

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Mestrado

**IMPACTO DA EXPOSIÇÃO PERIGESTACIONAL A UMA
DIETA RICA EM SACAROSE SOBRE O
DESENVOLVIMENTO PRECOCE DE DISFUNÇÕES
METABÓLICAS NA PROLE DE RATAS WISTAR**

IVANA LETÍCIA SANTOS SOUZA

São Luís – MA
2022

IVANA LETÍCIA SANTOS SOUZA

**IMPACTO DA EXPOSIÇÃO PERIGESTACIONAL A UMA
DIETA RICA EM SACAROSE SOBRE O
DESENVOLVIMENTO PRECOCE DE DISFUNÇÕES
METABÓLICAS NA PROLE DE RATAS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes

São Luís - MA

2022

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

Souza, Ivana Letícia Santos.

Impacto da exposição perigestacional a uma dieta rica em sacarose sobre o desenvolvimento precoce de disfunções metabólicas na prole de ratas Wistar / Ivana Letícia Santos Souza. - 2022.

65 f.

Orientador(a): Antonio Marcus de Andrade Paes.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, 2022.

1. Dieta materna rica em sacarose. 2. DOHaD. 3. Programação metabólica. 4. Síndrome metabólica. I. Paes, Antonio Marcus de Andrade. II. Título.

IVANA LETÍCIA SANTOS SOUZA

**IMPACTO DA EXPOSIÇÃO PERIGESTACIONAL A UMA
DIETA RICA EM SACAROSE SOBRE O
DESENVOLVIMENTO PRECOCE DE DISFUNÇÕES
METABÓLICAS NA PROLE DE RATAS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Renato Simões Gaspar
Universidade de São Paulo (USP)

Profa. Dra. Joelma Ximenes Prado Teixeira Nascimento
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof. Dr. Lucas Martins França
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Dedico este trabalho ao meu pai (in memoriam), Ivanil Evagelista Souza, por todo o amor, confiança e incentivo ao estudo e à ciência exalado a mim durante a sua estadia aqui na Terra. Bem como a minha mãe, Antonilde Monteiro Santos, a maior apoiadora dos meus projetos e o ser humano que me deu a vida (e que daria sua própria vida por mim, se preciso).

AGRADECIMENTOS

A minha família, por me ensinarem o sentido do amor ao próximo, partilha e felicidade. Sobretudo, um agradecimento mais que especial a minha mãe, Antonilde Monteiro Santos Souza, por ser exemplo de mulher perseverante e de garra, meu espelho de vida. Ao meu pai, Ivanil Evagelista Souza, homem mais íntegro e de coração puro que conheci na minha vida, que me ensinou sobre tudo e que carrego cada experiência de vida comigo, e que sem o amor deles dois eu não seria o que sou hoje. A minha irmã, Jessica Raiane Santos Souza, pela cumplicidade desde o ventre de nossa mãe. Vocês são meu alicerce de vida, meu porto seguro e incentivo diário. Sempre acreditam em mim, até mesmo quando eu mesma não o fazia. Amo vocês mais que tudo!

A Rafael Sousa dos Anjos, meu amado companheiro e namorado, que está comigo durante toda essa caminhada e que nos dias mais sombrios sempre esteve ao meu lado com o aconchego certo e com palavras acolhedoras. Obrigada pelos momentos únicos de confiança e força, pelo apoio incondicional em todos os projetos de vida, por ser meu porto seguro e fortaleza. Por sempre incitar o melhor de mim e me mostrar e ajudar a desenvolver a minha melhor versão todos os dias. Te amo muito muito!!

Agradecimentos especiais ao meu orientador, Antonio Marcus de Andrade Paes, que desde a minha graduação teve contribuição fundamental na minha formação profissional e científica. Sou apaixonada pelo seu amor à docência e o fazer científico, e sem o seu apoio essa dissertação não aconteceria.

Agradecimentos aos meus amigos de turma do Mestrado e a minha família científica, o Laboratório de Fisiologia Experimental (LeFisio), os quais me acolheram de braços abertos e me ajudam no que for preciso. Tenho um carinho enorme por cada um de vocês!

Também agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão (PPGCS-UFMA) pela oportunidade dada para a realização Mestrado. Além disso, agradecimentos mais que importantes ao apoio financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) para realização dos experimentos.

RESUMO

A prevalência de doenças metabólicas em crianças e adolescentes está aumentando de maneira rápida e significativa, sendo apontado pela Organização Mundial de Saúde como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. O crescimento expressivo destas patologias está relacionado, principalmente, às mudanças ocorridas no comportamento da sociedade em geral, que passou a consumir dietas com elevado teor de açúcares de adição (sacarose) e alimentos ultraprocessados, além do aumento do sedentarismo. Nessa conjuntura, o conceito DOHaD tem como propósito elucidar como mudanças pontuais ocorridas precocemente em organismos em desenvolvimento podem resultar em alterações metabólicas tardias e um risco aumentado de doenças crônicas na vida adulta. Levando esses aspectos em consideração, o objetivo deste trabalho é investigar o impacto da exposição excessiva a açúcares de adição durante as fases pré-gestacional, de gestação e de lactação sobre a instalação e progressão precoce da síndrome metabólica na prole. Para tanto, ratas Wistar adultas (n = 15), com aproximadamente 75-90 dias de vida, foram divididas em dois grupos: as que foram expostas ao estresse nutricional (n = 7) e as que não foram expostas (n = 8). Esse estresse nutricional se deu através de uma dieta contendo 25% de sacarose (DRS), em comparação a uma dieta controle, que continha 10% de sacarose (CTR). Após o período de indução de 7 semanas, as ratas foram acasaladas com ratos da mesma idade (n = 15), com confirmação da prenhez a partir do esfregaço vaginal matinal. As ratas continuaram com suas respectivas dietas (CTR ou DRS) durante toda a gestação e lactação. Ao nascimento dos filhotes, a ninhada foi ajustada para 8 filhotes por rata, devido ao aporte de aleitamento materno. Aos 21 dias de vida, os filhotes foram desmamados e separados das mães e divididos em dois grupos experimentais: o grupo CTR (prole de machos e fêmeas das mães alimentadas com ração CTR durante a gestação e lactação) e o grupo DRS (prole de machos e fêmeas das mães alimentadas com ração DRS durante a gestação e lactação). Todas as proles foram alimentadas com dieta CTR *ad libitum* desde o desmame e foram igualmente acompanhados até os 30 dias de vida, quando ocorreu a eutanásia. Foi realizado o cálculo do Índice de Lee e teste de tolerância à glicose, além da coleta de sangue para as análises bioquímicas e órgãos-chave para a morfometria e histologia. A partir desses procedimentos, pode-se afirmar que os principais resultados obtidos foram o prejuízo significativo na homeostase glicolipídica das proles DRS, através da intolerância à glicose, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e aumento significativo do TyG, que indica o início do desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 e consequente instauração da síndrome metabólica tão logo durante a infância tardia desses animais. Além disso, houve aumento significativo da esteatose, inflamação e ballooning no fígado dos animais experimentais, o que culmina na esteato-hepatite, estágio antecessor do câncer hepatocelular. Por fim, conclui-se que o período da gestação e lactação são uma janela metabólica suscetível aos estresses nutricionais e à reprogramação metabólica dos descendentes, e que essa reprogramação ocorre de forma diferente entre os sexos.

Palavras-chave: DOHaD; Programação metabólica; Síndrome metabólica; Dieta materna rica em sacarose.

ABSTRACT

The prevalence of metabolic diseases in children and adolescents is increasing rapidly and significantly, being pointed out by the World Health Organization as one of the biggest public health problems in the world. The expressive growth of these pathologies is mainly related to changes in the behavior of society in general, which started to consume diets with a high content of added sugars (sucrose) and ultra-processed foods, in addition to the increase in sedentary lifestyle. In this context, the DOHaD concept aims to elucidate how punctual changes that occur early in developing organisms can result in late metabolic alterations and an increased risk of chronic diseases in adult life. Taking these aspects into account, the aim of this study is to investigate the impact of excessive exposure to added sugars during pregnancy and lactation on the onset and early progression of metabolic syndrome in offspring. For this purpose, adult Wistar female rats (n = 15), with approximately 75-90 days of life, were divided into two groups: those exposed to nutritional stress (n = 7) and those that were not exposed (n = 8). This nutritional stress was through a diet containing 25% sucrose (DRS) compared to a control diet, which contained 10% sucrose (CTR). After the 7-week induction period the rats were mated with age-matched rats (n=15) and pregnancy confirmed from the morning vaginal smear. The rats continued with their respective diets (CTR or DRS) throughout pregnancy and lactation. At the birth of the pups, the offspring was adjusted to 8 pups per rat, due to the mother's breastfeeding contribution. At 21 days of age, the pups were weaned and separated from their mothers and divided into two experimental groups: the CTR group (offspring of males and females of the mothers fed with CTR diet during pregnancy and lactation) and the DRS group (offspring of males and females of the mothers fed with DRS diet during pregnancy and lactation). All offspring animals were fed with a CTR diet *ad libitum* from weaning and were equally followed up to 30 days of life, when euthanasia occurred. The calculation of the Lee Index and glucose tolerance test were performed, in addition to blood collection for biochemical analysis and key-organs for morphometry and histology. From these procedures, it can be stated that the main result obtained was the significant impairment in the DRS offspring's glycolipid homeostasis, through glucose intolerance, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia and the significant increase in TyG, which indicates the beginning of the development of type 2 diabetes mellitus and the consequent establishment of the metabolic syndrome as early as during the late childhood of these animals. In addition, there was the significant increase in steatosis, inflation and ballooning in the liver of experimental animals, which culminated in steatohepatitis, the predecessor stage of hepatocellular cancer. Finally, it is concluded that the period of pregnancy and lactation are a metabolic window susceptible to nutritional stresses and metabolic reprogramming of offspring, and that this reprogramming occurs differently between sex.

Key-words: DOHaD; Metabolic programming; Metabolic syndrome; Maternal high-sugar diet.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCBS	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
CTR	Controle
DCNT	Doença crônicas não-transmissíveis
DHGNA	Doença hepática gordurosa não-alcoólica
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DOHaD	Origens Desenvolvimentistas da Saúde e Doença
DRS	Dieta rica em sacarose
GLUT-4	Transportador de glicose 4
GTT	Teste de tolerância à glicose
IDF	International Diabetes Federation
IL	Índice de Lee
OMS	Organização Mundial de Saúde
PPGCS	Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotação por minuto
SM	Síndrome metabólica
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Metabolização da frutose e glicose no organismo. Fonte: ELLIOTT et al (2002).....20
- Figura 2.** Relação entre o consumo de frutose no início da vida e o processo de programação metabólica fetal. Os elevados consumos de frutose aumentam a vulnerabilidade aos fenótipos relacionados à síndrome metabólica na vida adulta. Fonte: LEE et al. (2018).....21
- Figura 3.** Insultos causados durante a gestação e lactação, suas consequências teciduais e na vida adulta. Fonte: RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al. (2018).....25
- Figura 4.** Índice de prolificidade das ratas mães CTR e DRS de acordo com o tamanho de sua ninhada no parimento. Os valores foram expressos com média $\pm$ e.p.m., sendo 6 fêmeas CTR e 7 fêmeas DRS. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. $*p<0,05$ quando comparado ao grupo controle.....33
- Figura 5. Peso e comprimento nasoanal ao nascer das proles CTR e DRS, machos e fêmeas.** Os valores foram expressos com média $\pm$ e.p.m., sendo 33 e 23 machos nos grupos CTR e DRS, respectivamente, e 13 e 17 fêmeas nos grupos CTR e DRS, respectivamente. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. $*p<0,05$ quando comparado ao grupo controle. $**p<0,01$ quando comparado ao grupo controle. $***p<0,0001$ quando comparado ao grupo controle...34
- Figura 6. Peso e comprimento nasoanal aos 30 dias de vida das proles CTR e DRS, machos e fêmeas.** Os valores foram expressos com média $\pm$ e.p.m., sendo 13 e 9 machos nos grupos CTR e DRS, respectivamente, e 10 e 13 fêmeas nos grupos CTR e DRS, respectivamente. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. $*p<0,05$ quando comparado ao grupo controle.....35

Figura 7. Índice de Lee ao nascer e aos 30 dias de vida das proles CTR e DRS, machos e fêmeas. Os valores foram expressos com média $\pm$ e.p.m., sendo 13 e 9 machos nos grupos CTR e DRS, respectivamente, e 10 e 13 fêmeas nos grupos CTR e DRS, respectivamente. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.....35

Figura 8. Parâmetros morfométricos dos tecidos adiposos das proles aos 30 dias. (A): gordura epididimal; (B): gordura periovariana; (C): gordura periuterina; (D): gordura retroperitoneal; (E): gordura mesentérica; (F): tecido adiposo marrom. Os valores foram expressos em g/100g de peso corporal, com média $\pm$ e.p.m., sendo 13 e 9 machos dos grupos CTR e DRS, respectivamente, e 10 e 13 fêmeas nos grupos CTR e DRS, respectivamente. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.....36

Figura 9. Parâmetros morfométricos de órgãos e tecidos das proles aos 30 dias. (A): fígado; (B): pâncreas; (C): gônadas - testículos e ovários; (D): músculo gastrocnêmio; (E): músculo sóleo. Os valores foram expressos em g/100g de peso corporal, com média $\pm$ e.p.m., sendo 13 e 9 machos dos grupos CTR e DRS, respectivamente, e 10 e 13 fêmeas nos grupos CTR e DRS, respectivamente. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.....37

Figura 10. Parâmetros bioquímicos das proles aos 30 dias. (A): glicose em jejum; (B): triglicerídeos total; (C): colesterol total; (D): TyG. Os valores foram expressos com média $\pm$ e.p.m., sendo 13 e 9 machos dos grupos CTR e DRS, respectivamente, e 10 e 13 fêmeas nos grupos CTR e DRS, respectivamente. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle.....39

Figura 11. Teste de tolerância à glicose aos 30 dias de vida das proles CTR e DRS, fêmeas e machos, após jejum de 8h. Os valores foram expressos com média $\pm$ e.p.m., sendo 10 animais no grupo CTR e 9 animais no grupo DRS na prole de machos, e 10 e 12 animais nos grupos CTR e DRS, respectivamente, na prole de fêmeas. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle. *** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle.....41

Figura 12. Imagens representativas das lâminas histológicas do fígado no aumento de 40x das proles aos 30 dias. As setas em amarelo indicam o ballooning hepatocelular e as setas em preto indicam os focos inflamatórios. Os valores foram expressos com média $\pm$ e.p.m., sendo 13 e 9 machos dos grupos CTR e DRS, respectivamente, e 10 e 13 fêmeas nos grupos CTR e DRS, respectivamente.....44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Doenças crônicas não-transmissíveis: obesidade, diabetes e síndrome metabólica.....	17
2.2 Dieta rica em sacarose: as mudanças nos padrões alimentares	18
2.3 Conceito DOHaD: Origens Desenvolvimentistas da Saúde e Doença.....	22
2.4 Gestação e lactação: janelas críticas de programação metabólica.....	23
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4. DESENHO EXPERIMENTAL	28
5. MÉTODOS	30
5.1 Dieta enriquecida com sacarose	30
5.2 Obtenção e manutenção dos animais.....	31
5.3 Homeostase glicêmica e resistência à insulina	31
5.4 Morfometria.....	31
5.5 Análise bioquímica	32
5.6 Análise histológica do fígado.....	32
5.7 Análise estatística dos resultados	32
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6.1 Pesos e parâmetros morfométricos	33
6.2 Análise bioquímica	38
6.3 Análise histológica	42
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXO A	61
ANEXO B	62
ANEXO C	63
ANEXO D	64

1. INTRODUÇÃO

As condições metabólicas adversas que afligem a sociedade moderna são um desafio para os órgãos públicos de saúde, uma vez que estão associadas ao risco aumentado de doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT). Dentre as DCNTs, as principais são as doenças cardiovasculares, o diabetes mellitus tipo 2 (DM2), as doenças respiratórias obstrutivas e as neoplasias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019), além da obesidade (OOI et al., 2020). As DCNTs são condições multifatoriais que são afetadas por fatores genéticos e ambientais (OOI et al., 2020), e são responsáveis por mais de 60% das mortes no mundo e causam cerca de 80% das mortes na região das Américas (DE PEDIATRIA, 2020).

