* Reliability of histologic assessment for NAFLD and development of an expanded NAFLD activity score. **Hepatology**, v. 76, n. 4, p. 1150-1163, 2022.

PD, GLUCKMAN. The developmental origins of health and disease: an overview. **Developmental origins of health and disease**, p. 1-5, 2006.

PELEG-RAIBSTEIN, Daria *et al.* Enhanced sensitivity to drugs of abuse and palatable foods following maternal overnutrition. **Translational psychiatry**, v. 6, n. 10, p. e911-e911, 2016.

PETERSEN, Max C.; SHULMAN, Gerald I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiological reviews*, 2018.

PINTO, Bruno Araújo Serra *et al.* Early and sustained exposure to high-sucrose diet triggers hippocampal ER stress in young rats. **Metabolic brain disease**, v. 31, p. 917-927, 2016.

PINTO, Bruno Araújo Serra *et al.* Hippocampal Endoplasmic Reticulum Stress Hastens Motor and Cognitive Decline in Adult Male Rats Sustainedly Exposed to High-Sucrose Diet. **Antioxidants**, v. 11, n. 7, p. 1395, 2022.

PIERANTONELLI I, Svegliati-Baroni G. Nonalcoholic fatty liver disease: basic pathogenetic mechanisms in the progression from NAFLD to NASH. *Transplantation*. 2019;103(1):e1–13.

POLYZOS, Stergios A.; MANTZOROS, Christos S. Necessity for timely noninvasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*, v. 63, n. 2, p. 161-167, 2014.

RABADÁN-DIEHL, C.; NATHANIELSZ, P. From mice to men: research models of developmental programming. **Journal of developmental origins of health and disease**, v. 4, n. 1, p. 3-9, 2013.

RAGAB, Sohair MM *et al.* Effect of a high fat, high sucrose diet on the promotion of non-alcoholic fatty liver disease in male rats: the ameliorative role of three natural compounds. *Lipids in health and disease*, v. 14, p. 1-11, 2015.

RAVELLI, Gian-Paolo; STEIN, Zena A.; SUSSER, Mervyn W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **New England Journal of Medicine**, v. 295, n. 7, p. 349-353, 1976.

RIANT, Elodie *et al.* Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. **Endocrinology**, v. 150, n. 5, p. 2109-2117, 2009.

RINALDI, Luca *et al.* Mechanisms of non-alcoholic fatty liver disease in the metabolic syndrome. A narrative review. *Antioxidants*, v. 10, n. 2, p. 270, 2021.

RODRÍGUEZ, Lourdes *et al.* A frutose durante a gravidez afeta a sinalização materna e fetal da leptina. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, pág. 1709-1716, 2013.

ROMEIRO, Fernando Gomes; SANTOS, Livia Alves Amaral. Um Novo Modelo Animal Murino de Esteatohepatite Não-Alcoólica e Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 113, p. 903-904, 2019.

RUCHAT, Stephanie-May *et al.* Eficácia das intervenções com exercícios na prevenção do ganho excessivo de peso gestacional e retenção de peso pós-parto: uma revisão sistemática e meta-análise. **Revista britânica de medicina esportiva**, v. 21, pág. 1347-1356, 2018.

RUSSELL, James Baligh Walter *et al.* Prevalence and correlates of Metabolic Syndrome among adults in Freetown, Sierra Leone: A comparative analysis of NCEP ATP III, IDF and Harmonized ATP III criteria. **International Journal of Cardiology Cardiovascular Risk and Prevention**, v. 20, p. 200236, 2024.

SAKERS, Alexander *et al.* Adipose-tissue plasticity in health and disease. *Cell*, v. 185, n. 3, p. 419-446, 2022.

SANO, Hiroyuki *et al.* Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 17, p. 14599-14602, 2003.

SANTOS, Mery *et al.* Adult exercise effects on oxidative stress and reproductive programming in male offspring of obese rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 308, n. 3, p. R219-R225, 2015.

SEIB, Desiree R.; JUNG, Minseon M.; SOMA, Kiran K. Maternal high-sucrose consumption increases maternal and fetal glucocorticoids and decreases fetal androgens in the rat. **bioRxiv**, p. 2023.10. 31.565065, 2023.

SCHWARZ, Jean-Marc *et al.* Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. **The American journal of clinical nutrition**, v. 77, n. 1, p. 43-50, 2003.

