

**TANYARA BALIANI PAYOLLA**

**A exposição pré-natal à dexametasona exacerba os  
efeitos da frutose sobre o metabolismo lipídico  
hepático**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutor em Ciências.

São Paulo

2019

**TANYARA BALIANI PAYOLLA**

**A exposição pré-natal à dexametasona exacerba os  
efeitos da frutose sobre o metabolismo lipídico  
hepático**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia e Biofísica

Orientador(a): Silvana Bordin

Versão Original

São Paulo

2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Baliani Payolla, Tanyara

A exposição pré-natal à dexametasona exacerba os efeitos da frutose sobre o metabolismo lipídico hepático / Tanyara Baliani Payolla; orientador Silvana Auxiliadora Bordin. -- São Paulo, 2019.  
77 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Frutose. 2. Glicocorticoides. 3. Programação Metabólica. 4. Síndrome metabólica. I. Auxiliadora Bordin, Silvana, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Tanyara Baliani Payolla

Titulo da Dissertação/Tese: A exposição pré-natal à dexametasona exacerba os efeitos da frutose sobre o metabolismo lipídico hepático.

Orientador: Silvana Bordin

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000  
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.084/2015

## DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 100/14/CEUA, datado de 10/11/2014, e por solicitação da Profa. Dra. **Silvana Auxiliadora Bordin da Silva**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Tanyara Baliani Payolla** ao Projeto de Pesquisa "*Adaptações metabólicas induzidas por glicocorticóide na gestação*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 25 de setembro de 2015.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes  
Coordenador da CEUA-ICB/USP

*“Deus é a minha salvação,  
Terei confiança e não temerei.  
O Senhor, sim, o Senhor  
É a minha força e o meu cântico;  
Ele é a minha salvação”  
Isaías 12:2*

*A Deus e a minha família mãe (Luzia), pai (Arildo) e esposo  
(Andre) que me apoiaram e nunca desistiram de mim*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço pelas alegrias, tristezas, acertos e erros e também as dificuldades porque tudo isso me fez crescer e chegar até aqui.

Em primeiro lugar agradeço a Deus. Por todas as orações respondidas, por ter estado ao meu lado em todos os momentos e por ter me dado muitas oportunidades de crescimento humano e profissional durante estes anos.

Ao meu marido Andre Bocatto Payolla. Sou grata pelo amor, paciência, apoio, planos, sonhos, conquistas e derrotas que foram compartilhados e todas as orações que fizemos em prol um do outro. Muito obrigada pelas caronas bem cedinho (05:00 da manhã e tarde da noite 23:00), por todas as frases de incentivo e principalmente por estar ao meu lado nos momentos de saúde, felicidade, problemas, doença...

A minha orientadora Silvana Bordin. Obrigada por ter me tratado muito bem desde o início que eu cheguei em São Paulo, pelas palavras de incentivo, por todas as colaborações e momentos de alegria (incluindo as festividades do laboratório). Agradeço por ter mostrado inteligência emocional, competência acadêmica, profissionalismo e principalmente por ter me ensinado que para crescer é necessário dar a outra face e aprender com os erros. Eu te admiro muito pela sua inteligência!

Agradeço ao técnico Gilson Murata. Muito obrigada pela amizade, por todos os ensinamentos e aprendizagem, pela grande ajuda experimental e acadêmica, por todas as colaborações, pelos almoços e caronas. Agradeço imensamente a você por todas as palavras de incentivo, dedicação no seu trabalho e pela oportunidade de convivência com a pessoa amiga, responsável, humana e cristã que é você.

Agradeço aos professores: Carla Roberta de Oliveira Carvalho, João Paulo Gabriel Camporez e Rui Curi. Agradeço pela convivência e por terem compartilhado o ambiente e estrutura física do laboratório.

A todos os colaboradores do meu projeto.

Em especial Amanda Rabello Crisma por todos os ensinamentos, principalmente em relação aos microRNAs.

Ao Caio pelas imagens de oil red e westem blotting

A Frhancielly e Gizela, não apenas pela amizade, mas também por toda ajuda nos experimentos de bancada.

A todos os amigos, colegas, pesquisadores e colaboradores do laboratório 105.

Enfim agradeço a todos que enxergaram em mim algo bom, viram em mim um potencial para ser mais humana, mais humilde, mais dedicada, mais amiga, mais sincera.....Estou trabalhando para não decepcioná-los!



Muito obrigada a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo de número 2015/25597-5 pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento do projeto.

Agradeço ao Cnpq e a Capes

*Nada temos a temer quanto ao futuro;  
A menos que nos esqueçamos como Deus tem nos conduzido no passado.*

*Ellen G. White*

## RESUMO

PAYOLLA, T.B. **A exposição pré-natal à dexametasona exacerba os efeitos da frutose sobre o metabolismo lipídico hepático.** 2018. 80f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A reprogramação fenotípica causada por alterações ambientais distintas associada ao alto consumo de frutose na idade adulta poderia contribuir para o agravamento de distúrbios metabólicos. Para avaliar se a exposição pré-natal à dexametasona (DEX) modula os efeitos do consumo de frutose sobre o metabolismo hepático, investigamos a prole masculina nascida de ratas Wistar tratadas ou não com DEX (0,2mg/kg massa corpórea/dia) no 3º período gestacional. As proles de mãe controle (sem tratamento) e mães tratadas com DEX foram mantidas sem frutose (CTL e DEX) ou foram suplementadas com solução de frutose a 10% durante 8 semanas (frutose e DEX+frutose). Tanto os grupos frutose quanto DEX+frutose apresentaram consumo de frutose semelhante, intolerância à glicose e aumento da atividade máxima da enzima glicolítica PFK. Apenas DEX+frutose apresentou aumento dos triglicérides hepáticos e acúmulo de lipídeos intra-hepáticos. Além disso, o grupo DEX+frutose não mostrou expressão aumentada dos genes *sec22*, *mttp* e *apoB*, envolvidos na síntese, montagem e secreção de VLDL; paralelamente, observamos diminuição na concentração de triglicérides em 6 horas após injeção de Tyloxapol comparado ao DEX e frutose. Ainda, apresentou diminuição da expressão de *BECLIN1*, da expressão gênica de *HSP90*, e alteração de marcadores moleculares relacionados ao HCC, como diminuição de *TP53*, *P21* e *TIGAR*, e aumento da expressão de mRNA *afp* e *hsp70*. Em conjunto, nossos dados indicam que a exposição à DEX *in utero* leva a uma resposta metabólica única frente a alta ingestão de frutose na vida adulta. O aumento da gliconeogênese e intolerância à glicose, a redução na produção e secreção de VLDL e o prejuízo no fluxo autofágico estimulam o acúmulo de gotículas lipídicas no fígado que pode favorecer o desenvolvimento de HCC em resposta à alta ingestão de frutose.