No Brasil, de forma preocupante, a obesidade já afeta 19,8% da população adulta. Esse número eleva-se consideravelmente quando se observa a frequência de 55,7% de sobrepeso nos indivíduos adultos, ou seja, mais da metade da população adulta brasileira (BRASIL, 2019). A obesidade, determinada pelo desequilíbrio crônico entre a energia gasta e ingerida, é resultante de um saldo energético positivo, o qual é armazenado na forma de triglicerídeos nas células, principalmente nos adipócitos (POPKIN et al., 2012). É um fator de risco para a síndrome metabólica, considerada um problema de saúde pública, sendo o seu crescimento expressivo relacionado, principalmente, às mudanças ocorridas nas dietas contemporâneas, que possuem um elevado teor de açúcares de adição (ex: sacarose) (TAPPY et al., 2010).

Dentre essas mudanças, destaca-se o consumo exacerbado de alimentos contendo grande quantidade de açúcar e bebidas açucaradas de alto teor calórico, alimentos processados, aumento da ingestão de alimentos fora de casa e do uso de óleos comestíveis mais baratos, além da redução na prática de atividades físicas e aumento do sedentarismo (POPKIN et al., 2012). Um estudo demonstra que 23,4% da população adulta brasileira e 14,4% da maranhense consomem diariamente esses açúcares de adição em excesso, especialmente na forma de alimentos ultraprocessados (CLARO et al., 2015). Além disso, outro estudo demonstra que 25% da dieta de crianças e adolescentes é composta de açúcares simples (NEWENS & WALTON, 2016), e de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a recomendação de ingestão diária desses açúcares livres por adultos e crianças é de

menos de 10% da ingestão diária total de calorias (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Nessa conjuntura, o conceito DOHaD (Origens Desenvolvimentistas da Saúde e Doença, do inglês: Developmental Origins of Health and Diseases), tem como objetivo investigar como mudanças pontuais ocorridas de forma precoce em organismos em desenvolvimento podem resultar em respostas adaptativas e ajustes inadequados nos sistemas homeostáticos na vida pós-natal. Além disso, investigar como essas mudanças podem acarretar em alterações metabólicas tardias e como podem contribuir para um risco aumentado de doenças crônicas e/ou problemas translacionais entre gerações (JAZWIEC & SLOBODA, 2019).

Uma vez que o organismo em desenvolvimento é plástico, esses insultos tidos em períodos cruciais no início da vida influenciam na regulação da expressão gênica e das vias de sinalização celular, tornando-o sensível e adaptável a estímulos ambientais, resultando em “compensações biológicas”. Esta plasticidade é mais prevalente durante as principais janelas de desenvolvimento, sendo estas: a gestação, a lactação, a primeira infância e a puberdade (JAZWIEC & SLOBODA, 2019).

Os estudos DOHaD tem sido de grande relevância, seja a partir da descrição dos mecanismos fisiopatológicos das doenças crônicas, seja através de perspectivas intervencionistas futuras (BAY et al., 2012; BAY & VICKERS, 2016; GIORDANO & BENYSHEK, 2015). São, portanto, essenciais para elucidação dos agravos metabólicos tardios que um indivíduo está sujeito, sendo imprescindível que se aprofunde o conhecimento sobre as consequências da exposição precoce deste indivíduo aos açúcares de adição, muito presentes nas dietas contemporâneas, e como isso repercutirá a longo prazo.

Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa tem se voltado aos efeitos que uma dieta rica em sacarose pode ter no metabolismo. Um deles demonstra que o consumo precoce de sacarose causa diminuição da capacidade cognitiva e motora em ratos (PINTO et al., 2016), além de contribuir para o desenvolvimento do estresse do retículo endoplasmático, o qual é considerado uma das causas mais precoces da esteatose hepática não alcoólica (FLISTER et al., 2018). Esse consumo exacerbado e precoce de sacarose também contribui para a indução de vias lipogênicas hepáticas e para a disfunção do tecido adiposo (FRANÇA et al., 2020).

Além disso, mostrou-se que a intervenção dietética com uma dieta rica em proteínas é capaz de reverter totalmente estes danos, com respostas metabólicas mais significativas quando comparado à simples retirada do consumo excessivo de sacarose (SOUSA et al., 2018).

Todos estes trabalhos alertam para o sério risco de complicações tardias em ratos e camundongos após o período de lactação (21 dias), simulando como seria a exposição precoce de crianças aos açúcares de adição. Entretanto, poucos são os estudos que avaliam o risco da exposição precoce de proles durante a gestação e lactação, no que discerne a identificação de desfechos precoces resultantes de insultos iniciais e o ponto-chave de mudança no perfil metabólico, a partir de um modelo de indução de mães alimentadas com dieta rica em sacarose. Com isso, é necessário o aprofundamento nas investigações, com vista à caracterização de mecanismos metabólicos que permitam testar a hipótese de que a introdução precoce de açúcares de adição à dieta, em fases críticas do desenvolvimento como a gestação e lactação, são determinantes para a instauração de disfunções metabólicas na prole durante a infância tardia.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Doenças crônicas não-transmissíveis: obesidade, diabetes e síndrome metabólica

Segundo a definição do National Cholesterol Education Program's: Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III), a síndrome metabólica (SM) representa a combinação de pelo menos três dos seguintes fatores de risco: obesidade (medida por meio da circunferência abdominal), dislipidemia (na manifestação de hipertrigliceridemia), hipertensão arterial, hiperglicemia e resistência à insulina (ALBERTI et al., 2009). É importante destacá-la do ponto de vista epidemiológico, uma vez que esta síndrome possui prevalência média de 31% na população adulta e está associada a um aumento de 2 vezes nas doenças coronarianas e cerebrovasculares, além de aumento de 1,5 vez do risco de mortalidade por várias causas (ENGIN, 2017).

A obesidade é o componente da SM observado com maior frequência, tendo uma prevalência de 39% na população com 18 anos ou mais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Está associada a uma grande redução na expectativa de vida e seu efeito extremo sobre a mortalidade é maior entre os mais jovens, quando comparado aos adultos mais velhos (ENGIN, 2017). O início cada vez mais precoce da SM em crianças e adolescentes está aumentando de maneira rápida e significativa, sendo apontado pela Organização Mundial de Saúde como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (ABARCA-GÓMEZ et al., 2017).

De acordo com a décima edição do Atlas de Diabetes 2021 da International Diabetes Federation, há 537 milhões de pessoas vivendo com a doença. Estima-se que até 2045 esse número aumentará para 700 milhões de pessoas em todo o mundo. O diabetes tem efeitos devastadores e cerca de 4 milhões de pessoas em todo mundo morrem (por ano) em consequência dessa pandemia e suas complicações. (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2021).

Esses fatores de risco associados, principalmente a obesidade e o diabetes, desencadeiam a hipertrofia no tecido adiposo, resistência à insulina e hiperglicemia. O excesso de ácidos graxos livres advindos do tecido adiposo hipertrófico desencadeia a dislipidemia, que afeta, principalmente, o tecido hepático. Devido ao seu caráter lipogênico, o fígado sintetiza triglicerídeos tanto de forma direta, através do maior influxo de ácido graxo, como de forma indireta, a partir da lipogênese

de novo, ocasionada pela hiperinsulinemia resultante da resistência periférica à insulina. Isso resulta na maior formação de triglicerídeos por esse órgão, os quais são exportados na forma de VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa) (CHOI & GINSBERG, 2011).

Esse acúmulo de gordura no fígado causa a doença hepática gordurosa não-alcóolica (DHGNA), que é considerada a repercussão da SM no tecido hepático. Essa doença é desencadeada quando a síntese de lipídios é maior do que a capacidade hepática de exportação e/ou oxidação destes e é a principal doença hepática crônica no mundo (LONARDO et al., 2016). Estima-se que a DHGNA afete 24% da população adulta global, estando presente em até 88% dos adultos obesos (SINTON, HAY & DRAKE, 2019). A prevalência da DHGNA aumenta proporcionalmente em todo mundo, à medida que as epidemias de obesidade e DM2 aumentam (YOUNOSSI, 2019), sendo os hábitos de vida e o perfil alimentar da sociedade os principais fatores contribuintes para isso.

2.2 Dieta rica em sacarose: as mudanças nos padrões alimentares

As DCNT, como a obesidade, a DM2, a hipertensão e a SM, bem como o déficit cognitivo, estão diretamente relacionados ao aumento do consumo de alimentos ultraprocessados, ricos em sal, gorduras e açúcares de adição. Essas mudanças no perfil alimentar da sociedade tiveram seu alicerce construído na década de 1970, a partir de mudanças no padrão alimentar e comportamental dos indivíduos, sobretudo nos países ocidentais. Tais transformações começaram a ser cada vez mais visíveis no início dos anos 90, a partir de países de baixa e média renda, o que se observava antes somente nos países desenvolvidos. A industrialização e consequente urbanização foram uma importante força motriz para o emergir das doenças crônicas nos países em desenvolvimento, sobretudo a obesidade global e o sobrepeso (POPKIN et al., 2012).

Os hábitos alimentares e de vida saudáveis estavam perdendo força, ao passo que vários alimentos ultraprocessados e refeições preparadas eram cada vez mais comuns, bem como os “fast food”, que estavam se tornando uma parte integrante e fundamental na vida dos indivíduos (POPKIN et al., 2012). Estes alimentos ultraprocessados não são alimentos modificados, mas formulações compostas

principalmente de fontes de energia baratas, muitas vezes compostas de calorias discricionárias, além de aditivos, usando uma série de processos (portanto, "ultraprocessados"). Os produtos ultraprocessados são feitos para serem hiperpalatáveis e atraentes, com longa vida de prateleira e capazes de serem consumidos em qualquer lugar, a qualquer hora. Sua formulação, apresentação e marketing geralmente induzem e promovem o consumo excessivo (MONTEIRO et al., 2018).

Sendo assim, as crianças e adolescentes são os mais seduzidos pela alta oferta de alimentos diferenciados disponíveis, uma vez que são mais suscetíveis à comercialização desses alimentos que os adultos, o que torna necessária a redução da exposição dessas faixas etárias aos alimentos obesogênicos (ABARCA-GÓMEZ et al., 2017). A principal forma de açúcar de adição em todo o mundo é a sacarose, sendo esta a principal colaboradora para a ingestão total de açúcar, alcançando taxas tão altas quanto 25% do consumo total de energia em muitos países, sendo este consumo muito maior entre os adolescentes (GIBSON et al., 2013).

No intestino, a sacarose é eficientemente hidrolisada em seus dois constituintes monossacarídeos: a glicose e a frutose, que são absorvidas sob taxas muito similares (TAPPY et al., 2010). Entretanto, há diferenças no metabolismo desses dois monossacarídeos. Primeiramente, existem diferenças entre as reações enzimáticas nas etapas iniciais do metabolismo de ambos (LEE et al., 2018). A frutose é absorvida no intestino através de transportadores específicos de glicose, como o transportador de glicose 5 (Glut 5) e o Glut 2. Ela é mais lipogênica do que outros carboidratos (LEE et al., 2018). Durante a sua metabolização no fígado, a frutose é fosforilada em frutose-1-fosfato, a partir da catalisação da reação pela enzima frutoquinase, podendo ser convertida em gliceraldeído e fosfato de di-hidroxiacetona. Ambos os substratos podem ser convertidos em glicerol-3-fosfato, que é a base para a síntese de triacilglicerol. Em contrapartida, a glicose é absorvida no intestino e é fosforilada em glicose-6-fosfato, que a partir da reação enzimática promovida pela glicoquinase é transformada em glicogênio e pode ser estocado como reserva energética, como demonstra a Figura 1.

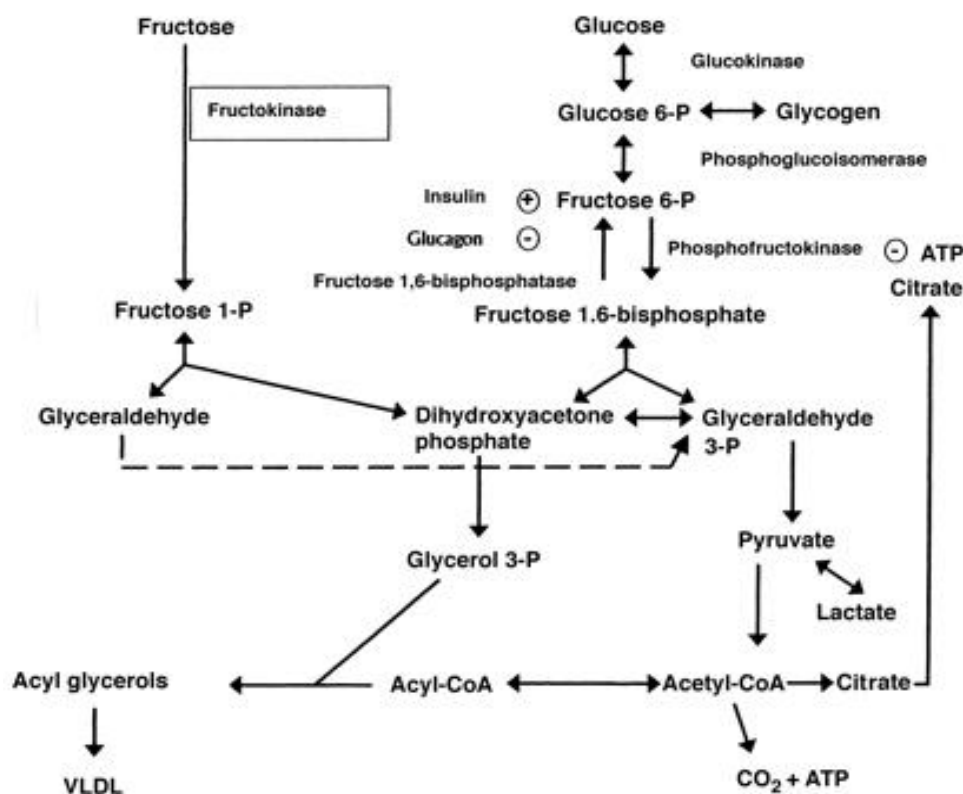


Figura 1. Metabolização da frutose e glicose no organismo. Fonte: ELLIOTT et al (2002).

Em segundo lugar, o metabolismo hepático da glicose é limitado pela capacidade de armazenamento desta como glicogênio e, mais importante, pela inibição da glicólise e captação adicional de glicose resultante dos efeitos do citrato e do ATP na inibição da fosfofructoquinase. Ao contrário da glicose, o metabolismo da frutose ignora a fosfofructoquinase, que é um importante passo limitador de taxa na glicólise (ELLIOTT et al., 2002).

Por último, uma vez dentro da corrente sanguínea, o destino destes monossacarídeos difere-se acentuadamente. A glicose induz a liberação de insulina pelas células β -pancreáticas, no intuito da sua própria absorção pelos tecidos sensíveis à insulina e captação de energia pelo organismo, enquanto que a frutose sofre captação quase que completa pelo fígado, onde é convertida em trioses que serão posteriormente usadas para a síntese de triglicerídeos (RIPPE & ANGELOPOULOS, 2013). Portanto, quando a frutose é consumida em grandes quantidades, há um aumento significativo na produção de glicerol-3-fosfato e este servirá como substrato para uma maior síntese de triacilglicerol.

Estudos demonstram que o consumo de frutose em maior quantidade foi associado positivamente ao aumento dos níveis de TG e inversamente proporcional a um aumento no colesterol HDL (BROWN et al., 2008). Como a frutose pode ser produzida e transportada pela placenta, também se considera que a mesma e seus metabólitos estejam relacionados na condução do processo de programação metabólica fetal, como indica a Figura 2 (TAIN et al., 2016). Estudos tem evidenciado que a dieta rica em frutose desencadeia as várias características da SM, como obesidade, hipertensão, hipertrigliceridemia, dislipidemia, intolerância à glicose e diminuição da sensibilidade à insulina (JOHNSON et al., 2007; LEE, et al., 2018). Além disso, estudos também indicaram que a alimentação com glicose ou amido não é tão eficaz para induzir SM quanto a alimentação com frutose (JOHNSON et al., 2007), enfatizando o papel fundamental da frutose sobre os efeitos prejudiciais da sacarose (PINTO et al., 2016).