SEKKARIE, Ahlia *et al.* Associations of maternal diet and nutritional status with offspring hepatic steatosis in the Avon longitudinal study of parents and children. **BMC nutrition**, v. 7, p. 1-11, 2021.

SIMENTAL-MENDÍA, Luis E.; RODRÍGUEZ-MORÁN, Martha; GUERRERO-ROMERO, Fernando. The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. **Metabolic syndrome and related disorders**, v. 6, n. 4, p. 299-304, 2008.

SMITH, Erin Vanessa LaRae *et al.* Maternal fructose intake causes developmental reprogramming of hepatic mitochondrial catalytic activity and lipid metabolism in weanling and young adult offspring. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 2, p. 999, 2022.

SMITH, Stuart; TSAI, Shiou-Chuan. The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. **Natural product reports**, v. 24, n. 5, p. 1041-1072, 2007.

SOFTIC, Samir; COHEN, David E.; KAHN, C. Ronald. Role of dietary fructose and hepatic de novo lipogenesis in fatty liver disease. **Digestive diseases and sciences**, v. 61, p. 1282-1293, 2016.

SONG, Ziyi; XIAOLI, Alus M.; YANG, Fajun. Regulation and metabolic significance of de novo lipogenesis in adipose tissues. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1383, 2018.

SRINIVASAN, Malathi *et al.* Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 291, n. 4, p. E792-E799, 2006.

TAIN, You-Lin; HSU, Chien-Ning. Dieta rica em gordura materna e hipertensão na prole. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8179, 2022.

TAHRI-JOUTEY, Mounia *et al.* Mechanisms mediating the regulation of peroxisomal fatty acid beta-oxidation by PPAR α . **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 16, p. 8969, 2021.

TAMAYEV, Liliya *et al.* Are there gender-specific differences in pregnancy outcome and placental abnormalities of pregnancies complicated with small for gestational age?. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 301, p. 1147-1151, 2020.

TANDRA, Sweta *et al.* Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of hepatology**, v. 55, n. 3, p. 654-659, 2011.

TAPPY, Luc; Lê, Kim A.; TRAN, Christel; PAQUOT, Nicolas. Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. **Nutrition**, [S.L.], v. 26, n. 11-12, p. 1044-1049, nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2010.02.014>.

TARRADE, Anne *et al.* Placental contribution to nutritional programming of health and diseases: epigenetics and sexual dimorphism. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 1, p. 50-58, 2015.

TER HORST, Kasper W.; SERLIE, Mireille J. Fructose consumption, lipogenesis, and non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 981, 2017.

TENG, Margaret LP *et al.* Global incidence and prevalence of nonalcoholic fatty liver disease. **Clinical and molecular hepatology**, v. 29, n. Suppl, p. S32, 2023.

THEEL, Willy *et al.* Evaluation of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in severe obesity using noninvasive tests and imaging techniques. **Obesity Reviews**, v. 23, n. 8, p. e13481, 2022.

THOMAS, Dylan D. *et al.* Hyperinsulinemia: an early indicator of metabolic dysfunction. **Journal of the Endocrine Society**, v. 3, n. 9, p. 1727-1747, 2019.

TILG, Herbert; MOSCHEN, Alexander R. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. **Molecular medicine**, v. 14, p. 222-231, 2008.

TOBI, Elmar W. *et al.* DNA methylation as a mediator of the association between prenatal adversity and risk factors for metabolic disease in adulthood. **Science advances**, v. 4, n. 1, p. eaao4364, 2018.

VOERMAN, Ellis *et al.* Maternal body mass index, gestational weight gain, and the risk of overweight and obesity across childhood: An individual participant data meta-analysis. **PLoS medicine**, v. 16, n. 2, p. e1002744, 2019.

WATERLAND, Robert A.; MICHELS, Karin B. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 27, n. 1, p. 363-388, 2007.

WU, Shusong *et al.* Tissue-specific mechanisms of fat metabolism that focus on insulin actions. **Journal of Advanced Research**, v. 53, p. 187-198, 2023.

YOUNOSSI, Zobair *et al.* Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 15, n. 1, p. 11-20, 2018.

YOUNOSSI, Zobair M. *et al.* Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology**, v. 64, n. 1, p. 73-84, 2016.

YU, Yongfu *et al.* Maternal diabetes during pregnancy and early onset of cardiovascular disease in offspring: population based cohort study with 40 years of follow-up. **Bmj**, v. 367, 2019.