**Palavras Chaves:** Frutose. Glicocorticoides. Programação Metabólica. Síndrome metabólica.

## ABSTRACT

PAYOLLA, T.B. **Prenatal exposure to dexamethasone exacerbates the effects of fructose on hepatic lipid metabolism.** 2018. 80 p. [Ph. D Thesis (Human Physiology)] - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

Phenotypic reprogramming caused by distinct environmental changes associated with high fructose consumption in adulthood could contribute to the worsening of metabolic disorders. To evaluate whether prenatal exposure to Dexamethasone (DEX) modulates the effects of fructose consumption on hepatic metabolism, we investigated male offspring born to Wistar rats treated with or without DEX (0.2 mg / kg body weight / day) at 3rd gestational period. The offspring of control (untreated) and DEX treated mothers were maintained without fructose (CTL and DEX) or supplemented with 10% fructose solution for 8 weeks (fructose and DEX + fructose). Both the fructose and DEX + fructose groups showed similar fructose consumption, glucose intolerance and increased maximal activity of the glycolytic enzyme PFK. Only DEX + fructose presented increase in hepatic triglycerides and accumulation of intrahepatic lipids. In addition, the DEX + fructose group did not show increased expression of *sec22*, *mttp* and *apoB* genes involved in the synthesis, assembly and secretion of VLDL; In parallel, we observed a decrease in TG concentration in 6 hours after injection of Tyloxapol compared to DEX and fructose. In addition, there was a decrease in *BECLIN1* expression, *HSP90* gene expression, and alteration of HCC-related molecular markers such as *TP53*, *P21* and *TIGAR*, and increased expression of *afp* and *hsp70* mRNA. Taken together, our data indicate that exposure to DEX in utero leads to a unique metabolic response to high fructose intake in adult life. Increased gluconeogenesis and glucose intolerance, reduction in VLDL production and secretion, and loss of autophagic flow stimulate the accumulation of lipid droplets in the liver that may favor the development of HCC in response to high fructose intake.

**Key words:** Fructose. Glicocorticoids. Metabolic Programming. Metabolic syndrome.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: METABOLISMO HEPÁTICO DA FRUTOSE E A CONEXÃO COM OUTRAS VIAS. ....	25
FIGURA 2: PAPEL DOS GLICOCORTICÓIDES NA REPROGRAMAÇÃO FENOTÍPICA: .....	28
FIGURA 3: PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DOS GRUPOS UTILIZADOS NESTE ESTUDO. ....	32
FIGURA 5: PARÂMETROS METABÓLICOS DA PROLE (A) .....	40
FIGURA 6: CONSUMO ALIMENTAR DA PROLE (A).....	41
FIGURA 7: COMPOSIÇÃO CORPORAL DA PROLE.....	43
FIGURA 8: TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE (GTT): (A) .....	44
FIGURA 9: TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT) E AO PIRUVATO (PTT): (A) .....	45
FIGURA 10: CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO E LACTATO HEPÁTICO E PLASMÁTICO. ....	46
FIGURA 11: ATIVIDADE HEPÁTICA DE PFK, PK, ALDOB, HK E PEPCK EM RATOS EXPOSTOS A DEX DURANTE A GRAVIDEZ E TRATADOS OU NÃO COM FRUTOSE NA VIDA ADULTA.....	47
FIGURA 12: PARÂMETROS RELACIONADOS AO METABOLISMO LIPÍDICO. ....	49
FIGURA 13: PARÂMETROS LIPÍDICOS E PRODUÇÃO DE VLDL.....	51
FIGURA 14: ANÁLISE DA VIA AUTOFÁGICA.....	53
FIGURA 15: ANÁLISE DOS MARCADORES MOLECULARES RELACIONADOS AO CARCINOMA HEPATOCELULAR. ....	54
FIGURA 16: IMAGENS REPRESENTATIVAS DE WESTERN BLOTTING E RESPECTIVOS PONCEOUS.....	77

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: SEQUÊNCIA DE PRIMERS UTILIZADOS E NÚMERO DE ACESSO DOS GENES UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	37
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**11 $\beta$ HSD** - 11 beta-hidroxiesteróide desidrogenase  
**Acetil-CoA** - acetilcoenzima A  
**AFP**- alfa-feto proteína  
**ALDOB**- Aldolase B  
**ANOVA** - Análise de variâncias  
**AP2**- Fator de transcrição da família AP2  
**ApoB**- Apolipoproteína B  
**C/EBP $\alpha$** - ALPHA a bZIP transcription factor  
**C/EBP $\beta$** -beta a bZIP transcription factor  
**CDKN1A**- *Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina 1A*  
**ChREBP** - carbohydrate response element binding protein  
**CO<sub>2</sub>** - dióxido de carbono  
**CPT1** - carnitine palmitoyl transferase 1  
**DEX**- Dexametasona  
**DGAT**- Diacilglicerol Aciltransferase  
**DGCR8**: Di George syndrome critical region gene 8  
**DHGNA**-Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica  
**DM2**- Diabetes *Mellitus* tipo 2  
**G6PDH**: glicose-6-fosfato desidrogenase  
**GAPDH**- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase  
**GAX**- Growth arrest homeobox transcription factor  
**GCs** - Glicocorticoides  
**GK**-Goto-Kakizaki  
**GLUT2** - Transportador de glicose 2  
**GLUT5** - Transportador de glicose 5  
**GLUT8** - Transportador de glicose 8  
**GRE**- região de elemento de resposta ao glicocorticoide  
**GTT**- Teste de tolerância à glicose  
**HFCS**- *High Fructose Corn Syrup*  
**HoXA10** -O fator de transcrição homeoboxA10  
**HPA**- resposta hipotalâmica hipófise-adrenal  
**HSP70**- proteína de choque térmico 70  
**HSP90**- (*heat shock protein 90*)  
**ITT**- Teste de tolerância á insulina  
**KHK**- hexoquinase  
**KITT**- Constante de decaimento de glicose em um teste de tolerância a insulina  
**LC3**- microtubule-associated protein 1 light chain 3)  
**LDH**- lactato desidrogenase  
**LDL**- lipoproteína de baixa densidade  
**NEFA**- Ácidos Graxos livre não esterificados  
**NeuroD1**- Neurogenic differentiation 1  
**NRF2**- Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2  
**OMS** - Organização Mundial de Saúde  
**P62**- SQSTM-*Sequestosome 1*  
**PEPCK**- fosfoenolpiruvato carboxilase