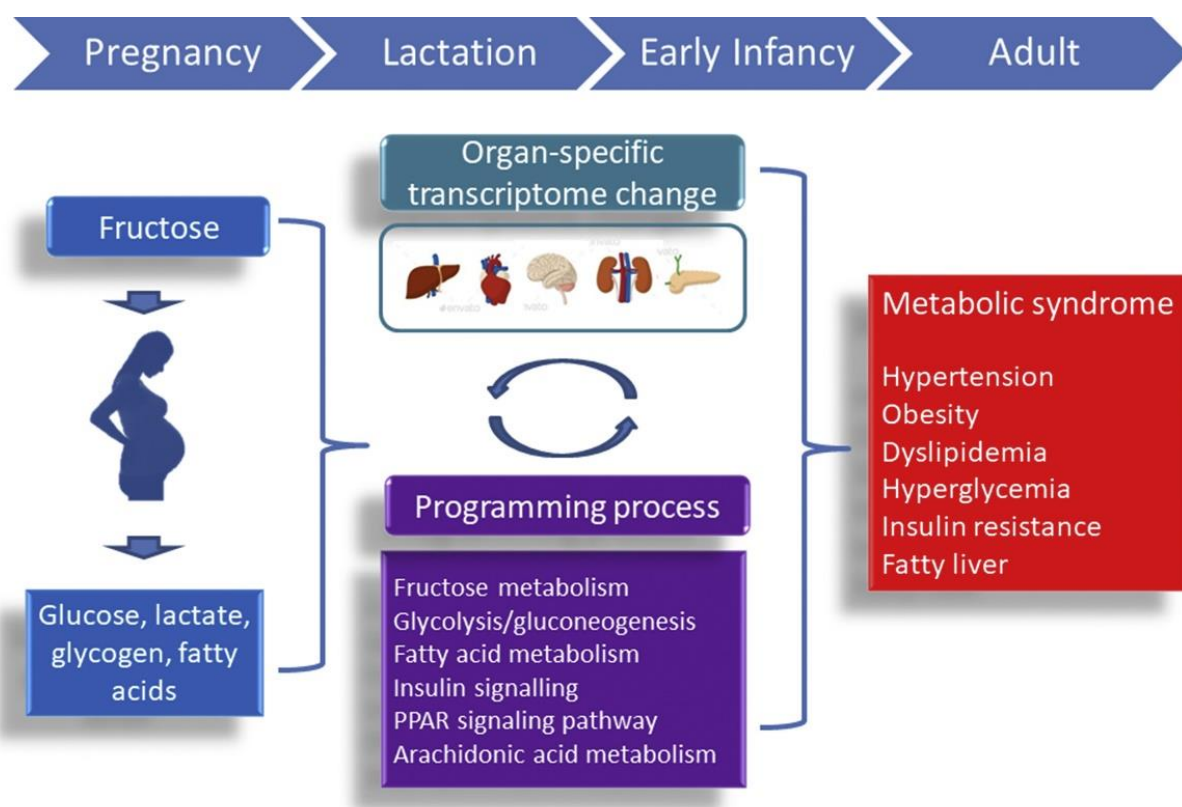


Figura 2. Relação entre o consumo de frutose no início da vida e o processo de programação metabólica fetal. Os elevados consumos de frutose aumentam a vulnerabilidade aos fenótipos relacionados à síndrome metabólica na vida adulta. Fonte: LEE et al. (2018).

2.3 Conceito DOHaD: Origens Desenvolvimentistas da Saúde e Doença

A princípio, estudos iniciais foram desenvolvidos analisando o ambiente intrauterino e as consequências para o feto a longo prazo, procurando-se modelos que explicassem essa relação. Uma alternativa levantada foi o modelo do “genótipo poupador”, proposta por Neel, na década de 1960 (NEEL, 1962), o qual dispõe que em ambientes com escassez alimentar, populações que apresentam maior propensão para o desenvolvimento da resistência à insulina sofreriam uma mutação aleatória, fazendo com que estes indivíduos tivessem essa condição como forma adaptativa benéfica a eles, uma vez que permaneceriam com a glicose por mais tempo na circulação suprimindo os órgãos periféricos e transmitindo esse caráter aos seus descendentes (NEEL, 1999).

Essa hipótese foi sendo moldada com o passar do tempo, focando nos fatores ambientais. Trazendo-a para a realidade do ambiente intrauterino, ela propõe que, em condições limitadas de nutrientes, o feto faça alterações adaptativas que retardam seu crescimento e que resultam em resistência insulínica na mãe, para que não haja competição mãe-feto pela glicose circulante. Isso permitiria uma vantagem adicional de sobrevivência para este feto, em tempo hábil suficiente para se desenvolver nesse ambiente intrauterino adverso, otimizando o uso dos suprimentos energéticos reduzidos (HALES & BARKER, 2001).

Já na década de 1970, Ravelli et al. (1976), ao estudarem uma população de 300.000 homens de 19 anos, em um estudo de coorte, examinados durante sua indução militar, filhos de mulheres expostas à “fome holandesa” durante o período de 1944-1945 (período de grande escassez alimentar ocorrido durante o cerco da Holanda pela Alemanha, na Segunda Guerra Mundial), constataram que, dependendo do período gestacional de exposição à fome e desnutrição materna, esses indivíduos, na vida adulta, apresentavam padrões diferentes de composição corporal. Quando estes eram expostos à desnutrição materna durante o último trimestre da gestação e primeiros meses de vida, apresentavam uma baixa incidência de obesidade (RAVELLI et al., 1976).

Em contrapartida, se a desnutrição materna ocorresse na primeira metade da gestação, a incidência de obesidade aumentava significativamente nos indivíduos, demonstrando a importância que os primeiros meses do indivíduo possuem, tanto na

gestação quanto na lactação, sendo estes períodos críticos de desenvolvimento para a celularidade do tecido adiposo (RAVELLI et al., 1976). Assim, em 1986, Barker e colaboradores desenvolveram a hipótese de que condições de interferência durante a vida intrauterina e a infância aumentavam o risco de doenças cardiovasculares nos indivíduos quando adultos (BARKER et al., 1989).

Para testá-la, em seu estudo de coorte realizado na Inglaterra e País de Gales, correlacionaram o peso ao nascer de bebês, as condições ambientais e diferenças geográficas durante a infância, com a saúde cardiovascular destes indivíduos quando tinham 10 anos e quando adultos, avaliando a relação do baixo peso ao nascer e o desenvolvimento da obesidade na vida adulta. Constataram que as diferenças geográficas na altura das mães que tiveram bebês e as diferenças nas taxas de pulso de seus filhos aos 10 anos de idade sugeriam que as diferenças no ambiente intrauterino influenciam na pressão arterial durante a vida adulta (BARKER et al., 1989).

Essa hipótese de que o ambiente inicial da vida influencia os indivíduos a terem maior suscetibilidade à doenças crônicas posteriores na vida adulta, agora reconhecida como as Origens Desenvolvimentistas da Saúde e Doença (DOHaD), foi proposta pioneiramente pelo professor David Barker na segunda metade da década de 1980, a partir desse estudo de coorte realizado na Grã-Bretanha. Hoje, sabe-se que as principais janelas metabólicas suscetíveis aos insultos são a gestação, lactação, primeira infância e puberdade (JAZWIEC & SLOBODA, 2019).

2.4 Gestação e lactação: janelas críticas de programação metabólica

O desenvolvimento no ambiente intrauterino é um processo complexo e dinâmico. Requer interação entre mãe e feto para sustentar o equilíbrio entre ambos e a posterior sobrevivência durante a gravidez. O entrelace de interações entre mãe, feto e placenta são críticos nessa fase inicial da vida para o suprimento adequado de macro e micronutrientes, oxigênio e sinais endócrinos. A trajetória de desenvolvimento do feto é governada por sua própria constituição genética. Entretanto, só pode ser alcançada se a nutrição materna for adequada e as funções placentárias forem suficientes para a manutenção equilibrada das taxas de proliferação, crescimento e diferenciação celular e tecidual (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2018).

Sendo assim, os primeiros 1000 dias de vida nos humanos, que abrange desde a concepção até os 2 anos de vida após o nascimento, que relaciona o ambiente nutricional materno, crescimento fetal e neonatal subsequente, é um período determinante para a saúde da geração seguinte na vida adulta (RABADAN-DIEHL & NATHANIELSZ, 2013). Dentro desse aspecto, alguns fatores são responsáveis por modular a programação metabólica, sendo eles: o aumento da suscetibilidade dos indivíduos ao armazenamento de gordura na presença de um ambiente obesogênico, o próprio estado nutricional da mãe durante a gravidez e a alimentação ofertada à criança durante a primeira infância, além de fatores genéticos (PATEL & RINIVASAN, 2010).

Portanto, levando em consideração o conceito de programação nutricional e metabólica, possíveis distúrbios no suprimento necessário dos componentes alimentares afetam tanto o crescimento do feto como podem ter consequências adversas na sua saúde futura, sendo a nutrição adequada crucial para o não desenvolvimento de doenças crônicas na idade adulta (WARNER & OZANNE, 2010). Por esse motivo, a amamentação desempenha importante função nessa programação (BADILLO-SUÁREZ et al., 2017). A programação lactacional refere-se à programação tida no metabolismo em decorrência a algum insulto ou exposição da mãe durante o período de amamentação de sua prole, o que pode levar a alterações nos nutrientes, hormônios ou componentes bioativos do leite (ELLSWORTH et al., 2018).

O período de lactação pode ser dividido em: (a) única fase de leite, na qual a prole é totalmente dependente do leite materno; seguida de (b) período misto de alimentação, na qual a prole começa a introduzir outros tipos de alimentos e as mamadas complementares são necessárias apenas para sustentar o crescimento infantil; e, por fim, (c) desmame, onde a prole já não necessita do leite materno e nem depende da mãe para alimentação (LANGER, 2008). A transição do leite exclusivo para a introdução complementar de alimentos difere por cada espécie animal (Wells 2014).

O período intrauterino é inegavelmente um período crítico para a formação e desenvolvimento de órgãos, o qual são vulneráveis às influências dessa janela metabólica. Como estes continuam em diferenciação e maturação, bem como ainda há envolvimento na manutenção da homeostase da glicose durante o período de

amamentação, as exposições durante a janela de lactação fornecem uma janela única de oportunidade, dentro dos primeiros 1000 dias, de não apenas efeitos de programação, mas também de potencializar os efeitos das exposições no útero, no que diz respeito ao risco de doenças metabólicas ao longo da vida, do ponto de vista da saúde pública (ELLSWORTH et al., 2018).

Muitos são os eventos gestacionais que podem alterar a trajetória do desenvolvimento fetal. Isso inclui fatores ambientais, como a subnutrição ou supernutrição materna (DEARDEN & OZANNE, 2015), estilo de vida, estresse, doença materna, exposição ambiental a produtos químicos desreguladores endócrinos, abuso de substâncias e intervenções médicas durante a gravidez (PADMANABHAN et al., 2016).

Os resultados desses insultos culminam em mecanismos de programação, conforme mostrado na Figura 3, que envolvem: (a) alterações no meio endócrino materno-fetal, incluindo os hormônios maternos insulina e leptina, dentre outros (DEARDEN & OZANNE 2015.); (b) alterações placentárias e transferência prejudicada de nutrientes da mãe para o feto (LARQUÉ et al., 2014); (c) restrição de crescimento intrauterino (RCIU) (PADMANABHAN et al., 2016); (d) aumento do estresse oxidativo e inflamação, que causam danos nos componentes celulares (ELLSWORTH et al., 2018); (e) envelhecimento celular acelerado (MARTIN-GRONERT & OZANNE, 2012.); (f) regulação epigenética, como metilação do DNA, modificação de histonas e expressão de microRNA, que podem alterar a expressão de genes (PATTI, 2013).

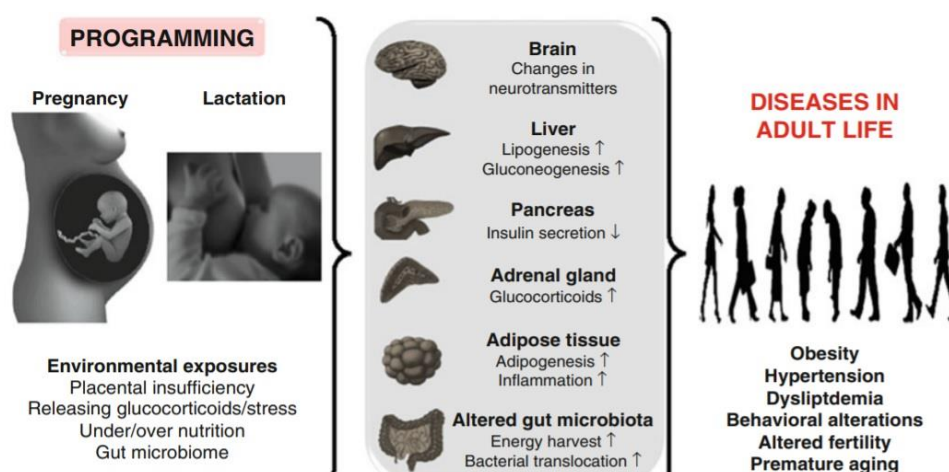


Figura 3. Insultos causados durante a gestação e lactação, suas consequências teciduais e na vida adulta. Fonte: RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al. (2018).

Além disso, a placenta é um importante agente de programação da saúde e doença dos indivíduos. Os efeitos sobre a função placentária e as suas consequências estão intimamente ligados ao seu estágio de desenvolvimento, ao tipo de insulto ocorrido e ao sexo do concepto. Entretanto, mesmo em condições adversas, a placenta é capaz de se adaptar ao ambiente em que está exposta e otimizar suas funções para promover a sobrevivência fetal. Adaptações do fenótipo placentário em resposta à dieta materna e ao seu estado metabólico, por exemplo, irão alterar o fornecimento de nutrientes ao feto para garantir sua resistência. Isso implica principalmente em importantes mudanças epigenéticas que ainda são pouco documentadas (TARRADE et al., 2015).

Nesse aspecto, estudos já demonstram uma resposta sexualmente dimórfica à nutrição e metabolismo. O próprio estudo sobre a fome holandesa no final da 2ª Guerra Mundial é um exemplo, no qual o desenvolvimento de hipertensão mais tardiamente na vida ocorreu com os meninos, mas não com as meninas. Além disso, em um estudo de Tarrade et al. (2013), as placentas das fêmeas filhas de mães que consumiram uma dieta rica em gordura apresentaram um maior armazenamento lipídico em comparação com as dos machos, com uma expressão gênica diferencial entre os dois sexos. Somando-se a isso, os fetos apresentaram uma dislipidemia que afetou mais machos do que fêmeas (TARRADE et al., 2013). Portanto, o que pode-se observar é que há uma adaptação fisiológica com relativa proteção do sexo feminino de várias espécies.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o impacto da exposição excessiva a açúcares de adição durante as fases pré-gestacional, de gestação e de lactação sobre a instalação e progressão precoce da síndrome metabólica na prole de ratas Wistar.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar as repercussões metabólicas na prole de ratas Wistar expostas a uma dieta rica em sacarose (contendo 25%) durante a pré-gestação, gestação e lactação;

Avaliar o efeito do consumo de sacarose materno de ratas Wistar sobre marcadores biológicos da síndrome metabólica durante a infância tardia da prole advinda dessas mães;

Analisar a histologia hepática em ratos Wistar machos e fêmeas provenientes de mães que ingeriram sacarose em excesso durante os períodos pré-gestacional, gestação e lactação;

4. DESENHO EXPERIMENTAL

Ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) adultas (n = 15), com aproximadamente 75 a 90 dias de vida, foram divididas em dois grupos: as que foram expostas ao estresse nutricional (n = 7) e as que não foram expostas (n = 8). Esse estresse nutricional se deu através de uma dieta contendo 25% de sacarose (DRS), em comparação a uma dieta controle, que contém 10% de sacarose (CTR). O período de indução dessas ratas foi de 7 semanas, quando foram acasaladas com ratos da mesma idade (n = 15). O acasalamento foi realizado através do método de Poiley (POILEY, 1960), levando em consideração as determinadas linhagens de animais para que não houvesse consanguinidade na prole. Para a confirmação da prenhez das ratas, foi realizado o lavado vaginal matinal, com o intuito de verificar a presença de espermatozoides, caracterizando a cobertura das mesmas. As ratas continuaram com suas respectivas dietas (CTR ou DRS) durante toda a gestação e lactação.