YU, Zhangbin *et al.* Pre-pregnancy body mass index in relation to infant birth weight and offspring overweight/obesity: a systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61627, 2013.

YU, Siyu *et al.* The contribution of dietary fructose to non-alcoholic fatty liver disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 783393, 2021.

ZHANG, Xinrong; WONG, Grace Lai-Hung; WONG, Vincent Wai-Sun. Application of transient elastography in nonalcoholic fatty liver disease. **Clinical and molecular hepatology**, v. 26, n. 2, p. 128, 2020.

ZHANG, Jian *et al.* Effect of chronic western diets on non-alcoholic fatty liver of male mice modifying the PPAR- γ pathway via miR-27b-5p regulation. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 4, p. 1822, 2021.

ANEXO A



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CIAEP: 02.0341.2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO



CERTIFICADO (20/2023)

Certificamos que a proposta intitulada: **"Caracterização dos mecanismos neuroendócrinos e metabólicos envolvidos na patogênese da esteatose hepática na prole de ratas expostas ao consumo perigestacional de uma dieta rica em açúcar"** Processo 23115.002915/2023-62, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 14 de abril de 2023.

We certify that the proposal: **"Characterization of the neuroendocrine and metabolic mechanisms involved in the pathogenesis of hepatic steatosis in the offspring of rats exposed to perigestational consumption of a high-sugar diet"**, Process 23115.002915/2023-62, under the responsibility of **Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of April 14, 2023.

PROPOSTA

Finalidade: Pesquisa **Área:** Ciências da Saúde
Vigência: 13/07/2023 a 07/07/2025

ANIMAIS

Origem: Biotério Central da UFMA
Espécie: *Rattus norvegicus* var. Wistar **Sexo:** Ambos sexos **Idade:** 30 dias **Peso:** 40-50g

AMOSTRA

A receber: 21 casais;
Total a ser utilizado:
168 animais da prole
(84 por sexo)

Local do experimento: Biotério Setorial da Pós-Graduação CCBS

São Luís, 13 de julho de 2023

Bruno Araújo Serra Pinto
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

ANEXO B



pharmaceuticals



Article

Analysis of the Effect of the TRPC4/TRPC5 Blocker, ML204, in Sucrose-Induced Metabolic Imbalance

Mizael C. Araújo ¹, Suzany H. S. Soczek ^{2,3}, Jaqueline P. Pontes ⁴, Bruno A. S. Pinto ⁵, Lucas M. França ⁴, Bruna da Silva Soley ⁶, Gabriela S. Santos ¹, Warlison F. de Silva Saminez ¹, Fernanda K. M. Fernandes ¹, João L. do Carmo Lima ⁴, Daniele Maria-Ferreira ^{2,3}, João F. S. Rodrigues ¹, Nara L. M. Quintão ⁷, Valério Monteiro-Neto ⁴, Antônio M. A. Paes ⁴ and Elizabeth S. Fernandes ^{2,3,*}

- ¹ Programa de Pós-Graduação, Universidade CEUMA, São Luis 65075-120, MA, Brazil; mizaelcalaciao@outlook.com (M.C.A.); gabysantos9@gmail.com (G.S.S.); w.felipe.loading@gmail.com (W.F.d.S.S.); fernandafernande50@hotmail.com (F.K.M.F.); joaofrancisco@hotmail.com (J.F.S.R.)
- ² Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade Pequeno Príncipe, Curitiba 80230-020, PR, Brazil; suzanyhellen@gmail.com (S.H.S.S.); danielle.ferreira@pequeno Principe.org.br (D.M.-F.)
- ³ Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Curitiba 80250-060, PR, Brazil
- ⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luis 65085-080, MA, Brazil; jaquelinepessoasp@gmail.com (J.P.F.); lucas.mf@ufma.br (L.M.F.); lima98@uol.com.br (J.L.d.C.L.); valerio.monteiro@ufma.br (V.M.-N.); antonio.marcas@ufma.br (A.M.A.P.)
- ⁵ Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Maranhão, São Luis 65085-080, MA, Brazil; bruno.pinto@ufma.br
- ⁶ Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 81531-980, PR, Brazil; brunasoley@gmail.com
- ⁷ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí 88302-901, SC, Brazil; nara.quintao@univali.br
- * Correspondence: elizabeth.fernandes@pequeno Principe.org.br