**PFK**- fosfofrutoquinase

**PGC1- $\alpha$** - Peroxisoma proliferator-activated receptor-gama coativator alpha

**PK**- piruvato-quinase

**RCIU** - Restrição do crescimento intrauterino

**RISC**- Complexo de Silenciamento Induzido por RNA

**RNA** - Ácido ribonucleoproteico

**RNA<sub>m</sub>**- RNA mensageiro

**SP1**- Fator de transcrição Sp1

**SP3**- Fator de transcrição Sp2

**SREBP1c** - sterol receptor element-binding protein-1c

**STATs**- Members of the signal transducer and activator of transcription

**TG**- Triglicérides

**TKFC**-trioquinase

**VLDL**- *very-low-density lipoprotein*

**VLDL-TG** - VLDL ricas em TG

**$\beta$ -HAD**-  $\beta$ -hidroxiacil-CoA desidrogenase



# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>20</b>
2.1 FRUTOSE E SÍNDROME METABÓLICA	20
2.2 <i>RELAÇÃO ENTRE FRUTOSE E DHGNA</i>	21
2.3 <i>RELAÇÃO ENTRE AUTOFAGIA, DHGNA E HCC</i>	23
2.4 <i>METABOLISMO DA FRUTOSE</i>	24
2.5 <i>REPROGRAMAÇÃO FENOTÍPICA</i>	25
2.5.1 <i>Reprogramação fenotípica e os GCs</i>	26
2.5.2 <i>Reprogramação fenotípica e o consumo de frutose</i>	28
<b>3. OBJETIVO</b>	<b>30</b>
3.1 <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	30
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
4.1 <i>ANIMAIS E MODELO EXPERIMENTAL</i>	31
4.2 <i>PROTOCOLO EXPERIMENTAL</i>	31
4.3 <i>TRATAMENTO COM FRUTOSE</i>	32
4.4 <i>COMPOSIÇÃO CORPORAL</i>	32
4.5 <i>TESTES FUNCIONAIS</i>	33
4.5.1 <i>Teste de tolerância à glicose (GTT)</i>	33
4.5.2 <i>Teste de tolerância ao piruvato (PTT)</i>	33
4.5.3 <i>Teste de tolerância à insulina (ITT)</i>	33
4.6 <i>ANÁLISE DE PARÂMETROS TECIDUAIS: GLICOGÊNIO E LÍPÍDEOS HEPÁTICOS</i>	34
4.7 <i>ATIVIDADE ENZIMÁTICA</i>	34
4.8 <i>COLORAÇÃO DE LÍPÍDES NEUTROS POR OIL RED O</i>	35
4.9 <i>ANÁLISE DE PARÂMETROS SANGUÍNEOS</i>	36
4.10 <i>REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (PCR)</i>	36
4.11 <i>EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E IMMUNOBLOTTING</i>	37
4.12 <i>ENSAIO DE PRODUÇÃO DE VLDL</i>	38
4.13 <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	38
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>39</b>
5.1 <i>COMPOSIÇÃO CORPORAL MATERNO E DA PROLE</i>	39
5.1.1 <i>Curva de peso materno</i>	39
5.1.2 <i>Curva de peso da prole</i>	39
5.2 <i>CONSUMO HÍDRICO E INGESTÃO ALIMENTAR</i>	41
5.3 <i>ADIPOSIDADE</i>	42
5.4 <i>CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA DO MODELO EM ESTUDO</i>	44
5.5 <i>GLICOGÊNIO HEPÁTICO, LACTATO E ATIVIDADE MÁXIMA DE ENZIMAS</i>	46
5.6 <i>TG E IMUNOHISTOQUÍMICA DO FÍGADO</i>	48
5.7 <i>TG SÉRICO, SECREÇÃO HEPÁTICA DE VLDL-TG E EXPRESSÃO GÊNICA HEPÁTICA DE SEC22B, MTPP E APOB</i>	50
5.8 <i>AUTOFAGIA</i>	52
5.9 <i>MARCADORES MOLECULARES RELACIONADOS AO HCC</i>	54
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>55</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>65</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As alterações no estilo de vida como hábito alimentar e sedentarismo ocasionadas pela modernização ao longo do século passado contribuíram para as alterações no perfil epidemiológico da sociedade atual (MONTEIRO; CONDE; POPKIN, 2004; MISRA; KHURANA, 2008), caracterizado pelo aumento da síndrome metabólica e consequente desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis (POPKIN; KIM, 2011).

Um número crescente de informações na literatura descreve, dentre as alterações nutricionais, a correlação entre o aumento da ingestão de frutose e o aumento de alterações no metabolismo lipídico (PEREIRA et al., 2017). Um dos primeiros estudos, publicado a cerca de 30 anos atrás, mostrou aumento de triglicérides (TG) e insulina séricos e aumento da pressão arterial sistólica em ratos machos que consumiram dieta com 66% de frutose por duas semanas (HWANG et al., 1987). A partir deste trabalho surgiram outros protocolos experimentais utilizando a frutose líquida ou adicionada na ração. Em vários desses estudos, foi demonstrado que o consumo de 10% de frutose por 4-8 semanas pode aumentar a intolerância à glicose, hipertrigliceridemia e adiposidade (GUIMARAES et al., 2014; HIRANO et al., 1988; MORRIS et al., 2012).

O aumento no consumo de frutose coincide com o aumento da síndrome metabólica em países ocidentais (MILLER; ADELI, 2008), porém a causa/ efeito dessa correlação entre o seu consumo e o aumento da obesidade permanece controversa (RIPPE; ANGELOPOULOS, 2016). É improvável que o consumo de frutose seja causa isolada no aumento da incidência de distúrbios metabólicos na sociedade moderna, visto que outras variáveis como atividade física, idade e tabagismo também exercem efeito sobre as alterações no metabolismo (MOZAFFARIAN et al., 2011). Assim, a exposição a múltiplos fatores ambientais pode interagir com os componentes da dieta e facilitar o desenvolvimento da dislipidemia. Essas exposições podem ocorrer *in-útero*, segundo os primeiros estudos que deram origem ao conceito de “origem da saúde e doença no desenvolvimento” (RAVELLI; OSMOND, 1976).