Ao nascimento dos filhotes, a ninhada foi ajustada para 8 filhotes por rata, devido ao aporte de aleitamento da mãe. A partir do desmame (aos 21 dias de vida da prole), os filhotes foram separados das mães e divididos em dois grupos experimentais:

- CTR: filhotes machos (n = 13) e fêmeas (n = 10) de mães alimentadas com ração CTR antes e durante a gestação e lactação;
- DRS: filhotes machos (n = 9) e fêmeas (n = 13) de mães alimentadas com ração DRS antes e durante a gestação e lactação.

As duas proles foram alimentados com dieta CTR *ad libitum* desde o desmame e foram igualmente acompanhados até os 30 dias de vida (eutanásia). Nesse período foi realizado a mensuração do peso corporal e do consumo alimentar das mães e das proles, feita durante duas vezes na semana.

Aos 28 dias de vida, foi realizada a avaliação metabólica a partir do teste de tolerância à glicose (GTT). Aos 30, após jejum de 8 horas, os animais foram anestesiados com solução de quetamina e xilazina (nas doses de 40 e 10 mg/kg, respectivamente) para mensuração do Índice de Lee, obtido através do quociente da raiz cúbica do peso corporal (g) pelo comprimento nasoanal (mm), multiplicado por 10 (BERNARDIS E PATTERSON, 1968).

Em seguida, os animais foram laparatomizados para a coleta de alíquotas de sangue por punção aórtica abdominal, para dosagens séricas de glicose, colesterol e triglicerídeos. Logo depois, foram eutanasiados por exsanguinação e coletados os seguintes órgãos: fígado, pâncreas, ovários, testículos e coxins adiposos (gorduras perigonadal, retroperitoneal, mesentérica, peripancreática, pericárdica), além do tecido adiposo marrom e músculos gastrocnêmio e sóleo. Nesses tecidos foi realizada a morfometria, além da avaliação histológica do fígado. Para avaliação do potencial impacto dessa intervenção nutricional sobre parâmetros de fecundidade, foi comparada a prolificidade de ambos os grupos maternos.

Os protocolos experimentais realizados neste projeto estão vinculados ao projeto “Introdução dietética precoce de açúcares de adição e sua correlação com a iniciação e progressão da síndrome metabólica e suas comorbidades”, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMA, sob o nº 23115.038755/2018-22 (em anexo).

5. MÉTODOS

5.1 Dieta enriquecida com sacarose

A ração rica em sacarose foi manufaturada a partir da metodologia proposta por (PINTO et al., 2016). Primeiramente, a ração padrão (Nuvilab®, Nuvital) foi pulverizada e a ela adicionada leite condensado (Moça® - Nestle), açúcar refinado e água nas proporções demonstradas na Tabela 1, até formar uma massa pastosa. Esta mistura foi manipulada para formar *pellets* semelhantes à ração padrão e dessecada em estufa (38 °C, por 3 dias). Posteriormente, a ração produzida foi armazenada em geladeira por no máximo 7 dias. A composição centesimal comparativa entre as dietas se encontra na Tabela 2.

Tabela 1. Quantidade relativa de componentes da dieta rica em sacarose.

Composição	Quantidade
Ração triturada (Nuvilab®)	40%
Leite condensado Moça (Nestle)	40%
Açúcar refinado	8,5%
Água filtrada	q.s.p

Fonte: PINTO et al. (2016).

Tabela 2. Composição centesimal da dieta normal e da rica em sacarose.

Composição centesimal	Dieta padrão (CTR)	Dieta rica em sacarose (DRS)
Carboidratos	55,4%	65%
Sacarose	10%	25%
Proteínas	21%	12,3%
Lipídeos	5,2%	4,3%
Valor energético	352 Kcal/100g	348 Kcal/100g

Fonte: SOUSA et al. (2018).

5.2 Obtenção e manutenção dos animais

Os animais parentais foram obtidos a partir do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão. Estes e suas proles foram mantidos no Biotério Setorial do prédio de pós-graduação em Ciências da Saúde/CCBS, em gaiolas de polietileno forradas com maravalha (máximo de 4 animais por gaiola), com temperatura (23 ± 2 °C), umidade (60%) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) controladas e acesso livre à água filtrada e às rações CTR e DRS.

5.3 Homeostase glicêmica e resistência à insulina

Durante a última semana de experimentação da prole (aproximadamente aos 28 dias de vida), a homeostase glicêmica foi avaliada através do teste de tolerância à glicose (GTT). Para isso, os animais foram submetidos a jejum diurno de 8 horas antes da administração de 2g/kg de glicose, via intraperitoneal.

Em seguida, gotas sanguíneas das veias da cauda foram coletadas imediatamente antes (tempo 0) e 15, 30, 60 e 120 minutos após a carga de glicose, para a mensuração da glicemia através de glicosímetro (Accu check Active®, Roche Diagnostic, Alemanha). A resistência à insulina foi inferida a partir do cálculo do Índice TyG (triglicerídeos e glicose) [$\ln(\text{triglicerídeos em jejum (mg/dL)} \times \text{glicose em jejum (mg/dL)} / 2)$] (SIMENTAL-MENDÍA et al., 2008).

5.4 Morfometria

Aos 30 dias de vida, após jejum de 8 horas, os animais foram anestesiados com solução de quetamina e xilazina (nas doses de 40 e 10 mg/kg, respectivamente) e laparatomizados para coleta de sangue por punção aórtica abdominal e eutanásia por exsanguinação. Em seguida, foram coletados os seguintes órgãos e tecidos: fígado, pâncreas, gônadas (testículos e ovários) e depósitos de tecido adiposo branco (perigonadal, retroperitoneal, mesentérico, peripancreático e pericárdico) e marrom, além dos músculo gastrocnêmio e sóleo. Os órgãos e tecidos foram lavados com solução salina (PBS), dessecados e pesados. Estes tecidos foram armazenados em solução de formaldeído a 10 % ou paraformaldeído 4% (somente o pâncreas) para posteriores análises histológicas ou congelados a - 80°C.

5.5 Análise bioquímica

O sangue coletado foi coagulado e centrifugado (3500 rpm por 5 min) para obtenção do soro, o qual foi utilizado para determinação das concentrações séricas de triglicerídeos e colesterol, por métodos espectrofotométricos, utilizando kits laboratoriais (LABTEST®), seguindo as especificações descritas pelo fabricante.

5.6 Análise histológica do fígado

Após pesagem, acondicionamento e fixação em formaldeído 10%, o fígado foi submetido aos processos de desidratação, diafanização e inclusão, para posterior microtomia e coloração com hematoxilina/eosina. As lâminas de fígado foram analisadas em microscópio de luz (10x, 20x e 40x) e avaliadas segundo o critério de escore proposto por Kleiner et al. (2005), para a classificação do grau de esteatose e esteato-hepatite. A análise histológica consiste no escore baseado na somatória de pontuações de: inflamação lobular (0-2), esteatose (0-3) e “ballooning” hepatocelular (0-2).

5.7 Análise estatística dos resultados

Todos os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média, e analisados estatisticamente através do software GraphPad Prism®, versão 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA). Primeiramente, foi realizado o teste de normalidade à partir do teste de Shapiro-Wilk (para amostras de tamanho inferior a 30) e, em seguida, as análises estatísticas foram calculadas através do teste *t* de Student não pareado. Os valores de $p < 0,05$ são considerados significativos.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Pesos e parâmetros morfométricos

O presente estudo demonstra o impacto de uma dieta materna rica em sacarose antes e durante a prenhez e lactação sobre o metabolismo glicolipídico da prole de fêmeas e machos desmamados em uma dieta controle. Os desfechos foram analisados aos 30 dias de vida dos animais (período juvenil pré-pubere), que corresponde ao período da infância tardia nos humanos (PICUT et al., 2015). A maior ingestão materna de açúcares, particularmente durante a gestação e lactação, não resultou em diferenças significativas sobre os parâmetros de fecundidade, de acordo com a Figura 4.

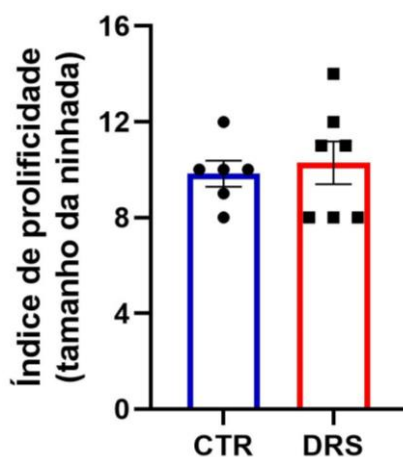


Figura 4. Índice de prolificidade das ratas mães CTR e DRS de acordo com o tamanho de sua ninhada no parimento. Os valores foram expressos com média $\pm$ e.p.m., sendo 6 fêmeas CTR e 7 fêmeas DRS. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

Em contrapartida, a dieta materna rica em sacarose programou o metabolismo fetal, resultando numa prole DRS com maior peso corporal e comprimento nasoanal do que a prole CTR no nascimento, conforme é evidenciado na Figura 5.

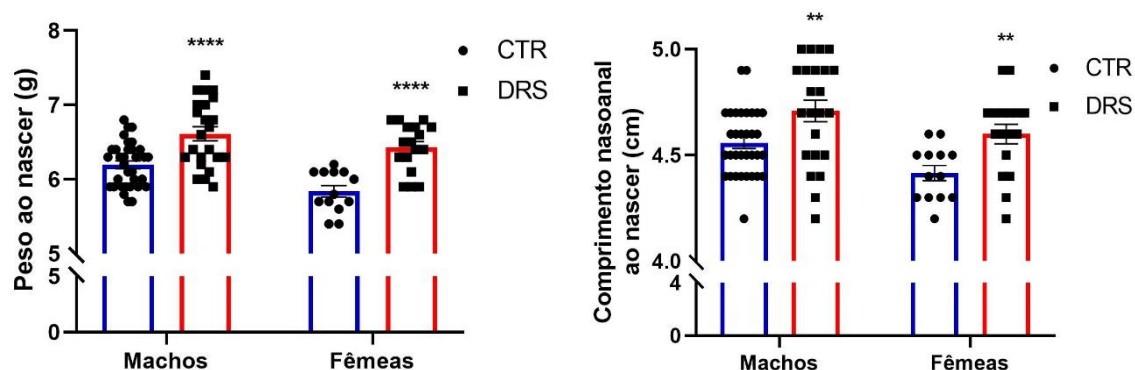


Figura 5. Peso e comprimento nasoanal ao nascer das proles CTR e DRS, machos e fêmeas. Os valores foram expressos com média $\pm$ e.p.m., sendo 33 e 23 machos nos grupos CTR e DRS, respectivamente, e 13 e 17 fêmeas nos grupos CTR e DRS, respectivamente. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle. **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle.

O estudo de D'alessandro et al. (2014) também constatou essa diferença de peso ao nascer entre a prole de ratas Wistar que consumiram uma dieta rica em sacarose semelhante a esta (sendo ela a principal componente, contendo 65% deste macronutriente) durante o período gestacional e de lactação, quando comparado ao grupo CTR (D'ALESSANDRO et al., 2014). Entretanto, os animais eram significativamente menores do que o grupo CTR no nascimento, mas tiveram aumento de peso desde o desmame até o final do período experimental, com 150 dias de vida. Já no presente trabalho, isso foi observado de forma oposta, com o peso corporal e comprimento nasoanal dos animais DRS sendo significativamente maiores do que o dos CTR no período do nascimento. Esse perfil de regulação não se manteve até os 30 dias de vida dos animais, quando se observa que os animais DRS são mais leves e menores que os animais CTR, demonstrando o déficit de desenvolvimento tido por esses animais, como pode-se observar na Figura 6.

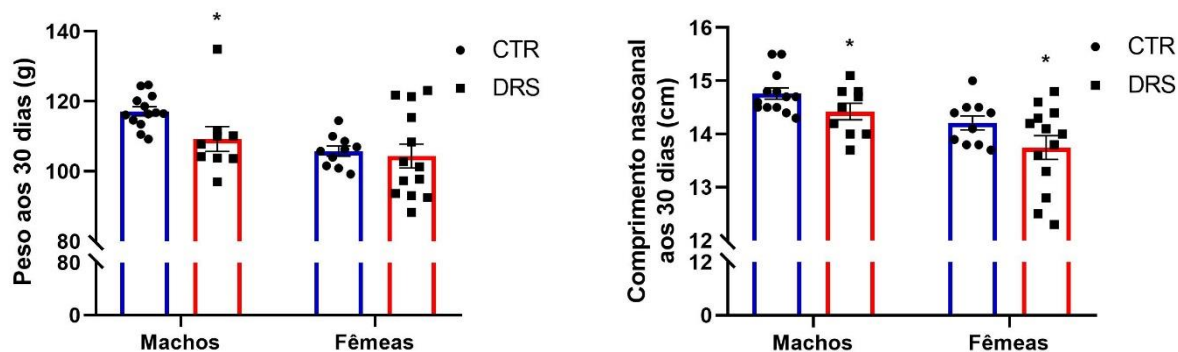


Figura 6. Peso e comprimento nasoanal aos 30 dias de vida das proles CTR e DRS, machos e fêmeas. Os valores foram expressos com média $\pm$ e.p.m., sendo 13 e 9 machos nos grupos CTR e DRS, respectivamente, e 10 e 13 fêmeas nos grupos CTR e DRS, respectivamente. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

Quanto à mensuração do Índice de Lee, um indicativo para a obesidade, não foi obtida diferença estatística entre os grupos CTR e DRS em ambos os sexos no período do nascimento, por conta de ambas as proles DRS apresentarem tanto o peso corporal quanto o comprimento nasoanal maiores que as proles CTR. Já aos 30 dias de vida, somente as fêmeas DRS apresentaram índice de Lee maior, devido ao seu menor crescimento acentuado (diminuição do comprimento nasoanal) e não pelo aumento do seu peso, conforme mostrado na Figura 7.

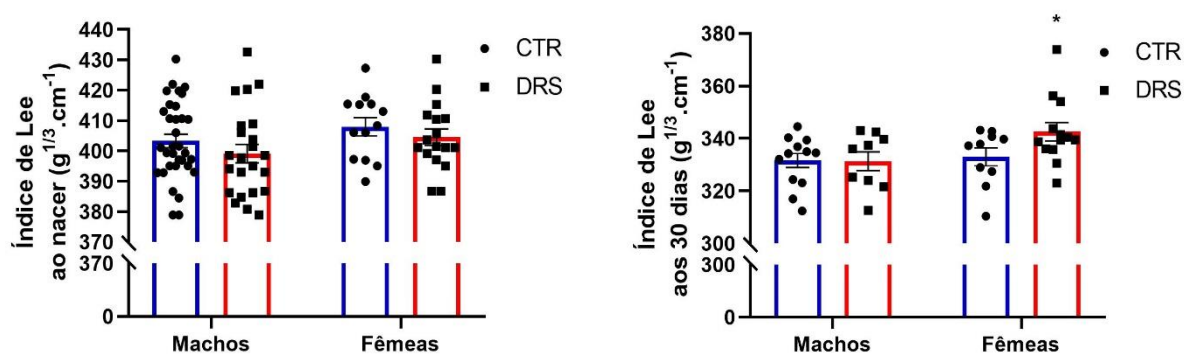


Figura 7. Índice de Lee ao nascer e aos 30 dias de vida das proles CTR e DRS, machos e fêmeas. Os valores foram expressos com média $\pm$ e.p.m., sendo 13 e 9 machos nos grupos CTR e DRS, respectivamente, e 10 e 13 fêmeas nos grupos CTR e DRS, respectivamente. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

A adiposidade visceral dos animais do presente estudo não foi significativamente aumentada na prole exposta à dieta rica em sacarose materna antes e durante os períodos de gestação e lactação, conforme observado na Figura 8 (A, B, C, D e E). Isso levanta a possibilidade de que a exposição pré-natal aos açúcares de adição produza adaptações fisiológicas que “preparam” o indivíduo para um ambiente pós-natal de alto teor de açúcar. Isso significa que há uma resposta preditiva-adaptativa, que irá depender se o indivíduo foi exposto a um insulto ou não desde o período gestacional, onde a exposição ao alto teor de açúcar durante o período pós-natal só promoverá aumento de gordura corporal se não houver essa mesma exposição no início da vida (TOOP et al., 2017). Em contrapartida, houve um aumento significativo no tecido adiposo marrom do grupo de fêmeas, de acordo com a Figura 8F.