Citation: Araújo, M.C.; Soczek, S.H.S.; Pontes, J.P.; Pinto, B.A.S.; França, L.M.; Soley, B.d.S.; Santos, G.S.; Saminez, W.F.d.S.; Fernandes, F.K.M.; Lima, J.L.d.C.; et al. Analysis of the Effect of the TRPC4/TRPC5 Blocker, ML204, in Sucrose-Induced Metabolic Imbalance. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 1100. <https://doi.org/10.3390/ph16081100>

Academic Editor: Dana Cucu

Received: 5 July 2023

Revised: 26 July 2023

Accepted: 31 July 2023

Published: 3 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Sugar-induced metabolic imbalances are a major health problem since an excessive consumption of saccharides has been linked to greater obesity rates at a global level. Sucrose, a disaccharide composed of 50% glucose and 50% fructose, is commonly used in the food industry and found in a range of fast, restaurant, and processed foods. Herein, we investigated the effects of a TRPC4/TRPC5 blocker, ML204, in the metabolic imbalances triggered by early exposure to sucrose-enriched diet in mice. TRPC4 and TRPC5 belong to the family of non-selective Ca^{2+} channels known as transient receptor potential channels. High-sucrose (HS)-fed animals with hyperglycaemia and dyslipidaemia, were accompanied by increased body mass index, mesenteric adipose tissue accumulation with larger diameter cells and hepatic steatosis in comparison to those fed normal diet. HS mice also exhibited enhanced adipose, liver, and pancreas TNF α and VEGF levels. ML204 exacerbated hyperglycaemia, dyslipidaemia, fat tissue deposition, hepatic steatosis, and adipose tissue and liver TNF α in HS-fed mice. Normal mice treated with the blocker had greater hepatic steatosis and adipose tissue cell numbers/diameter than those receiving vehicle, but showed no significant changes in tissue inflammation, glucose, and lipid levels. The results indicate that TRPC4/TRPC5 protect against the metabolic imbalances caused by HS ingestion.

Keywords: high sucrose intake; metabolic changes; fat deposition; hepatic steatosis; TRPC4 and TRPC5 channels

1. Introduction

The intake of high-content sugar foods and beverages from an early age has been linked to an increased risk of obesity, type II diabetes, and cardiovascular diseases, amongst

ANEXO C



Review

An Overview of the TRP-Oxidative Stress Axis in Metabolic Syndrome: Insights for Novel Therapeutic Approaches

Mizael C. Araújo ¹, Suzany H. S. Soczek ^{2,3}, Jaqueline P. Pontes ⁴, Leonardo A. C. Marques ⁵, Gabriela S. Santos ¹, Gisele Simão ^{2,3}, Laryssa R. Bueno ^{2,3}, Daniele Maria-Ferreira ^{2,3}, Marcelo N. Muscará ⁵ and Elizabeth S. Fernandes ^{2,3,*}

¹ Programa de Pós-Graduação, Universidade CEUMA, São Luís 65075-120, MA, Brazil; mizaelcalaciao@outlook.com (M.C.A.); gabyusantos9@gmail.com (G.S.S.)

² Instituto de Pesquisa Pele Pequeno Príncipe, Curitiba 80250-060, PR, Brazil; suzanyhellen@gmail.com (S.H.S.S.); gisele_si@hotmail.com (G.S.); laryssaragis@hotmail.com (L.R.B.); daniele.ferreira@pelepequeno.org.br (D.M.F.)

³ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade Pequeno Príncipe, Curitiba 80230-020, PR, Brazil

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís 65085-080, MA, Brazil; jaquelinepessoas@gmail.com

⁵ Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo 05508-000, SP, Brazil; leomarques996@gmail.com (L.A.C.M.); muscara@usp.br (M.N.M.)

* Correspondence: elizabeth.fernandes@pelepequeno.org.br



Citation: Araújo, M.C.; Soczek, S.H.S.; Pontes, J.P.; Marques, L.A.C.; Santos, G.S.; Simão, G.; Bueno, L.R.; Maria-Ferreira, D.; Muscará, M.N.; Fernandes, E.S. An Overview of the TRP-Oxidative Stress Axis in Metabolic Syndrome: Insights for Novel Therapeutic Approaches. *Cells* **2022**, *11*, 1292. <https://doi.org/10.3390/cells11081292>

Academic Editors: Lin-Hua Jiang, Xiaojing Yao, Bilal Çiğ and Alexander E. Kalyuzhny