Diversos estudos epidemiológicos mostram que um ambiente intrauterino adverso aumenta a prevalência de doença cardiovascular (MARLON et al., 2018), DM2 (PINNEY; SIMMONS, 2012), esteatose hepática não alcoólica (NAKAGAWA et al., 2018) e síndrome metabólica na vida adulta (RINAUDO; WANG, 2012). Estudos recentes também mostram a relevância da reprogramação metabólica na carcinogênese hepática, quando

os metabólitos gerados modulam vias de sinalização e diferenciação celular exercendo função promotora do câncer (NAKAGAWA et al., 2018)

Na medida em que a reprogramação metabólica fetal está associada a restrição do crescimento intrauterino (RCIU), e que o excesso de glicocorticoides (GCs) durante a gestação leva à RCIU (MURPHY *et al.*, 2011), parece haver uma relação entre RCIU os glicocorticoides e o aumento do risco de desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis (LUO; XIAO; NUYT, 2010). Já é sabido que a RCIU desempenha um papel central na programação metabólica da prole, podendo contribuir para o desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis na vida adulta como obesidade, Diabetes *Melittus* tipo 2 (DM2) e câncer (MARTIN-GRONERT; OZANNE, 2007)

Em um estudo anterior de nosso grupo, demonstramos que ratos adultos expostos ao excesso de GCs durante o 3º período gestacional (por administração de dexametasona (DEX) na água de beber das mães apresentaram, quando submetidos ao jejum prolongado, prejuízo na produção hepática de glicose e aumento do conteúdo hepático de ácidos graxos (PANTALEÃO et al., 2017).

A despeito da administração de GCs na prática clínica para aumentar a taxa de sobrevivência do recém-nascidos em mulheres grávidas (WYRWOLL et al., 2008), seu excesso é característica comum de insultos metabólicos, como a desnutrição e o estresse materno. Como modelo experimental reproduzível, a administração de DEX durante a gestação predispõe a prole adulta ao aumento da produção hepática de glicose (NYIRENDA et al., 1998), da deposição de gordura visceral (CLEASBY et al., 2003] e da produção de citocinas pró-inflamatórias (WYRWOLL et al., 2008).

Os GCs também podem modular o metabolismo da frutose, reduzindo a conversão de frutose em ácidos graxos no tecido adiposo e estimulando sua conversão hepática em glicogênio (FAIN, 1964; EXTON et al., 1976). Também é conhecido que a atividade intestinal da  $\alpha$ -glicosidase aumenta em resposta à exposição aos GCs, levando ao aumento da absorção de frutose (LEBENTHAL; SUNSHINE; KRETCHMER, 1972; DOUARD et al., 2008).

Entretanto, ainda não se sabe se a exposição pré-natal ao excesso de GCs afeta a resposta metabólica quando há consumo prolongado de frutose na prole adulta. Dessa forma, considerando a relevância do papel dos GCs na reprogramação fenotípica e de ambos (GCs e frutose) no desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis, o presente trabalho propõe avaliar se os efeitos do consumo de frutose sobre o

metabolismo lipídico hepático são potencializados em ratos expostos ao excesso de GCs durante a vida fetal.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Frutose e Síndrome Metabólica

Dentre os insultos metabólicos mais comuns da vida moderna encontra-se o alto consumo de frutose em bebidas industrializadas (TAPPY E LE, 2010). A frutose é um monossacarídeo, cuja fórmula química é igual à da glicose,  $C_6H_{12}O_6$ , porém com diferenças estruturais. Um artigo publicado recentemente mostrou a importante função do intestino na absorção e metabolismo da frutose (JANG et al., 2018). Porém, em condições de consumo excessivo, esta será metabolizada principalmente no fígado, onde é direcionada para a síntese de glicogênio e de TG contribuindo para a dislipidemia (SIEVENPIPER, 2012; JANG et al., 2018).

A frutose está presente nas frutas, em alguns vegetais e no mel, mas tem sido cada vez mais utilizada como adoçante de alimentos e bebidas devido ao seu poder edulcorante ser superior aos demais açúcares (INSEL PM; TURNER; ROSS, 2007), além de estar associada a manutenção da umidade do produto, cor, sabor e estabilidade osmótica (HANOVER; WHITE, 1993, TAPPY; LÊ, 2010). O maior consumo de frutose provém da sacarose de beterraba e cana de açúcar, ou do xarope de milho de alta frutose - HFCS-42 ou HFCS-55 - que contem, respectivamente, 42% ou 55% de frutose, oriunda da isomerização parcial da glicose.

O consumo de açúcar era restrito à realeza da Europa até ao século XVIII. Com as melhorias no manejo do plantio, extração e refinamento do açúcar, o seu comércio tornou-se intercontinental e deixou de ser artigo de luxo. Assim, passou a ser consumido por toda a população, utilizado não apenas adicionado a bebidas, mas também na preparação de sobremesas (TAPPY; LÊ, 2010). Foi em 1960 que o xarope de milho com alto teor de frutose, o HFCS (acrônimo de *High Fructose Corn Syrup*), foi desenvolvido. Devido ao seu baixo preço, a sua adição em refrigerantes e outros produtos cresceu demasiadamente comparado a utilização da sacarose (HANOVER; WHITE, 1993).

Um estudo sobre os hábitos alimentares dos americanos, realizado entre 1988 e 1994, mostrou que o consumo médio de frutose foi de 54,7 g/dia, (10,2% da ingestão calórica diária total), sendo as bebidas açucaradas como o refrigerante a principal fonte de frutose (BRAY, 2008). Entre 1999 e 2000, e 2007 e 2008, o consumo de açúcar adicionado na forma de sacarose e HFCS foram de 100,1 g/dia e 76,7 g/dia, respectivamente. A redução mais recente foi devida a diminuição do consumo de

refrigerante, mas as ingestões médias continuaram a exceder os limites recomendados (WELSH et al; 2011).

Para determinação da síndrome metabólica são necessários 3 ou mais dos componentes obesidade abdominal/ visceral, IR, dislipidemia, hiperglicemia (glicemia de jejum ou intolerância à glicose) e hipertensão arterial (ALBERTI KG, ZIMMET P; SHAW J, 2010; HUANG, 2009). Estudos epidemiológicos mostram que o alto consumo de frutose, especialmente na forma de adoçante de bebidas, é um fator de risco para doenças metabólicas (JANG et al., 2018). A incidência de condições clínicas e patológicas relacionadas a síndrome metabólica como hipertensão, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), dislipidemia, RI, disfunção renal, DM2, obesidade e doenças cardiovasculares são maiores em segmentos da população humana com consumo elevado de frutose (CALICETI et al., 2017; JEGATHEESAN; DE BANDT, 2017; REBOLLO et al., 2012).