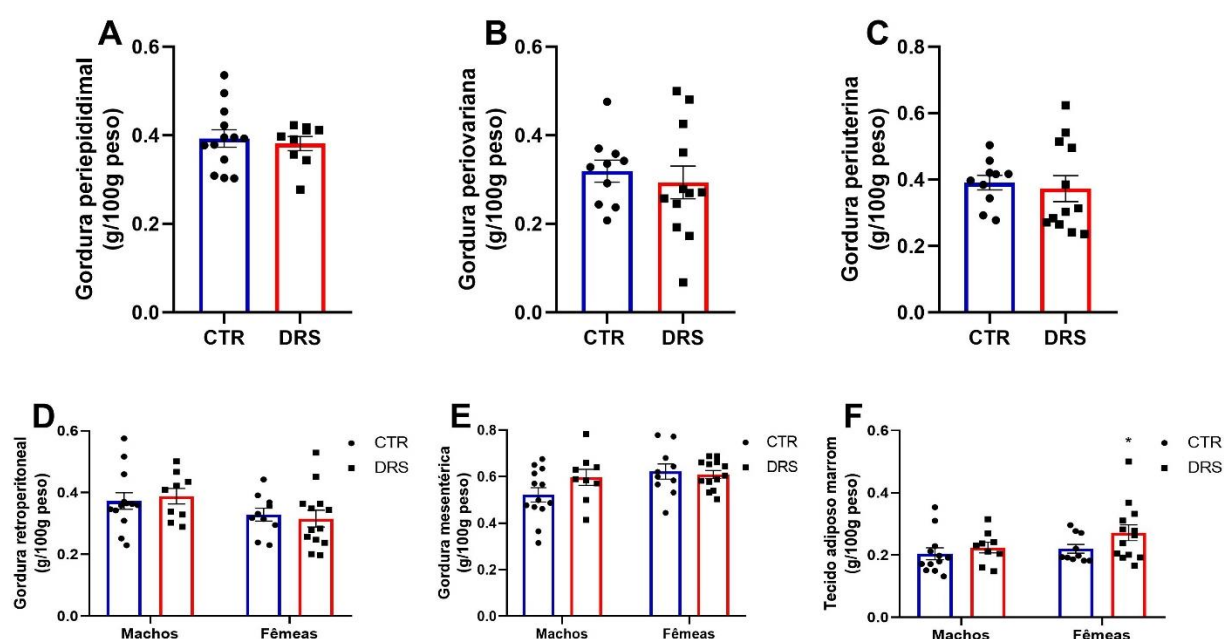


Figura 8. Parâmetros morfométricos dos tecidos adiposos das proles aos 30 dias. (A): gordura epididimal; (B): gordura periovariana; (C): gordura periuterina; (D): gordura retroperitoneal; (E): gordura mesentérica; (F): tecido adiposo marrom. Os valores foram expressos em g/100g de peso corporal, com média $\pm$ e.p.m., sendo 13 e 9 machos dos grupos CTR e DRS, respectivamente, e 10 e 13 fêmeas nos grupos CTR e DRS, respectivamente. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

Além disso, houve diferenças em alguns órgãos metabólicos e reprodutivos dos animais DRS, como mostra a Figura 9.

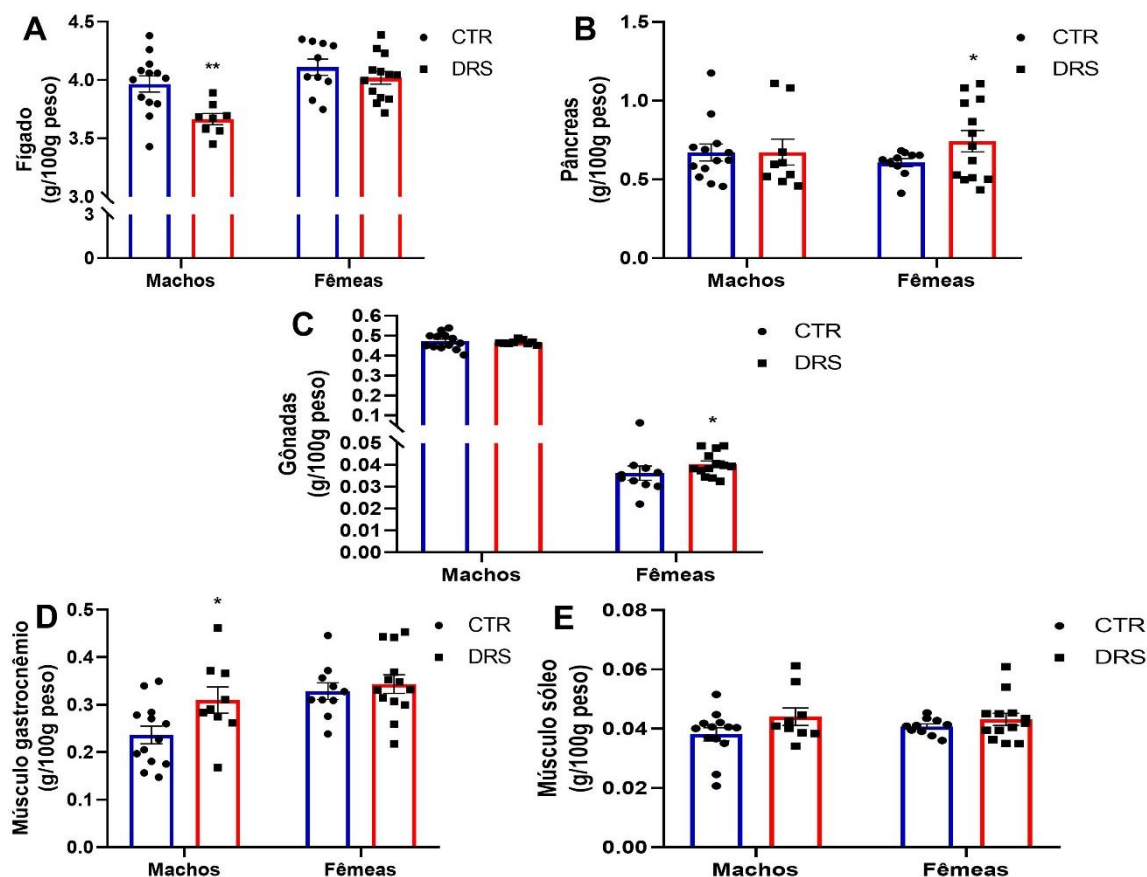


Figura 9. Parâmetros morfométricos de órgãos e tecidos das proles aos 30 dias. (A): fígado; (B): pâncreas; (C): gônadas - testículos e ovários; (D): músculo gastrocnêmio; (E): músculo sóleo. Os valores foram expressos em g/100g de peso corporal, com média $\pm$ e.p.m., sendo 13 e 9 machos dos grupos CTR e DRS, respectivamente, e 10 e 13 fêmeas nos grupos CTR e DRS, respectivamente. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

O mecanismo envolvido nessa regulação é que o cérebro detecta a ingestão calórica excessiva, e como consequência ativa a termogênese como meio de prevenir a obesidade. Toda essa ação é orquestrada pelo sistema nervoso simpático, por meio dos receptores β -adrenérgicos nos tecidos-alvo, o braço eferente desse mecanismo de regulação homeostática, desempenhando assim um papel crítico na defesa do organismo contra a obesidade induzida por dieta (BACHMAN et al., 2002).

Além disso, o elemento-chave na termogênese promovida pelo tecido adiposo marrom é a expressão única da proteína mitocondrial: a UCP1. Essa proteína é portadora de prótons que, após a ativação, desacopla a respiração da fosforilação oxidativa, facilitando assim a dissipação de energia na forma de calor (KUMAR, SUNVOLD & SCARPACE, 1999).

Nesse aspecto, estudos já demonstram que o alto consumo materno de carboidratos influencia a resposta de escurecimento do tecido adiposo branco na prole. Alzamendi et al. (2021) constataram que, após a exposição ao frio, a prole masculina de ratos Wistar, filhos de mães alimentadas com uma dieta rica em frutose, teve um aumento no escurecimento do tecido adiposo branco em relação aos animais controle, que não foram programados com frutose. Esse resultado foi evidenciado por um aumento na expressão do gene *ucp-1*, nos níveis da proteína e nos focos positivos mais altos para UCP-1. Além disso, estudos *in vitro* mostraram uma menor capacidade adipogênica em células dos animais expostos à frutose pré-natal. Isso indica que a exposição pré-natal à insultos ambientais (nesse caso a frutose) programou a prole a uma maior resposta induzida pelo escurecimento do tecido adiposo branco, sob condições estimuladas, apesar de uma aparente menor capacidade termogênica basal, e que, sob estímulo adequado, as células precursoras adiposas respondem com maior atividade termogênica (ALZAMENDI et al., 2021).

6.2 Análise bioquímica

A avaliação dos efeitos da dieta materna rica em açúcares antes e durante a gestação e lactação sobre o perfil bioquímico da prole mostrou que houve aumento significativo na glicemia em jejum das fêmeas DRS, além do aumento significativo nos níveis de triglicerídeos e colesterol total, bem como do TyG de ambas as proles DRS, em comparação às prole CTR, como demonstra a Figura 10.

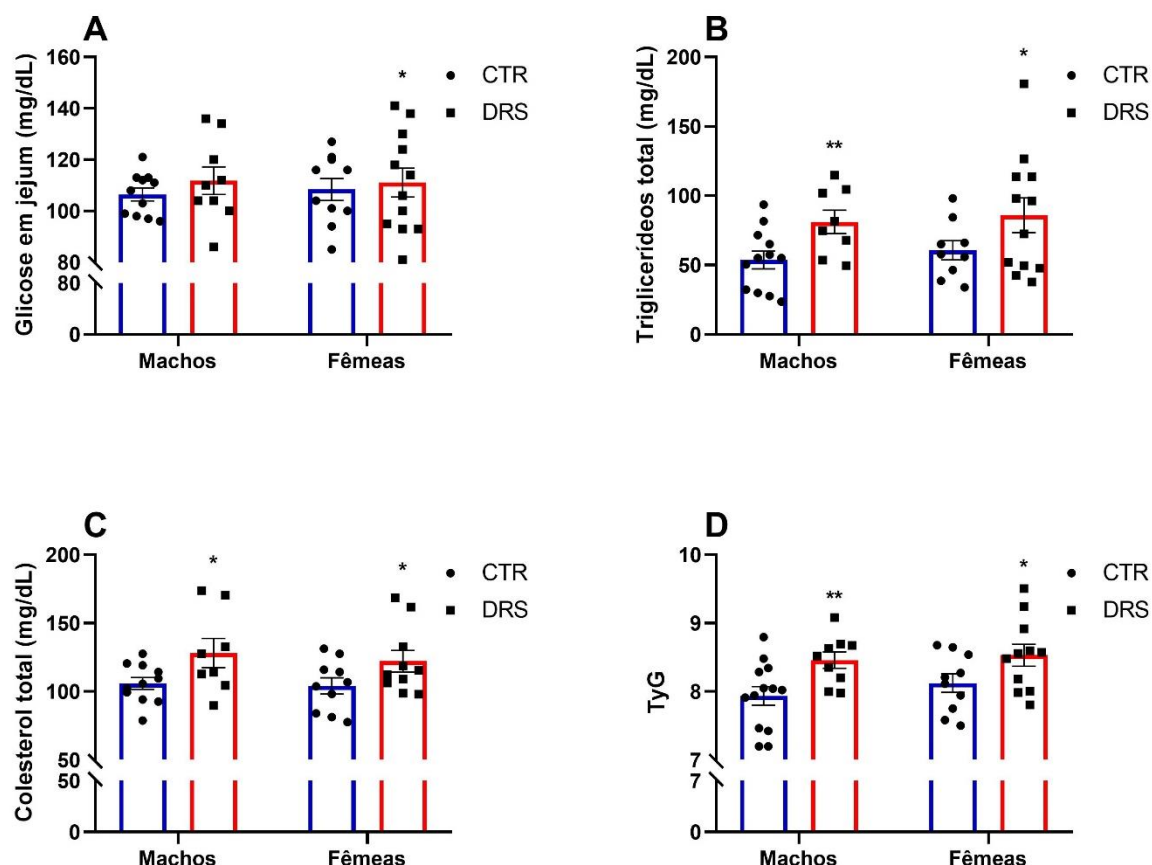


Figura 10. Parâmetros bioquímicos das proles aos 30 dias. (A): glicose em jejum; (B): triglicerídeos total; (C): colesterol total; (D): TyG. Os valores foram expressos com média $\pm$ e.p.m., sendo 13 e 9 machos dos grupos CTR e DRS, respectivamente, e 10 e 13 fêmeas nos grupos CTR e DRS, respectivamente. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle.

Um estudo avaliou a influência de uma dieta obsogênica materna de alta energia (contendo 20,5% de açúcares simples, 20,5% de polissacarídeos, 22,5% de proteínas, 20% de banha animal e 5% de gordura como macronutrientes, oferecida às mães desde o desmame até 120 dias de vida, gestação e lactação) sobre os parâmetros bioquímicos de suas proles de ratos Wistar machos e fêmeas em diferentes idades. Observaram um aumento significativo nos valores de triglicerídeos dos machos do grupo experimental, em comparação ao grupo controle, aos 36 dias de vida. Essa diferença só foi evidenciada nas fêmeas somente a partir dos 110 dias de vida, e que nos machos continuou sendo proeminente, o que demonstra um fator protetor relacionado ao sexo do animal, que parece ser mais comum nas fêmeas, mas que não foi observado no presente estudo (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2019).

Outro estudo avaliou as consequências de uma dieta obesogênica materna de alta energia (contendo 21% açúcares simples) também durante a gestação e lactação sobre os parâmetros bioquímicos na prole masculina e feminina. Constatou-se que a dieta materna aumentou a leptina, os triglicerídeos e massa gorda da prole masculina, mas não da prole do sexo feminino no dia pós-natal 36 de ratos Wistar. Extrapolando esse resultado para o presente trabalho, observa-se que os animais DRS de ambos os sexos desenvolveram hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia tão logo aos 30 dias de vida, já no final de sua infância (VEGA et al., 2015).

No mesmo estudo de Rodríguez-González et al. (2019) não foi possível observar diferenças significativas na dosagem de colesterol total e glicemia entre os dois grupos experimentais (machos e fêmeas) descendentes de mães alimentadas com a dieta obesogênica, em nenhum dos tempos analisados (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2019). Entretanto, no presente estudo observa-se um aumento significativo no colesterol total dos animais DRS em relação aos CTR, bem como um aumento significativo na glicemia em jejum das fêmeas DRS e forte tendência de aumento nos machos DRS. No que diz respeito à instauração periférica do diabetes, embasada a partir da mensuração do TyG, cálculo obtido a partir dos triglicerídeos e glicemia, foi possível observar um aumento significativo desse índice de ambas os grupos DRS, logo desde os 30 dias de vida desses animais, demonstrando o importante papel metabólico desenvolvido pela dieta rica em sacarose materna.