Received: 31 January 2022

Accepted: 5 April 2022

Published: 11 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Metabolic syndrome (MS) is a complex pathology characterized by visceral adiposity, insulin resistance, arterial hypertension, and dyslipidaemia. It has become a global epidemic associated with increased consumption of high-calorie, low-fibre food and sedentary habits. Some of its underlying mechanisms have been identified, with hypoadiponectinemia, inflammation and oxidative stress as important factors for MS establishment and progression. Alterations in adipokine levels may favour glucotoxicity and lipotoxicity which, in turn, contribute to inflammation and cellular stress responses within the adipose, pancreatic and liver tissues, in addition to hepatic steatosis. The multiple mechanisms of MS make its clinical management difficult, involving both non-pharmacological and pharmacological interventions. Transient receptor potential (TRP) channels are non-selective calcium channels involved in a plethora of physiological events, including energy balance, inflammation and oxidative stress. Evidence from animal models of disease has contributed to identify their specific contributions to MS and may help to tailor clinical trials for the disease. In this context, the oxidative stress sensors TRPV1, TRPA1 and TRPC5, play major roles in regulating inflammatory responses, thermogenesis and energy expenditure. Here, the interplay between these TRP channels and oxidative stress in MS is discussed in the light of novel therapies to treat this syndrome.

Keywords: TRP channels; metabolic syndrome; energy metabolism; hypoadiponectinemia; reactive oxygen species; inflammation

1. Introduction

Metabolic syndrome (MS) is a complex pathology characterized by visceral adiposity, insulin resistance, arterial hypertension, and dyslipidaemia [1]. MS presents significant morbidity and mortality as it strongly increases the risk of developing different diseases, such as those affecting the cardiovascular system and type 2 diabetes (T2D) [2]. Its management is primarily aimed at reducing the risk for cardiovascular diseases (CVDs) and T2D, and includes lifestyle modifications and multiple drugs [3,4].

Abdominal obesity, insulin resistance and sedentary life-styles are major risk factors for MS [1]. These increase with ageing, by taking medicines which increase weight gain, by mitochondrial and endocrine dysfunctions, and genetic predisposition [3]. Although not

ANEXO D

PLOS ONE

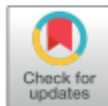
RESEARCH ARTICLE

Cuminaldehyde potentiates the antimicrobial actions of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

Valério Monteiro-Neto^{1,2}, Cláudio D. de Souza¹, Laiane F. Gonzaga¹, Bruna C. da Silveira^{3,4}, Nálgia C. F. Sousa¹, Jaqueline P. Pontes¹, Deivid M. Santos¹, Wanessa C. Martins¹, Jorge F. V. Pessoa¹, Alexsander R. Carvalho Júnior⁵, Viviane S. S. Almeida², Natália M. T. de Oliveira^{3,4}, Thayla S. de Araújo¹, Daniele Maria-Ferreira^{3,4}, Saulo J. F. Mendes¹, Thiago A. F. Ferro^{1*}, Elizabeth S. Fernandes^{1,3,4*}

1 Programa de Pós-graduação, Universidade Ceuma, São Luís, MA, Brazil, **2** Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brazil, **3** Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Curitiba, PR, Brazil, **4** Faculdades Pequeno Príncipe, Curitiba, PR, Brazil, **5** Department of Parasitology, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

* elizabeth.fernandes@pelepequenoprincipe.org.br (ESF); thafaitosaf@hotmail.com (TAF)



OPEN ACCESS

Citation: Monteiro-Neto V, de Souza CD, Gonzaga LF, da Silveira BC, Sousa NCF, Pontes JP, et al. (2020) Cuminaldehyde potentiates the antimicrobial actions of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. PLoS ONE 15(5): e0232987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232987>

Editor: Abdelwahab Omri, Laurentian, CANADA

Received: April 11, 2020

Accepted: April 24, 2020

Published: May 14, 2020

Copyright: © 2020 Monteiro-Neto et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; grant number 3325/2013; finance code 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant numbers 309046/2016-5 and 305676/2019-9), Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do