Os estudos realizados em ratos têm demonstrado que o consumo alto de frutose aumenta a gordura intra-abdominal (BARET et al.,2002), inflamação sistêmica (MAENPAA, RAIVIO, KEKOMAKI et al., 1968), stress oxidativo (SONG; HUTCHINGS; PANG et al., 2005), eleva os TGs séricos (NAKAGAWA et al., 2006), resulta em DHGNA (ACKERMAN et al., 2005), reduz o colesterol HDL (*High Density Lipoprotein*) (YADAV et al., 2007) e eleva a pressão arterial (HWANG et al., 1987).

Em humanos não é diferente, resultados publicados em uma meta-análise mostraram que o consumo de 100g/dia eleva as concentrações de TG em jejum (LIVESEY e RICHARD TAYLOR, 2008). O consumo maior de 3g/kg/dia de frutose em uma semana levou ao aumento do conteúdo de lipídeo hepático e muscular em homens saudáveis (LE et al., 2009), RI hepática (COUCHEPIN et al., 2008) e no tecido adiposo (FAEH, et al., 2005), porém sem alterações na RI periférica (ITH et al., 2009; TAPPY e LÊ et al., 2010)

## **2.2 Relação entre Frutose e DHGNA**

A DHGNA é caracterizada por um conjunto de alterações hepáticas que inclui acúmulo excessivo de TG hepático (esteatose), inflamação esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) e dano hepático que pode progredir para cirrose, falência hepática e carcinoma hepatocelular (HCC) (BRUCE et al.,2014).

Os lipídeos se acumulam no fígado quando a entrada/síntese de lipídios excede a sua utilização (HORST et al., 2017). Pensando na Entrada/síntese de lipídios, a

dislipidemia causada por uma dieta rica em frutose, pode ser decorrente do aumento da lipogênese de novo (STANHOPE et al., 2009). Foi observado um aumento de 3 vezes da síntese de ácidos graxos pela lipogênese de novo em pacientes com DHGNA quando comparados aos controles (sem esteatose), e não observaram alterações no fluxo de ácidos graxos do tecido adiposo para o fígado (LAMBERT et al., 2014).

Nesse processo, a acetil-COA produzida na mitocôndria excede a capacidade do ciclo de Krebs em metabolizá-la, sendo convertida em citrato e este é utilizado como substrato para a lipogênese de novo. (LIM et al., 2010). Da acetil-COA deriva-se a malonil-CoA e inibe a carnitina palmitoil-transferase 1 (CPT1 – carnitine palmitoyl transferase 1), reduzindo a entrada de ácidos graxos na mitocôndria, diminuindo sua oxidação (MCGARRY et al., 1995).

A frutose pode também ativar fatores de transcrição como proteína de ligação ao elemento de resposta aos hidratos de carbono - ChREBP – carbohydrate response element binding protein,) e (proteína 1 c de ligação ao elemento regulador dos esteróides - SREBP1c - sterol receptor element-binding protein-1c) que ativam genes que codificam enzimas relacionadas a lipogênese de novo, frutólise, glicólise e gliconeogênese (IIZUKA; HORIKAWA, 2008; KIM et al., 2016).

Além do aumento da lipogênese de novo, os ácidos graxos liberados pela lipólise do tecido adiposo podem ser re-incorporados em TG nos adipócitos antes mesmo de serem liberados na corrente sanguínea (WEBER et al., 2012). Nesse processo conhecido como reesterificação de ácidos graxos, os ácidos graxos (palmitato, por exemplo) são ativados pela acilCoa sintetase formando acil-CoA, combina-se com glicerol 3-fosfato e forma lisofosfatidato prosseguindo por outros intermediários até formar triacilglicerol (SALWEY, 2009).

A RI no tecido adiposo, poderia contribuir para o aumento da liberação de ácidos graxos a partir dos depósitos de gordura (SONDERGAARD e JENSEN, 2016), contribuir para acúmulo de lipídico hepático e patogênese da DHGNA (BOREN et al., 2013). Nessa condição o aumento pequeno nas concentrações séricas de insulina após consumo excessivo de frutose poderia não ser suficiente para suprimir a lipólise do tecido adiposo (TER HORST et al., 2017). Sendo assim, o fluxo de ácidos graxos do tecido adiposo para o fígado seria aumentado, visto que a mobilização contínua de reservas de energia poderia ser transferida para o fígado. Em ratos, o consumo em excesso de frutose aumentou a

liberação de ácidos graxos dos adipócitos quando comparado ao consumo de glicose (VR et al., 2008)

A depuração de VLDL (*Very-Low-Density Lipoprotein*), responsável pelo transporte de TG, após a ligação LDL nos hepatócitos, também pode contribuir para o acúmulo de TG hepático (PARKS et al., 2006; BARROWS, B.R.; Parks, 2006)

Um dos mecanismos envolvidos na oxidação/utilização dos TGs está a  $\beta$ -oxidação mitocondrial. Diferentemente da glicose, não é possível usar a frutose diretamente como fonte de energia por todas as células. Ela precisará ser convertida em glicose, lactato ou ácidos graxos no fígado, intestino e rim. Sendo assim o alto consumo de frutose poderia levar a alterações na fonte de energia antes proveniente da oxidação de lipídeos para a oxidação de carboidratos (SUN e EMPIE et al., 2012). A redução da oxidação dos lipídeos poderia estar relacionada com o seu acúmulo no fígado. Ao perfundir o fígado de ratos com sangue rico em frutose, a oxidação hepática de ácidos graxos foi inibida (PRAGER e ONTKO et al., 1976). Esta alteração metabólica também foi observada em humanos que apresentaram redução da oxidação de lipídeos em detrimento do aumento da oxidação de carboidratos (TAPPY et al., 1976).