Outro parâmetro observado diz respeito à homeostase da glicose desses animais. Constatou-se a instauração da intolerância à glicose em ambos os sexos nos animais DRS, sendo esta perturbação observada desde a glicemia em jejum da prole fêmea, estatisticamente mais elevada no grupo DRS, quando comparada ao seu CTR, de acordo com a Figura 11.

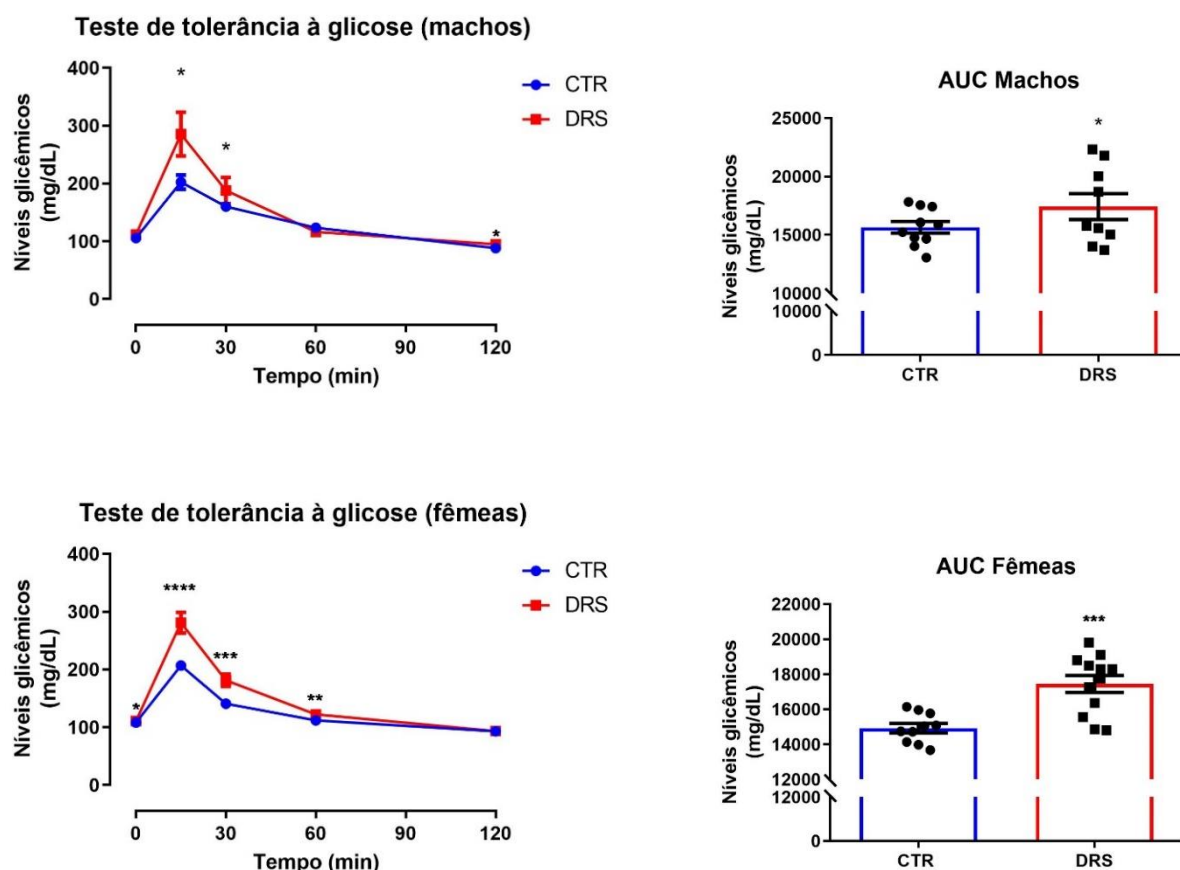


Figura 11. Teste de tolerância à glicose aos 30 dias de vida das proles CTR e DRS, fêmeas e machos, após jejum de 8h. Os valores foram expressos com média $\pm$ e.p.m., sendo 10 animais no grupo CTR e 9 animais no grupo DRS na prole de machos, e 10 e 12 animais nos grupos CTR e DRS, respectivamente, na prole de fêmeas. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle. **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle.

A dieta rica em sacarose perturbou a homeostase glicêmica tão longo na infância, o que em alguns estudos é mostrado mais tardiamente na vida. No estudo de D'alessandro et al. (2014) a resistência à insulina foi observada em ratos Wistar alimentados com dieta rica em sacarose (60%) durante os períodos intrauterino e pós-natal (durante a lactação) somente com 90 dias de idade (D'ALESSANDRO et al., 2014). Outro estudo também avaliando a resposta da prole frente a uma dieta obso-gênica materna rica em frutose (contendo 35% de carboidratos, sendo composta por 26% de frutose) durante a gestação e lactação obteve que a resposta geral à carga de glicose e a área sob a curva (AUC) calculada foi aumentada na prole masculina e feminina de ratos Wistar com 150 dias de vida (LI et al., 2020).

Além disso, o estudo de Rodríguez-González et al. (2019) já comprova que a programação fetal tida através de uma dieta obesogênica materna (dieta rica em gordura e de alto valor energético) ocorre de maneira diferente entre os sexos, acelerando o envelhecimento dos filhotes de forma dependente do sexo (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2019).

No presente estudo, observa-se que a dieta materna rica em sacarose provocou um aumento da glicemia em jejum, triglicerídeos e colesterol total dos descendentes DRS. Além disso, a dieta foi capaz de perturbar a homeostase glicídica desses animais e provocou aumento do TyG, podendo afirmar que os animais desenvolveram diabetes mellitus tipo 2 no final de sua infância. Com isso, pode-se afirmar que a dieta rica em sacarose provocou a instauração da síndrome metabólica nesses animais tão logo aos 30 dias de vida, além de uma reprogramação metabólica dependente do sexo, com peculiaridades no seu desfecho para a prole de fêmeas e machos, sendo a prole feminina a mais prejudicada metabolicamente.

6.3 Análise histológica

O fígado constitui um órgão chave no controle da homeostase glicolipídica. Em condições normais, armazena pequenas quantidades de ácidos graxos na forma de triglicerídeos (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2019). No entanto, sob certas condições fisiopatológicas, o metabolismo dos ácidos graxos hepáticos é alterado (ALVES-BEZERRA & COHEN, 2017). Essas alterações hepáticas patológicas culminam na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), que é uma doença progressiva caracterizada pelo acúmulo excessivo de triglicerídeos hepáticos e está associada à obesidade, resistência à insulina e dislipidemia (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2019).

Estudos já relatam que a obesidade materna programa o desenvolvimento de um fenótipo dismetabólico e de DHGNA na prole. Jude et al. (2010) constataram que filhotes camundongos de mães obesas à partir de uma dieta rica em gordura tiveram esse fenótipo dismetabólico, resistente à insulina e com a DHGNA, em comparação com filhos de mães magras (JUDE et al., 2010). Além disso, relatam que essa programação é criticamente dependente do período pós-natal precoce (lactação) e que possivelmente envolve alteração da sinalização dos núcleos hipotalâmicos

reguladores do apetite na prole (a partir do leite materno), que é derivado do tecido adiposo neonatal: a leptina (OBEN et al., 2010).

No presente estudo, foi realizada a análise histológica baseada na avaliação da somatória de score de três critérios: “ballooning” hepatocelular, inflamação lobular e esteatose. A partir deste score, constatou-se que os animais machos e fêmeas apresentaram aumento significativo nos três parâmetros analisados e na somatória total destes, apresentando um claro quadro de esteato-hepatite. Essa esteato-hepatite pode ser observada a partir das gotículas de gordura que se formam dentro dos hepatócitos, juntamente com a presença de focos inflamatórios. No presente estudo, é possível constatar essas duas alterações no fígado dos animais DRS, além da presença de ballooning, que é caracterizado a partir da perda de estrutura do hepatócito e descentralização do seu núcleo, justamente por conta desse acúmulo exacerbado de lipídeos em seu interior, conforme é mostrado na Figura 12 e Tabela 3.

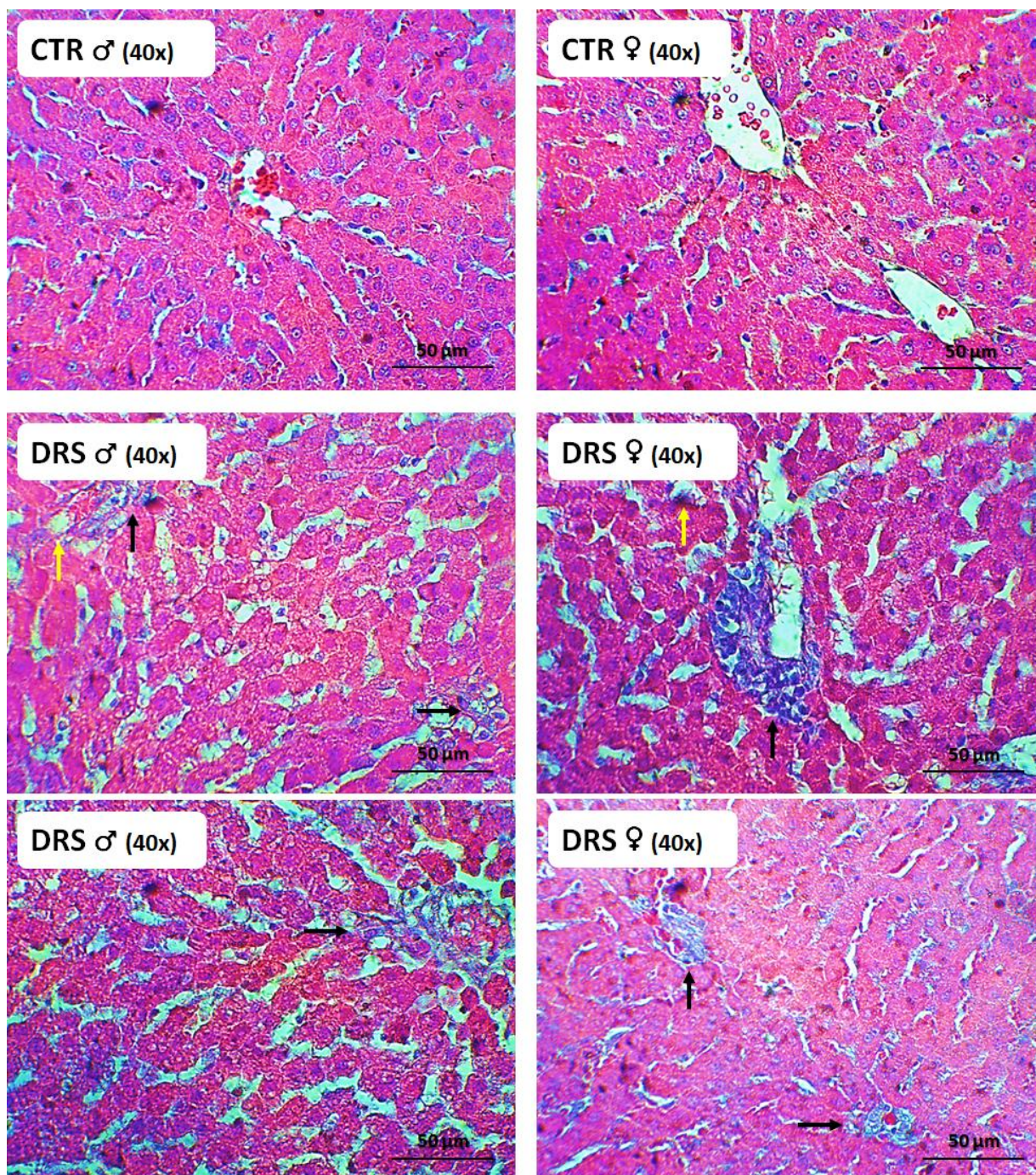


Figura 12. Imagens representativas das lâminas histológicas do fígado no aumento de 40x das proles aos 30 dias. As setas em amarelo indicam o ballooning hepatocelular e as setas em preto indicam os focos inflamatórios. Os valores foram expressos com média $\pm$ e.p.m., sendo 13 e 9 machos dos grupos CTR e DRS, respectivamente, e 10 e 13 fêmeas nos grupos CTR e DRS, respectivamente.

Tabela 3. Análise histológica do fígado das proles de machos e fêmeas aos 30 dias.

Órgãos	Grupos			
	Machos		Fêmeas	
	CTR	DRS	CTR	DRS
Esteatose	0,07±0,07	1,22±0,32***	0,60±0,26	1,53±0,33*
Ballooning	0,0±0,0	0,11±0,11*	0,0±0,0	0,15±0,10*
Inflamação	0,07±0,07	0,44±0,17*	0,20±0,13	0,69±0,13**
Total	0,23±0,12	1,77±0,40***	0,80±0,35	2,38±0,41**

Avaliação do score histológico de DHGNA dos animais. Os valores foram expressos com média ± e.p.m., sendo 13 e 9 machos dos grupos CTR e DRS, respectivamente, e 10 e 13 fêmeas nos grupos CTR e DRS, respectivamente. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. *p<0,05 quando comparado ao grupo controle. **p<0,01 quando comparado ao grupo controle. ***p<0,001 quando comparado ao grupo controle.

A exposição indireta à sacarose durante o período perinatal tem impacto significativo na massa gorda da prole e no perfil lipídico hepático. Essa exposição apenas durante o período de lactação, mas não durante o período gestacional, foi associada ao aumento da deposição de gordura visceral na prole de machos e fêmeas descendentes logo no desmame, aos 21 dias de vida. Isso sugere que a prole consumiu mais energia durante esse período, potencialmente devido ao aumento do teor de gordura e/ou energia do leite materno (TOOP et al., 2017).

Estudos demonstram que filhotes de mães obesas que consomem cronicamente uma dieta rica em gordura apresentam alterações metabólicas significativas, com acúmulo de lipídios no fígado e desenvolvimento da DHGNA. Dentre eles, o estudo de Ashino et al. (2012) relata que os filhotes machos (camundongos) adultos filhos de mães alimentadas com uma dieta rica em gordura durante a gestação e lactação exibiram aumento do peso do depósito de gordura e aumento da insulina sérica. Além disso, o teor de triglicerídeos no fígado na prole na primeira semana após o desmame (aos 28 dias de vida) e no adulto (aos 82 dias de vida) aumentou significativamente, culminando na DHGNA (ASHINO et al., 2012).

Outro estudo também relata que o consumo materno de dieta rica em gordura durante a gestação e lactação estão associados a alterações no metabolismo lipídico da prole de machos e fêmeas, aumento dos níveis de colesterol, resistência à insulina e acúmulo excessivo de triglicerídeos no fígado, de maneira específica ao

sexo, com as fêmeas sendo mais prejudicadas. Já na histologia, esta mostrou claramente grandes gotículas de gordura nas proles descendentes de mães alimentadas com a dieta rica em gordura, e a prole de fêmeas mostrou um pequeno aumento na porcentagem de gordura hepática na idade mais jovem (logo aos 36 dias de vida) e que perdurou na idade mais avançada (aos 650 dias de vida) avaliada no estudo (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2019).

Conforme pode-se observar, a mudança esteatogênica que leva à DHGNA adulta é desencadeada por fatores desde o período pré-natal. A dieta desregulada da mãe e as comorbidades determinam um aumento do fluxo de lipídios transplacentários e através do leite materno, levando à sobrecarga lipídica fetal. Esses lipídios fetais são armazenados somente nos hepatócitos, uma vez que o tecido adiposo fetal ainda é incapaz de armazenar os mesmos. Além disso, a inflamação placentária e a hipóxia geradas pela resistência à insulina materna e pela obesidade são transferidas diretamente para o fígado fetal, através do sangue do cordão umbilical, levando à inflamação hepática tão logo durante a gestação (VALENTINI et al., 2022).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o crescente aumento de pessoas com obesidade, em proporções epidêmicas e acometendo cada vez mais crianças e jovens, faz-se necessária uma mudança imediata de hábitos alimentares e de vida. Esse aumento crescente é acompanhado proporcionalmente com o aumento no consumo de alimentos ultraprocessados e bebidas açucaradas. O presente estudo tem como caráter inovador a utilização de uma dieta rica em sacarose com proporções semelhantes e de caráter fisiológico às dietas utilizadas pela população ocidental. Além disso, demonstra as consequências desse consumo desenfreado de açúcar, sobretudo durante a gestação e lactação, e a reprogramação metabólica causada na prole por conta desse consumo indireto através da mãe.