Abstract

Escherichia coli and *Staphylococcus aureus* are important agents of urinary tract infections that can often evolve to severe infections. The rise of antibiotic-resistant strains has driven the search for novel therapies to replace the use or act as adjuvants of antibiotics. In this context, plant-derived compounds have been widely investigated. Cuminaldehyde is suggested as the major antimicrobial compound of the cuminal seed essential oil. However, this effect is not fully understood. Herein, we investigated the *in silico* and *in vitro* activities of cuminaldehyde, as well as its ability to potentiate ciprofloxacin effects against *S. aureus* and *E. coli*. *In silico* analyses were performed by using different computational tools. The PASS online and SwissADME programmes were used for the prediction of biological activities and oral bioavailability of cuminaldehyde. For analysis of the possible toxic effects and the theoretical pharmacokinetic parameters of the compound, the Osiris, SwissADME and PROTOX programmes were used. Estimations of cuminaldehyde gastrointestinal absorption, blood brain barrier permeability and skin permeation by using SwissADME; and drug likeness and score by using Osiris, were also evaluated. The *in vitro* antimicrobial effects of cuminaldehyde were determined by using microdilution, biofilm formation and time-kill assays. *In silico* analysis indicated that cuminaldehyde may act as an antimicrobial and as a membrane permeability enhancer. It was suggested to be highly absorbable by the gastrointestinal tract and likely to cross the blood brain barrier. Also, irritative and harmful effects were predicted for cuminaldehyde if swallowed at its LD50. Good oral bioavailability and drug score were also found for this compound. Cuminaldehyde presented antimicrobial and anti-biofilm effects against *S. aureus* and *E. coli*. When co-incubated with ciprofloxacin, it enhanced the antibiotic antimicrobial and anti-biofilm actions. We suggest that cuminaldehyde may be useful as an adjuvant therapy to ciprofloxacin in *S. aureus* and *E. coli*-induced infections.

ANEXO E



pharmaceuticals



Article

Monitoring of Peripheral Blood Leukocytes and Plasma Samples: A Pilot Study to Examine Treatment Response to Leflunomide in Rheumatoid Arthritis

João F. S. Rodrigues ¹, Liziane C. M. da Silva ^{2,3}, Leila Cardoso-Sousa ⁴, Douglas Carvalho Caixeta ⁴, Debora D. Lückemeyer ⁴, Alisson S. Henriques ⁴, Jaqueline P. Pontes ⁷, Lycia M. G. da Silva ⁸, Juliana S. S. Macedo ⁸, Pedro S. Carvalho Júnior ⁸, Cristiane Silva e Silva ¹, Máhila M. R. S. Martins ⁹, Valério Monteiro-Neto ⁷, Marcus A. G. Grisotto ¹⁰, Anita M. R. Fernandes ⁴, Juliano Ferreira ⁸, João B. Calisto ¹¹, Robinson Sabino-Silva ⁴ and Elizabeth S. Fernandes ^{2,3,*}

- ¹ Programa de Pós-Graduação, Universidade CIEUMA, São Luís 65075-120, Brazil; joaofrancisco@outlook.com (J.F.S.R.); cristiane.figueiredo@outlook.com (C.S.e.S.)
- ² Instituto de Pesquisa Pós-Graduação-Príncipe, Curitiba 80250-060, Brazil; lizianecm@gmail.com
- ³ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade Pequeno Príncipe, Curitiba 80230-020, Brazil
- ⁴ Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia 38400-902, Brazil; leilacardoso@ufu.br (L.C.-S.); caixetadoc@ufu.br (D.C.C.); robinsonsabino@ufu.br (R.S.-S.)
- ⁵ Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brazil; debora_d@ufsc.br (D.D.L.); juliano.ferreira@ufsc.br (J.F.)
- ⁶ Mestrado em Computação Aplicada, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, São José 88102-700, Brazil; all.moffens@gmail.com (A.S.H.); anita.fernandes@univali.br (A.M.R.F.)
- ⁷ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís 65080-805, Brazil; jacquelinepessap@gmail.com (J.P.P.); valerio.monteiro@ufma.br (V.M.-N.)
- ⁸ Farmácia Estadual de Medicamentos Especializados, Secretaria Estadual de Saúde do Maranhão, São Luís 65030-450, Brazil; lycia_guimaraes@ufma.br (L.M.G.d.S.); juliana_sando@ufma.br (J.S.S.M.); pedrosantos@yahoo.com.br (P.S.C.)
- ⁹ Centro de Especialidades Médicas, São Luís 65075-180, Brazil; maramahila@ufma.br
- ¹⁰ Spediali Civili di Brescia, DSCS-c/o U.O. Reumatologia e Immunologia Clinica, Brescia, 25122 Lombardia, Italy; marcos.grisotto@gmail.com
- ¹¹ Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos-CIEUP, Florianópolis 88056-000, Brazil; joao.calisto@cieup.org.br
- ¹² Correspondence: elizabeth.fernandes@pós-graduação-príncipe.org.br; Tel.: +55-41-33101025