A diminuição da produção de VLDL foi observada em pacientes com EHNA (CHARLTON, et al., 2002). O comprometimento da depuração de VLDL-TG está associado a hipertrigliceridemia e aumento da adiposidade visceral. O consumo de uma dieta com alta concentração de frutose em hamsters levou a dislipidemia e do receptor de LDL no fígado via degradação de PCSK9 (DONG et al., 2015). Esses resultados sugerem que a redução de VLDL-TG hepáticos poderia ser um dos mecanismos pelo qual a frutose contribui para a dislipidemia. Isso pode ser explicado porque para que haja progressão da esteatose hepática a síntese de TG deve superar o a secreção de VLDL (KOO, 2010) e a exposição a longo prazo aos lipídeos intra-hepáticos conduz ao estresse do retículo endoplasmático e oxidativo, degradação da Apolipoproteína B (apoB) e redução da secreção de VLDL (PAN et al., 2004).

### **2.3 Relação entre autofagia, DHGNA e HCC**

Na atualidade, estão descritas funções relacionadas à autofagia que são relevantes para a patogênese da DHGNA. Estudos recentes indicam que o prejuízo do fluxo autofágico nos hepatócitos provocada pelo acúmulo de gorduras pode conduzir a iniciação do tumor (CZAJA, 2016). Em relação a carcinogênese do HCC, a macroautofagia parece remover



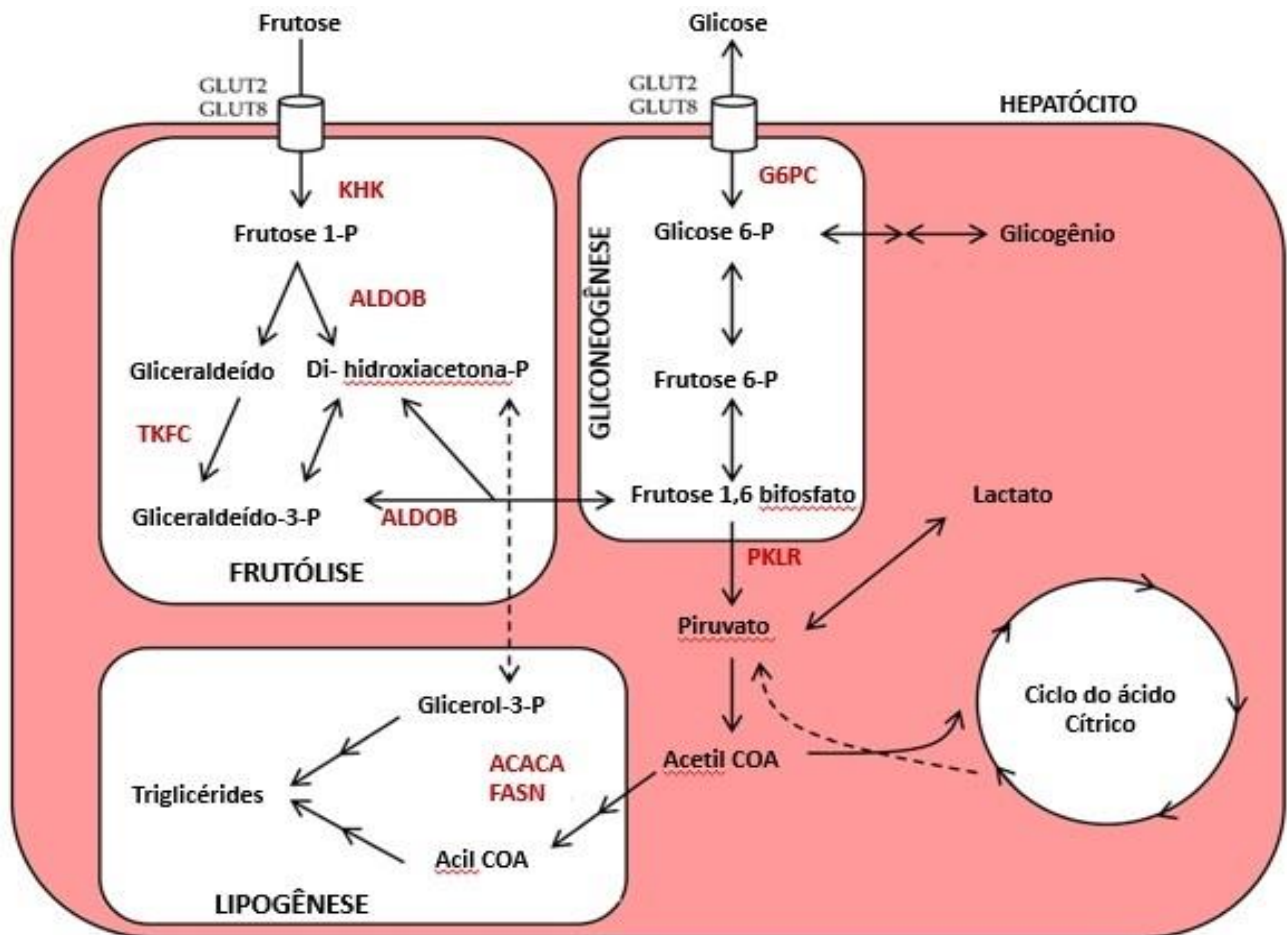
células danificadas e prevenir a iniciação do tumor por meio do bloqueio da lesão celular. Já nas células cancerosas a autofagia tem demonstrado conduzir a progressão do tumor, contribuindo para suas elevadas necessidades metabólicas (WHITE, 2015).

Em experimentos com animais, o bloqueio da macroautofagia nos hepatócitos promoveu o desenvolvimento de tumores no fígado. A inibição da BECLIN 1 também foi responsável pelo desenvolvimento de tumores (QU et al., 2003). O prejuízo de BECLIN 1 parece ser comum no HCC e está relacionado com o seu mau prognóstico (DING et al., 2008). Outro mecanismo é o aumento de p62 (*SQSTM-Sequestosome 1*) que ativa Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2) -like 2) regulando enzimas antioxidantes e regulação do crescimento do tumor (NI et al., 2014; CZAJA, 2016).

#### **2.4 Metabolismo da frutose**

A maior parte da frutose é metabolizada no fígado e o restante é metabolizado pelos rins e tecido adiposo. A frutose livre é absorvida no lúmen do intestino e a frutose proveniente da sacarose é clivada na membrana luminal dos enterócitos e transportada para o seu interior por meio do transportador de glicose 5 (GLUT5) (HORST *et al.*, 2017), que não é dependente de insulina (DORNAS *et al.*; 2015).