As principais evidências tidas a partir desse consumo indireto é o prejuízo significativo na homeostase glicolipídica dos descendentes. A clara intolerância à glicose, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e aumento do TyG culminaram no desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 e consequente instauração da síndrome metabólica tão logo na infância tardia desses animais. Além disso, o aumento da esteatose, inflamação e “ballooning” no fígado desses animais culminam na esteato-hepatite, estágio antecessor da cirrose hepática e logo depois do câncer hepatocelular.

Apesar disso, são necessárias maiores investigações acerca dos mecanismos pelo qual a dieta rica em sacarose atua, principalmente em relação ao esclarecimento da reprogramação metabólica dependente do sexo, para que, assim, possa se fazer intervenções dietéticas no intuito de proteger o organismo em desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

ABARCA-GÓMEZ L. (NCD Risk Factor Collaboration - NCD-RisC). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128· 9 million children, adolescents, and adults. *The Lancet*, 390: 2627-2642; 2017.

ALBERTI KGMM, ECKEL RH, GRUNDY SM, ZIMMET PZ, CLEEMAN JI, DONATO KA, FRUCHART JC, JAMES WPT, LORIA CM, SMITH SC. 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*, 120: 1640-1645; 2009.

ALVES-BEZERRA M & COHEN DE. Triglyceride metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*, 8 (1): 1-8; 2017.

ALZAMENDI A, MIGUEL I, ZUBIRÍA MG, GAMBARO SE, SPINEDI E, GIOVAMBATTISTA A. Maternal high fructose diet exacerbates white adipose tissue thermogenic process in offspring upon exposure to cold temperature. *Life Sciences*, 287: 120066; 2021.

ASHINO NG, SAITO KN, SOUZA FD, NAKUTZ FS, ROMAN EA, VELLOSO LA, TORSONI AS, TORSONI MA. Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. *The Journal of nutritional biochemistry*, 23 (4): 341-348; 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA. Diretrizes brasileiras de obesidade: 4ª ed. São Paulo; 2016.

BACHMAN ES, DHILLON H, ZHANG CY, CINTI S, BIANCO AC, KOBILKA BK, LOWELL BB. β AR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science*, 297 (5582): 843-845; 2002.

BADILLO-SUÁREZ PA, RODRÍGUEZ-CRUZ M, NIEVES-MORALES X. Impact of metabolic hormones secreted in human breast milk on nutritional programming in childhood obesity. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 22: 171-191; 2017.

BARKER DJ, OSMOND C, GOLDING J, KUH D, WADSWORTH ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *Bmj*, 298 (6673): 564-567; 1989.

BAY JL, MORA HA, SLOBODA DM, MORTON SM, VICKERS MH, GLUCKMAN PD. Adolescent understanding of DOHaD concepts: a school-based intervention to support knowledge translation and behaviour change. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 3: 469-482; 2012.

BAY JL, VICKERS MH. Adolescent education: an opportunity to create a Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) circuit breaker. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 7: 501-504; 2016.

BENEVIDES ROA, VALE CC, FONTELLES JLL, FRANÇA LM, TEÓFILO TS, SILVA SN, PAES AMA, GASPAR RS. *Syzygium cumini* (L.) Skeels improves metabolic and ovarian parameters in female obese rats with malfunctioning hypothalamus-pituitary-gonadal axis. *Journal of Ovarian Research*, 12: 13-22; 2019.

BERNARDIS LL, PATTERSON BD. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *Journal of Endocrinology*, 40 (4): 527-528; 1968.

Brasil. Vigitel Brasil 2018: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2018. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/25/vigitel-brasil-2018.pdf>>.

BROWN CM, DULLOO AG, MONTANI JP. Sugary drinks in the pathogenesis of obesity and cardiovascular diseases. *International Journal of Obesity*, 32: S28-S34; 2008.

BUTRUILLE L, MAROUSEZ L, POURPE C, OGER F, LECOUTRE S, CATHELINE D, GÖRS S, METGES CC, GUINEZ C, LABORIE C, DERUELLE P, EECKHOUTE J, BRETON C, LEGRAND P, LESAGE J, EBERLÉ D. Maternal high-fat diet during suckling programs visceral adiposity and epigenetic regulation of adipose tissue stearoyl-CoA desaturase-1 in offspring. *International Journal of Obesity*, 43 (12): 2381-2393; 2019.

CHOI SH, GINSBERG HN. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22: 353-363; 2011.

CLARO RM, SANTOS MAS, OLIVEIRA TP, PEREIRA CA, SZWARCOWALD CL, MALTA DC. Consumo de alimentos não saudáveis relacionados a doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 24 (2): 257-265; 2015.

D'ALESSANDRO ME, OLIVA ME, FORTINO MA, CHICCO A. Maternal sucrose-rich diet and fetal programming: changes in hepatic lipogenic and oxidative enzymes and glucose homeostasis in adult offspring. *Food & function*, 5 (3): 446-453; 2014.

DEARDEN L, OZANNE SE. Early life origins of metabolic disease: Developmental programming of hypothalamic pathways controlling energy homeostasis. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 39: 3-16; 2015.

DE LIMA FJ, CORREIA LCV, DE ALMEIDA BB, DA COSTA LAS, CRISCI AR. Efeitos do decanoato de nandrolona na função sexual de ratos Wistar. *Biológicas & Saúde*, 8 (27): 18-26; 2018.

DE PEDIATRÍA SA. Concepto de Developmental Origins of Health and Disease: El ambiente en los primeros mil días de vida y su asociación con las enfermedades no transmisibles. *Arch Argent Pediatr*, 118 (4): S118-S129; 2020.

ELLIOTT SS, KEIM NL, STERN JS, TEFF K, HAVEL PJ. Fructose, weight gain and insulin resistance syndrome. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76 (5): 911-922; 2002.

ELLSWORTH L, HARMAN E, PADMANABHAN V, GREGG B. Lactational programming of glucose homeostasis: a window of opportunity. *Reproduction*, 156: R23-R42; 2018.

ENGIN A. The definition and prevalence of obesity and metabolic syndrome. In: *Obesity and Lipotoxicity*. Springer: Cham: 1-17; 2017.

FLISTER KFT, PINTO BAS, FRANÇA LM, COELHO CFF, DOS SANTOS PC, VALE CC, KAJIHARA D, DEBBAS V, LAURINDO FRM, PAES AMA. Long-term exposure to high-sucrose diet downregulates hepatic endoplasmic reticulum-stress adaptive pathways and potentiates *de novo* lipogenesis in weaned male mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 62:155-166 2018.

FRANÇA LM, DOS SANTOS PC, BARROSO WA, GONDIM RSD, COELHO CFF, FLISTER KFT, PAES AMA. 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*, 11 (5): 509-520; 2020.

GASPAR RS, BENEVIDES ROA, FONTELLES JLL, VALE CC, FRANÇA LM, BARROS PTS, PAES AMA. Reproductive alterations in hyperinsulinemic but normoandrogenic MSG-obese female rats. *Journal of Endocrinology*, 229: 61-72; 2016.

GIBSON S, GUNN P, WITTEKIND A, COTTRELL R. The effects of sucrose on metabolic health: a systematic review of human intervention studies in healthy adults. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53 (6): 591-614; 2013.

GIORDANO C, BENYSHEK DC. DOHaD research with populations in transition: a case study of prenatal diet remote recall with Yup'ik Alaskan women. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 6 (2): 79-87; 2015.

HALES CN, BARKER DJP. The thrifty phenotype hypothesis: Type 2 diabetes. *British Medical Bulletin*, 60 (1): 5-20; 2001.

HAMANN A, FLIER JS, LOWELL BB. Decreased brown fat markedly enhances susceptibility to diet-induced obesity, diabetes, and hyperlipidemia. *Endocrinology*, 137(1): 21-29; 1996.

HIRSHFIELD NA, MIDGLEY JR AR. Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biology of Reproduction*, 19 (3): 597-605; 1978.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). Atlas de Diabetes, 10ª edição, 2021. Disponível em: < <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/> >.

JOHNSON RJ, SEGAL MS, SAUTIN Y, NAKAGAWA T, FEIG DI, KANG DH, GERSCH MS, BENNER S, SÁNCHEZ-LOZADA LG. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86 (4): 899-906; 2007.

KLEINER DE, BRUNT EM, NATTA MV, BEHLING C, CONTOS MJ, CUMMINGS OW, FERRELL LD, LIU YC, TORBENSON MS, UNALP-ARIDA A, YEH M, MCCULLOUGH AJ, SANYAL AJ. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41 (6): 1313-1321; 2005.

KUMAR MV, SUNVOLD GD, SCARPACE PJ. Dietary vitamin A supplementation in rats: suppression of leptin and induction of UCP1 mRNA. *Journal of lipid research*, 40 (5): 824-829; 1999.

LANGER P. The phases of maternal investment in eutherian mammals. *Zoology*, 111 (2): 148-162; 2008.

LARQUÉ E, PAGÁN A, PRIETO MT, BLANCO JE, Gil-Sánchez A, Zornoza-Moreno M, Ruiz-Palacios M, Gázquez A, Demmelmair H, Parrilla JJ, Koletzko B. Placental fatty acid transfer: a key factor in fetal growth. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 64: 247-253; 2014.

LEE WC, WU KLH, LEU S, TAIN YL. Translational insights on developmental origins of metabolic syndrome: Focus on fructose consumption. *Biomedical journal*, 41 (2): 96-101; 2018.

LEVY RB, CLARO RM, BANDONI DH, MONDINI L, MONTEIRO CA. Disponibilidade de "açúcares de adição" no Brasil: distribuição, fontes alimentares e tendência temporal. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 15 (1): 3-12; 2012.

LI M, REYNOLDS CM, GRAY C, PATEL R, SLOBODA DM, VICKERS MH. Long-term effects of a maternal high-fat: High-fructose diet on offspring growth and metabolism and impact of maternal taurine supplementation. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 11 (4): 419-426; 2020.

LONARDO A, Sookoian S, Pirola CJ, Targher G et al. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of cardiovascular disease. *Metabolism*, 65 (8): 1136-1150; 2016.

MARCONDES FK, BIANCHI FJ, TANNO AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian journal of biology*, 62 (4): p. 609-614; 2002.

MARINCOLA FC, DESSÌ A, CORBU S, REALI A, FANOS V. Clinical impact of human breast milk metabolomics. *Clinica Chimica Acta*, 451: 103-106; 2015.

MAROUSEZ L, LESAGE J, EBERLÉ D. Epigenetics: Linking Early Postnatal Nutrition to Obesity Programming?. *Nutrients*, 11 (12): 2966-2988; 2019.

MARTIN-GRONERT MS, OZANNE SE. Mechanisms underlying the developmental origins of disease. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 13: 85-92; 2012.

MARTIN-GRONERT MS, OZANNE SE. Early life programming of obesity. *Developmental Period Medicine*, 17 (1): 7-12; 2013.

MICHA R, MOZAFFARIAN D. Saturated fat and cardiometabolic risk factors, coronary heart disease, stroke, and diabetes: a fresh look at the evidence. *Lipids*, 45 (10): 893-905; 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sobre a Vigilância de DCNT; 2019. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/noticias/43036-sobre-a-vigilancia-de-dcnt>>.

MONTEIRO CA, Cannon G, Moubarac JC, LEVY RB, LOUZADA MLC, JAIME PC. The UN Decade of Nutrition, the NOVA food classification and the trouble with ultra-processing. *Public Health Nutrition*, 21 (1): 5-17; 2018.

MURANISHI Y, PARRY L, AVEROUS J, TERRISSE A, MAURIN AC, CHAVEROUX C, MESCLON F, CARRARO V, BRUHAT A, FAFOURNOUX P, JOUSSE C. Method for collecting mouse milk without exogenous oxytocin stimulation. *Biotechniques*, 60 (1): 47-49; 2016.

NEEL JV. Diabetes mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? *American journal of human genetics*, 14 (4): 353; 1962.

NEEL JV. The “thrifty genotype” in 1998. *Nutrition Reviews*, 57 (5): S2-S9; 1999.

NEWENS KJ, WALTON J. A review of sugar consumption from nationally representative dietary surveys across the world. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 29 (2): 225-240; 2016.

OBEN JA et al. Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Journal of hepatology*, 52 (6): 913-920; 2010.

OBERMANN-BORST SA, EILERS PHC, TOBI EW, DE JONG FH, SLAGBOOM PE, HEIJMANS BT, STEEGERS-THEUNISSEN RPM. Duration of breastfeeding and gender are associated with methylation of the LEPTIN gene in very young children. *Pediatric research*, 74 (3): 344-349; 2013.

OOI DSQ, TAN CPT, TAY MJY, ONG SG. Developmental Origins of Health and Disease: Impact of environmental dust exposure in modulating microbiome and its association with non-communicable diseases. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, p. 1-12, 2020.

PADMANABHAN V, CARDOSO RC, PUTTABYATAPPA M. Developmental programming, a pathway to disease. *Endocrinology*, 157 (4): 1328-1340; 2016.

PATEL MS, SRINIVASAN M. Metabolic programming due to alterations in nutrition in the immediate postnatal period. *The Journal of Nutrition*, 140 (3): 658-661; 2010.

PATTI ME. Intergenerational programming of metabolic disease: evidence from human populations and experimental animal models. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70: 1597-1608; 2013.

PAUL HA, HALLAM MC, REIMER RA. Milk collection in the rat using capillary tubes and estimation of milk fat content by creamatocrit. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 106 (e53476): 1-6; 2015.

PICUT CA, DIXON D, SIMONS ML. Postnatal ovary development in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. *Toxicologic pathology*, 43 (3): 343-353; 2015.

PINTO BAS, MELO TM, FLISTER KFT, FRANÇA LM, KAJIHARA D, TANAKA LY, LAURINDO FRM, PAES AMA. Early and sustained exposure to high-sucrose diet triggers hippocampal ER stress in young rats. *Metabolic Brain Disease*, 31: 917-927; 2016.

PIPREK RP. Methods for the Study of Gonadal Development. In: *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development*, Springer: 58: 383-426; 2016.

POILEY SM. A systematic method of breeder rotation for non-inbred laboratory animals colonies. In: *Proc. Anim. Care Panel*, 10 (10): 159-166; 1960.

POPKIN BM, ADAIR LS, NG SW. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutrition reviews*, 70 (1): 3-21; 2012.

RABADÁN-DIEHL C, NATHANIELSZ P. From Mice to Men: research models of developmental programming. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 4 (1): 3-9; 2013.

RAFACHO A, ABRANTES JLF, RIBEIRO DL, PAULA FM, PINTO ME, BOSCHERO AC, BOSQUEIRO JR. Morphofunctional alterations in endocrine pancreas of short-and long-term dexamethasone-treated rats. *Hormone and Metabolic Research*, 43: 275-281; 2011.

RAMON-KRAUEL M et al. Epigenetic programming at the Mogat1 locus may link neonatal overnutrition with long-term hepatic steatosis and insulin resistance. *The FASEB Journal*, 32 (11): 6025-6037; 2018.

RAVELLI GP, STEIN ZA, SUSSER MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *New England Journal of Medicine*, 295 (7): 349-353; 1976.