Citation: Rodrigues, J.F.S.; da Silva, L.C.M.; Cardoso-Sousa, L.; Caixeta, D.C.; Lückemeyer, D.D.; Henriques, A.S.; Pontes, J.P.; da Silva, L.M.G.; Macedo, J.S.S.; Carvalho Júnior, P.S.; et al. Monitoring of Peripheral Blood Leukocytes and Plasma Samples: A Pilot Study to Examine Treatment Response to Leflunomide in Rheumatoid Arthritis. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 106. <https://doi.org/10.3390/ph14030106>

Academic Editor: Felix Carvalho
Received: 3 December 2020
Accepted: 22 January 2021
Published: 29 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Rheumatoid arthritis (RA) is a painful inflammatory disease of the joints which affects a considerable proportion of the world population, mostly women. If not adequately treated, RA patients can become permanently disabled. Importantly, not all the patients respond to the available anti-rheumatic therapies, which also present diverse side effects. In this context, monitoring of treatment response is pivotal to avoid unnecessary side effects and costs towards an ineffective therapy. Hence, we performed a pilot study to investigate the potential use of flow cytometry and attenuated total reflection-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy as measures to identify responders and non-responders to leflunomide, a disease-modifying drug used in the treatment of RA patients. The evaluation of peripheral blood CD62L⁺ polymorphonuclear cell numbers and ATR-FTIR vibrational modes in plasma were able to discriminate responders to leflunomide (LFN) three-months after therapy has started. Overall, the results indicate that both flow cytometry and ATR-FTIR can potentially be employed as additional measures to monitor early treatment response to LFN in RA patients.

Keywords: rheumatoid arthritis; treatment response; leflunomide; peripheral blood cells; ATR-FTIR

1. Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a painful inflammatory disease of the joints which affects ~0.5–1% of the world population, mostly women. If not treated, RA patients can become

ANEXO F



ANEXO G



Certificamos que,
JAQUELINE PESSOA PONTES

Participou do 55º Congresso Anual da SBFIS | Encontro Luso Brasileiro de Fisiologia | Symposium Miguel Covian | Latin American DOHaD Chapter, realizado no formato OnLine no período de 05 a 10 de outubro de 2020, na qualidade de Participante, com carga horária de 40 horas.

Ribeirão Preto/SP, 08/10/2020.

Para verificar a autenticidade deste certificado acesse <https://validacertificados.iveventos.com.br> e use o código: 32e9f93324


Eduardo Colombari
 Presidente da SBFIS


Gustavo R. Pedrino
 Tesoureiro da SBFIS


Armenio Aguiar dos Santos
 Secretário da SBFIS



ANEXO H



XXXVIII REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL (FESBE)
 XXII REUNIÃO ANUAL DA BRAZILIAN RESEARCH ASSOCIATION FOR VISION AND OPHTHALMOLOGY (BRAVO)
 XVIII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO (SBCAL)
 XV CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOCIÊNCIAS NUCLEARES (SBBN)
 III CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS ORIGENS DESENVOLVIMENTISTAS DA SAÚDE E DA DOENÇA (DOHAD BRASIL)
 II CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOACÚSTICA (SBBA)

CERTIFICADO

O trabalho intitulado **"PERIGESTATIONAL HIGH-SUCROSE INTAKE LEADS TO EARLY NAFLD ONSET IN THE OFFSPRING OF WISTAR RATS"** de autoria de **Jaqueline Pessoa, Camila de Fátima Carvalho, Bruno Eduardo Lopes de, Rômulo Brênno Lopes, THAMYS MARINHO e Antônio Marcus de Andrade** foi aprovado na XXXVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), realizada de 2 a 5 de julho de 2024, na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na cidade de Campinas/SP.



Prof. Dr. Eduardo Colombari
Presidente da FeSBE

REALIZAÇÃO



COMUNICAÇÃO



ORGANIZAÇÃO LOCAL



ORGANIZAÇÃO



FOMENTO




PATROCÍNIO DIAMANTE




PATROCÍNIO PRATA