Na circulação portal, a frutose é transportada para os hepatócitos por meio do transportador de glicose 2 (GLUT2) e transportador de glicose 8 (GLUT8), e fosforilada em frutose-1-fosfato pela ceto-hexoquinase (KHK) ou frutoquinase no carbono 1 ou hexoquinase (HK) no carbono 6. A frutose-1-fosfato é hidrolisada em dois intermediários de fosfato de triose (gliceraldeído fosfato e dihidroxiacetona) por meio da aldolase B (ALDOB) e da trioquinase (TKFC). As trioses fosfatos podem ser utilizadas na gliconeogênese, síntese de glicogênio, produção de Acetil-CoA ou lactato. O Acetil-CoA pode ser oxidado ou usado na lipogênese. O destino metabólico da frutose ingerida depende de muitos fatores, entre eles o estado nutricional e os padrões alimentares (HORST *et al.*, 2017).



**FIGURA 1: METABOLISMO HEPÁTICO DA FRUTOSE E A CONEXÃO COM OUTRAS VIAS.** Figura adaptada de HORST et al., 2017 Após ser ingerida, a frutose é transportada via GLUT2 e 8 da veia porta para os hepatócidos. A cetoheksokinase (KHK) converte a frutose em frutose-1-fosfato (frutose-1-P), que poderá se dividir em gliceraldeído e di-hidroxiacetona-fosfato (di-hidroxiacetona-P) por meio da aldolase B (ALDOB). O gliceraldeído pode ser fosforilado em gliceraldeído-3-fosfato (gliceraldeído-3-P. Ambos (gliceraldeído-3-P e di-hidroxiacetona-P) poderão ser encaminhados para a gliconeogênese, síntese de glicogênio, produção de lactato ou acetil-CoA. O acetil-CoA poderá ser usado para a lipogênese ou oxidado no ciclo do ácido cítrico. ACACA (acetil-CoA carboxilase); FASN (ácido graxo sintase); G6PC (glucose-6-fosfatase); P (fosfato) e PKLR; piruvato quinase e TKFC (trioquinase)

## 2.5 Reprogramação fenotípica

Diversos estudos já abordaram o conceito de que a resposta aos desafios metabólicos na idade adulta poderia ser influenciada pelo ambiente materno durante o desenvolvimento fetal (BONEY, 2005; LAWLOR et al., 2007).

Na programação metabólica fetal, também conhecida como reprogramação fenotípica, o estado nutricional materno inadequado (causado pela restrição calórico-proteica, obesidade, DM2 gestacional, entre outros fatores) pode resultar em alterações no desenvolvimento e metabolismo de alguns órgãos que estão associadas ao menor peso

ao nascer (TARRY ADKINS; OZANNE, 2017). As alterações morfológicas no fígado podem estar associadas com o desenvolvimento de fibrose e HCC, aumento do estresse oxidativo, distúrbios na gliconeogênese e acúmulo de lipídeos na idade adulta.

Um dos principais exemplos do impacto da alimentação na reprogramação fenotípica ocorreu no período conhecido como inverno da fome, que ocorreu na Holanda entre 1944 e 1945, momento histórico em que muitas pessoas morreram desnutridas devido à escassez de alimentos. Ravelli estudou os filhos de mulheres grávidas durante a fome nesse período e associou a desnutrição durante a gestação ao desenvolvimento de DM2 e obesidade (RAVELLI et al., 1976; RAVELLI et al., 1999).

As alterações fisiológicas e morfológicas podem resultar de modificações epigenéticas, caracterizadas por mudanças na expressão gênica sem alteração na sequência do DNA, e que podem ocorrer em diferentes fases da vida (CANANI et al., 2011). Durante a fase crucial de desenvolvimento fetal, onde há maior plasticidade epigenética (BURGIO; LOPOMO; MIGLIORE, 2015), as alterações na expressão gênica podem ocorrer por meio de mecanismos epigenéticos, seja por metilação do DNA, modificação de histonas ou alterações de microRNAs (LING; GROOP, 2009).

### **2.5.1 Reprogramação fenotípica e os GCs**

Entende-se que alguns fatores como nível de estresse materno, resposta hipotalâmica hipófise-adrenal (HPA), ou concentração e permeabilidade dos GCs, são determinantes para ocorrência da reprogramação fenotípica. Na fase final da gestação, os GCs são essenciais para amadurecimento fetal, garantindo que o feto esteja pronto para a vida extrauterina. Porém, o excesso de GCs, devido ao tratamento com GCs sintéticos ou condições estressantes como desnutrição ou isolamento, está relacionado com as alterações permanentes da estrutura e função dos tecidos fetais (FOWDEN et al., 2016). Por exemplo, a programação metabólica causada pelo excesso de GCs decorrente do tratamento com dexametasona durante a gestação promoveu acúmulo de TG no fígado na prole após jejum prolongado (PANTALEÃO et al., 2017), menor peso ao nascer, (BENEDIKTSSON et al., 1993; HOLMES et al., 2006; WYRWOLL et al., 2008, PANTALEÃO et al., 2017), hiperglicemia, hiperatividade do eixo HPA e ansiedade (BURTON et al., 1994).

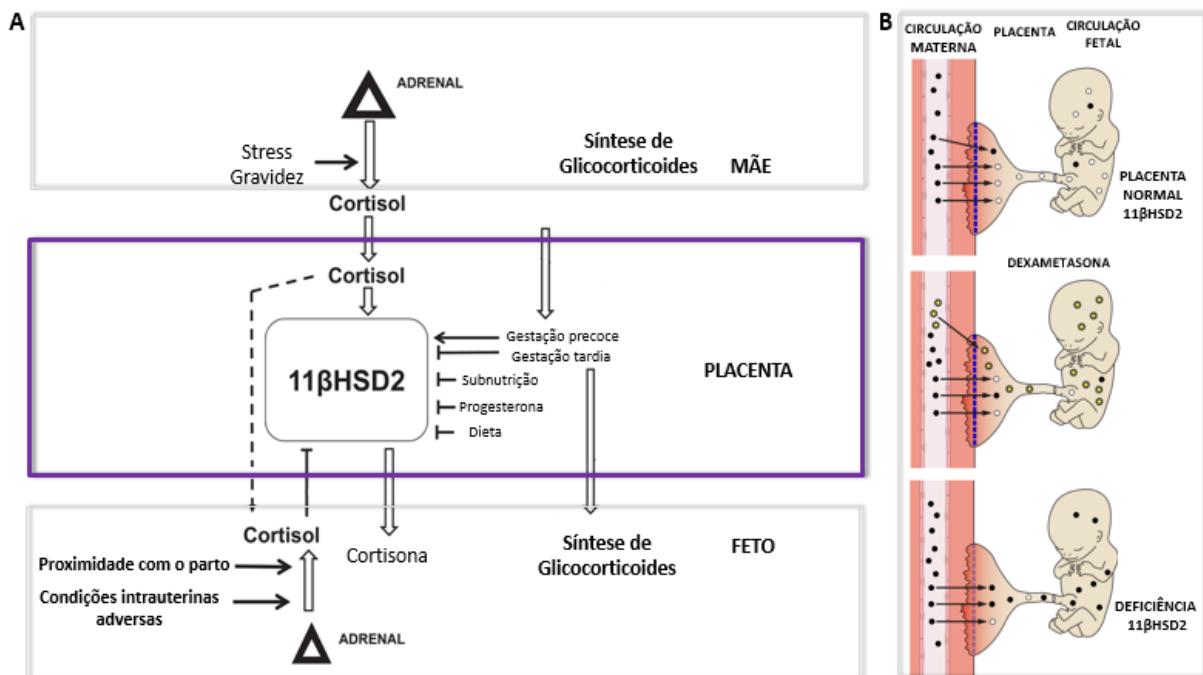
A redução do peso ao nascer causado pela exposição ao excesso de GCs ou estresse durante a gravidez está relacionada à hipertensão, hiperglicemia e disfunções