RIPPE JM, ANGELOPOULOS TJ. Sucrose, high-fructose corn syrup, and fructose, their metabolism and potential health effects: what do we really know?. *Advances in Nutrition*, 4 (2): 236-245; 2013.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ GL, CASTRO-RODRÍGUEZ DC, ZAMBRANO E. Pregnancy and lactation: a window of opportunity to improve individual health. In: *Investigations of Early Nutrition Effects on Long-Term Health*. Humana Press, 1735: 115-144; 2018.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ GL, REYES-CASTRO LA, BAUTISTA CJ, BELTRÁN AA, IBÁÑEZ CA, VEGA CC, LOMAS-SORIA C, CASTRO-RODRÍGUEZ DC, ELÍAS-LÓPEZ AL, NATHANIELSZ PW, ZAMBRANO E. Maternal obesity accelerates rat offspring metabolic ageing in a sex-dependent manner. *The Journal of physiology*, 597 (23): 5549-5563; 2019.

SHERWOOD WB, BION V, LOCKETT GA, ZIYAB AH, SOTO-RAMÍREZ N, MUKHERJEE N, KURUKULAARATCHY RJ, EWART S, ZHANG H, ARSHAD SH, KARMAUS W, HOLLOWAY JW, REZWAN FI. Duration of breastfeeding is associated with leptin (LEP) DNA methylation profiles and BMI in 10-year-old children. *Clinical epigenetics*, 11 (1): 128-137; 2019.

SHOU J, BULL CM, LI L, QIAN HR, WEI T, LUO S, PERKINS D, SOLENBERG PJ, TAN SL, CHEN XYC, ROEHM NW, WOLOS JA, ONYIA JE. Identification of blood biomarkers of rheumatoid arthritis by transcript profiling of peripheral blood mononuclear cells from the rat collagen-induced arthritis model. *Arthritis Research & Therapy*, 8 (1): R28; 2006.

SIMENTAL-MENDÍA LE, RODRÍGUEZ-MORÁN M, GUERRERO-ROMERO F. The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. *Metabolic syndrome and related disorders*, 6 (4): 299-304; 2008.

SINTON MC, HAY DC, DRAKE AJ. Metabolic control of gene transcription in non-alcoholic fatty liver disease: the role of the epigenome. *Clinical Epigenetics*, 11 (1): 1-12; 2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 84: Suplemento I; 2005.

SOUSA RML, RIBEIRO NLX, PINTO BAS, SANCHES JR, DA SILVA MU, CÔELHO CFF, FRANÇA LM, FIGUEIREDO NETO JÁ, PAES AMA. Long-term high-protein diet intake reverts weight gain and attenuates metabolic dysfunction on high-sucrose-fed adult rats. *Nutrition & Metabolism*, 15: 53; 2018.

TAIN YL, CHAN JYH, HSU CN. Maternal fructose intake affects transcriptome changes and programmed hypertension in offspring in later life. *Nutrients*, 8 (12): 757; 2016.

TAPPY L, LÊ KA, TRAN C, PAQUOT N. Fructose and metabolic diseases: New findings, new questions. *Nutrition*, 26 (11-12): 1044-1049; 2010.

TARRADE A et al. Sexual dimorphism of the feto-placental phenotype in response to a high fat and control maternal diets in a rabbit model. *PloS one*, 8 (12): e83458; 2013.

TARRADE A, PANCHENKO P, JUNIEN C, GABORY A. Placental contribution to nutritional programming of health and diseases: epigenetics and sexual dimorphism. *Journal of Experimental Biology*, 218 (1): 50-58; 2015.

TOOP CR, MUHLHAUSLER BS, O'DEA K, GENTILI S. Impact of perinatal exposure to sucrose or high fructose corn syrup (HFCS-55) on adiposity and hepatic lipid composition in rat offspring. *The Journal of physiology*, 595 (13): 4379-4398; 2017.

VALENTINI F, ROCCHI G, VESPASIANI-GENTILUCCI U, GUARINO MPL, ALTOMARE A, CAROTTI S. The Origins of NAFLD: The Potential Implication of Intrauterine Life and Early Postnatal Period. *Cells*, 11 (3): 562; 2022.

VEGA CC, REYES-CASTRO LA, BAUTISTA CJ, LARREA F, NATHANIELSZ PW, ZAMBRANO E. Exercise in obese female rats has beneficial effects on maternal and male and female offspring metabolism. *International journal of obesity*, 39 (4): 712-719; 2015.

VERDUCI E, BANDERALI G, BARBERI S, RADAELLI G, LOPS A, BETTI F, RIVA E, GIOVANNINI M. Epigenetic effects of human breast milk. *Nutrients*, 6 (4): 1711-1724; 2014.

WARNER MJ, OZANNE SE. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochemical Journal*, 427 (3): 333-347; 2010.

WELLS, JCK. Adaptive variability in the duration of critical windows of plasticity: implications for the programming of obesity. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2014 (1): 109-121; 2014.

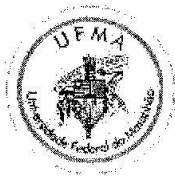
WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guideline: sugars intake for adults and children. World Health Organization; 2015. Disponível em: <https://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sugars_intake/en/>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight; 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> >.

YOUNOSSI ZM, ANSTEE QM, MARIETTI M, HARDY T, HENRY L, ESLAM M, GEORGE J, BUGIANESI E. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 15: 11-20; 2018.

YOUNOSSI ZM. Non-alcoholic fatty liver disease—A global public health perspective. *Journal of Hepatology*, 70 (3): 531-544; 2019.

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
CIAEP: 01.0341.2014



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: "INTRODUÇÃO DIETÉTICA PRECOCE DE AÇÚCARES DE ADIÇÃO E SUA CORRELAÇÃO COM A INICIAÇÃO E PROGRESSÃO DA SÍNDROME METABÓLICA E SUAS COMORBIDADES", Processo nº 23115.038755/2018-22, sob a responsabilidade da 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 30/11/2018.

We certify that the proposal: "EARLY DIETARY INTRODUCTION OF ADDED SUGARS AND ITS CORRELATION WITH THE INITIATION AND PROGRESS OF METABOLIC SYNDROME AND THEIR COMORBITIES", Processo n. 23115.038755/2018-22, under the responsibility of Prof. Dr. Antonio Marcus 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 11/30/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa **Área:** Ciências da Saúde

Vigência da Proposta: 16/12/2019 a 16/12/2022.

Origem: Biotério Central da UFMA

Amostra

Espécie:	Ratos (<i>Rattus norvegicus</i>)	Sexo:	Fêmeas	Idade:	75 - 90 dias	30 (10)
				Peso:	200-250 g	
Linhagem/Raça:	Wistar		Machos	Idade:	75 - 90 dias	30 (10)
				Peso:	250-350 g	

Local do experimento: Biotério setorial da Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS/UFMA.

São Luís, 16 de dezembro de 2019.

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho
Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais - CEUA/UFMA

Research Article

***Syzygium cumini* Leaf Extract Reverts Hypertriglyceridemia via Downregulation of the Hepatic XBP-1s/PDI/MTP Axis in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Rats**

Lucas Martins França ¹, Caio Fernando Ferreira Coelho,¹ Larissa Nara Costa Freitas,¹ Ivana Letícia Santos Souza,¹ Vinicyus Teles Chagas,¹ Victor Debbas,² Thais Martins de Lima,³ Heraldo Possolo de Souza,³ Francisco Rafael Martins Laurindo,² and Antonio Marcus de Andrade Paes ¹

¹Laboratory of Experimental Physiology (LeFisio), Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966-Cidade Universitária Dom Delgado, São Luís, MA 65080-805, Brazil

²Laboratory of Vascular Biology (LBV), Heart Institute, School of Medicine, University of São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44-Cerqueira César, São Paulo, SP 05403-900, Brazil

³Laboratory of Medical Investigation (LIM-51), Emergency Medicine Department, School of Medicine, University of São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455-Cerqueira César, São Paulo, SP 01246-903, Brazil

Correspondence should be addressed to Antonio Marcus de Andrade Paes; marcuspaes@ufma.br

Received 30 November 2018; Revised 11 January 2019; Accepted 5 February 2019; Published 20 March 2019

Guest Editor: Mohamed M. Abdel-Daim

Copyright © 2019 Lucas Martins França et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Syzygium cumini is used worldwide for the treatment of metabolic syndrome-associated outcomes. Previously, we described the antihypertriglyceridemic effect of the hydroethanolic extract of *S. cumini* leaf (HESc) in monosodium L-glutamate- (MSG-) induced obese rats. This study sought to investigate the molecular mechanisms underlying the antihypertriglyceridemic effect of HESc in MSG-obese rats. Newborn male Wistar rats were injected subcutaneously with MSG (4.0 g/kg/day, obese group) or saline 1.25% (1.0 mL/kg/day, lean group), from 2nd through 10th postnatal day. At 8 weeks old, obese rats started to be orally treated with HESc (0.5 or 1.0 g/kg/day, $n = 7$) or saline 0.9% (1 mL/kg/day, $n = 7$). Lean rats received saline solution (1 mL/kg/day, $n = 7$). Upon 8-week treatment, animals were euthanized for blood and tissue collection. Another set of adult nonobese Wistar rats was used for the assessment of HESc acute effects on Triton WR1339-induced hypertriglyceridemia. HESc reduced weight gain, as well as adipose tissue fat pads, without altering food intake of obese rats. HESc restored fasting serum glucose, triglycerides, total cholesterol, and free fatty acids, as well as insulin sensitivity, to levels similar to lean rats. Additionally, HESc halved the triglyceride content into very low-density lipoprotein particles, as well as healed liver steatosis, in obese rats. Hepatic protein expression of the endoplasmic reticulum chaperone GRP94 was decreased by HESc, which also downregulated the hepatic triglyceride secretion pathway by reducing the splicing of X-box binding protein 1 (XBP-1s), as well as protein disulfide isomerase (PDI) and microsomal triglyceride transfer protein (MTP) translational levels. This action was further corroborated by the acute inhibitory effect of HESc on triglyceride accumulation on Triton WR1339-treated rats. Our data support the downregulation of the XBP-1s/PDI/MTP axis in the liver of MSG-obese rats as a novel feasible mechanism for the antihypertriglyceridemic effect promoted by the polyphenolic phytocomplex present in *S. cumini* leaf.

1. Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is considered the main hepatic manifestation of metabolic syndrome (MetS)

[1]. Under MetS, white adipose tissue hypertrophy causes local insulin resistance that, in turn, increases adipocyte lipolytic activity and decreases local free fatty acid (FFA) recycling, raising serum FFA levels. Increased FFA uptake by hepatocytes

Cite this: *Food Funct.*, 2021, **12**, 3586

Myricetin improves metabolic outcomes but not cognitive deficit associated to metabolic syndrome in male mice

Caio Fernando Ferreira Coelho,^a Ivana Letícia Santos Souza,^a
Vinícius Teles Chagas,^{a,b} Nathalee Liberal Xavier Ribeiro,^a
Bruno Araújo Serra Pinto,^{a,c} Lucas Martins França^{b,c} and
Antonio Marcus de Andrade Paes^{b,c}✉

Myricetin is a flavonol highly prevalent in edible vegetables and fruits, with recognized hypoglycemic and anti-obesity effects, besides great antioxidant capacity. Thus, this study sought to investigate whether myricetin is able to improve metabolic and behavioral outcomes found in monosodium L-glutamate (MSG) obese mice, a model of metabolic syndrome characterized by early hyperinsulinemia associated to obesity, dyslipidemia, hepatic steatosis, anxiety and cognitive deficit. Newborn male mice received MSG (4 mg kg⁻¹ day⁻¹, s.c.) on alternate days during the first 10 days of life for obesity induction, while control pups received equimolar saline solution. From postnatal day 90 to 135, MSG mice were orally treated with myricetin (50 mg kg⁻¹ day⁻¹) or distilled water, while control animals received vehicle. During the last week of treatment, all groups were submitted to behavioral tests: open field maze, elevated plus maze and Morris water maze. At the end of treatment, animals were euthanized for collection of liver, serum and adipose tissue fat pads. Myricetin treatment reduced the elevated serum levels of glucose and triglycerides, typically found in MSG mice, as well as restored peripheral insulin sensitivity and liver steatosis. Moreover, myricetin ameliorated the lack of thigmotaxis and exploratory behavior, but did not improve the cognitive deficit presented by MSG mice. Therefore, this study contributes to the pharmacological validation of myricetin as an affordable and healthy therapeutic adjuvant for the treatment of metabolic syndrome and most of its comorbidities.

Received 7th January 2021

Accepted 24th March 2021

DOI: 10.1039/d1fo00073j

rsc.li/food-function

1. Introduction

Obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM) have emerged as epidemic diseases worldwide.^{1,2} Usually, obesity may lead to T2DM, and these two entities comprise diagnostic criteria for metabolic syndrome (MetS), alongside fasting hyperglycemia, dyslipidemia and hypertension.³ MetS may unleash other comorbidities not comprised in its current definition, such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), mild cognitive deficit and Alzheimer's disease (AD).^{4,5} Indeed, obesity is

related to mood disorders, since overweight can lead to neuroinflammation and anxiety/depressive symptoms.⁶ Consequently, MetS patients are usually subjected to polypharmacy regimens, which bring worse side effects and elevated costs to public health system.⁷

For their multitarget properties, flavonoids have been proposed as therapeutic adjuvants in MetS.⁸ Unique flavonoids have been identified as secondary metabolites present in different parts of edible plants, occurring in either glycoside or aglycone forms.⁹ These compounds can scavenge reactive oxygen species and enhance endogenous antioxidant defenses, attenuating lipoperoxidation-derived cell damage. They represent a large family of low-molecular weight polyphenols and are classified into six subclasses: flavonols, flavones, isoflavones, flavanones, anthocyanidins, and flavanols.¹⁰ Among them, flavonols display the strongest scavenger activity, and are reported to have biological beneficial effects, such as anti-inflammatory, anti-obesity and hypoglycemic.⁸ Quercetin and kaempferol are flavonols consistently studied as co-adjuvants for MetS-comorbidities therapy.¹¹ However, other com-

^aLaboratory of Experimental Physiology, Health Sciences Graduate Program, Federal University of Maranhão, 1966, São Luís, MA, 65080-805, Brazil. E-mail: marcuspaes@ufma.br

^bDepartment of Morphological Sciences, Federal University of Maranhão, 1966, São Luís, MA, 65080-805, Brazil

^cDepartment of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, 1966, São Luís, MA, 65080-805, Brazil

† Current address: Development and Plasticity of the Neuroendocrine Brain, Lille Neuroscience & Cognition, Inserm, University of Lille, CHU Lille, UMR-S 1772, Bâtiment Bisert, 1 place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France.

ANEXO D



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CIAEP: 02.0341.2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO



CERTIFICADO*

Certificamos que a proposta intitulada: **"INTRODUÇÃO DIETÉTICA PRECOCE DE AÇÚCARES DE ADIÇÃO E SUA CORRELAÇÃO COM A INICIAÇÃO E PROGRESSÃO DA SÍNDROME METABÓLICA E SUAS COMORBIDADES"**, Processo nº 23115.038755/2018-22, sob a responsabilidade da **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 30/11/2018.

We certify that the proposal: **"EARLY DIETARY INTRODUCTION OF ADDED SUGARS AND ITS CORRELATION WITH THE INITIATION AND PROGRESS OF METABOLIC SYNDROME AND THEIR COMBORITIES"**, Process n. 23115.038755/2018-22, under the responsibility of **Prof. Dr. Antonio Marcus 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 11/30/2018.

PROPOSTA

Finalidade: Pesquisa **Área:** Ciências da Saúde
Vigência: 05/07/2021 a 05/07/2022

ANIMAIS

Origem: Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão

Espécie: Ratos
(*Rattus norvegicus*)
Wistar

Sexo: Machos **Idade:** 60 dias
Peso: 250 - 350g

Sexo: Fêmeas **Idade:** 60 dias
Peso: 250 - 350g

AMOSTRA

30

+ 10*

30

+ 10*

* Aditivo de Animais



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CIAEP: 02.0341.2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO



Local do experimento: Biotério setorial da Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS/UFMA.

São Luís, 29 de julho de 2021.

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMA



Documento assinado digitalmente
Rafael Cardoso Carvalho
Data: 29/07/2021 10:36:20-0300
Verifique em <https://verificador.jf.br>