neuroendócrinas na prole (BURTON; WADDELL, 2013). Ademais, dados na literatura atual correlaciona o baixo peso ao nascer com o aumento na prevalência de doenças cardiometabólicas e neurológicas (BARKER, 2004).

Em condições normais, os GCs atravessam a placenta por difusão devido ao gradiente materno-fetal (Figura 2) (FOWDEN et al., 2016); porém, a maior parte do GCs maternos são inativados pela enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase 2 (11 $\beta$ HSD2) na placenta, que atua como uma barreira protetora em momentos em que há níveis elevados de GCs endógenos (Figura 2B). Sendo assim a redução da atividade desta enzima contribui para a exposição feto-placentária aos GCs (CHAPMAN; HOLMES, 2013).

Tanto a deficiência da enzima 11 $\beta$ HSD2 quanto o tratamento com DEX contribui para o aumento de GCs na circulação fetal quando comparado a condições normais (Figura 2B). Estudos mostram que o consumo de uma dieta com baixo teor de proteína aumenta os níveis de GCs nas mães e no feto no 19º dia de gestação (LESAGE et al., 2001; GUZMAN et al., 2006) acompanhado pela diminuição da atividade de 11 $\beta$ HSD2 na placenta (LANGLEY-EVANS et al., 1996; STOCKER et al., 2004). Como o tratamento com DEX leva a redução do consumo de ração e do peso das mães (BONAMIN et al., 2012), é possível que os mecanismos de programação envolvidos na desnutrição e GCs apresentem similaridades.

Em relação a reprogramação fenotípica relacionada ao excesso de GCs, parece que os seus altos níveis na placenta poderiam estar relacionado ao aumento da lipogênese de novo no fígado dos fetos, contribuindo para o desenvolvimento de DHGNA na idade adulta (LI et al., 2015).



**FIGURA 2: PAPEL DOS GLICOCORTICÓIDES NA REPROGRAMAÇÃO FENOTÍPICA: A.** fontes de cortisol na circulação fetal e o papel da 11 βHSD2 como barreira placentária à transferência materno fetal de cortisol e **B.** programação dos GCs e 11 βHSD2 na placenta em condições normais, exposição a DEX e deficiência de 11 βHSD2. Figura adaptada de Fowed et al.,2016 e Chapman et al., 2013

### 2.5.2 Reprogramação fenotípica e o consumo de frutose

A grande maioria dos trabalhos publicados que relacionaram a reprogramação metabólica à frutose analisaram os efeitos da ingestão materna deste açúcar sobre o metabolismo energético da prole (CLAYTON et al., 2015; SLOBODA et al., 2014; ARENTSON-LANTZ et al., 2016; ZHENG et al 2016; GUGLIUCCI et al., 2016). Entretanto, sob o ponto de vista humoral, morfológico e metabólico, nosso modelo experimental melhor se assemelha à desnutrição materna - o modelo consolidado para indução da RCIU - seguida da administração de frutose para a prole na vida adulta. Cabe aqui destacar que abundância calórica após a restrição fetal, e não apenas a restrição calórica, é necessária para produzir a obesidade e doenças associadas na vida adulta ( GLUCKMAN; HANSON, 2015).

Encontramos um único artigo na literatura que reporta as alterações desencadeadas pela dieta materna pobre em proteínas sobre a função hepática da prole

exposta ao consumo excessivo de frutose na vida adulta (ARENTSON-LANTZ et al., 2016). Neste trabalho, os autores mostram que a massa do fígado da prole aumentou quando há consumo de frutose. Esta foi correlacionada ao aumento dos estoques de glicogênio - mas não de TG - hepático nos animais alimentados com frutose na vida adulta. Ademais, foi observado um modesto aumento da expressão do gene da enzima gliconeogênica fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCK), apesar de não resultar em aumento da glicemia de jejum (ARENTSON-LANTZ et al., 2016). Por fim, os autores reconhecem que os dados apresentados no estudo são limitados no sentido de delinear os mecanismos que dirigem as alterações metabólicas induzidas pela combinação da dieta materna com a da prole.

### **3. OBJETIVO**

O objetivo central deste trabalho foi avaliar os efeitos do consumo de frutose sobre o metabolismo hepático de ratos expostos ao excesso de GCs durante a vida fetal.

#### ***3.1 Objetivos Específicos***

- Investigar o efeito do consumo de frutose sobre a composição corporal, ingestão alimentar, ganho de peso e adiposidade para os diferentes grupos experimentais;
- Investigar possíveis alterações na sensibilidade sistêmica à insulina, tolerância à glicose e gliconeogênese por meio dos testes (ip-ITT, ip-PTT e ip-GTT);
- Investigar possíveis alterações metabólicas por meio dos parâmetros bioquímicos e moleculares como atividade máxima das enzimas PFK, PK, HK, Aldolase PEPCCK, níveis séricos e de lactato, TG e glicogênio no sangue e fígado dos animais e produção de VLDL;
- Investigar o acúmulo de gotículas hepáticas por meio da coloração de lípidos neutros por Oil Red O;
- Investigar possíveis alterações autofágicas, avaliando a expressão proteica de BECLIN1, LC3 e p62 e expressão gênica de HSP90;
- Investigar a alteração de possíveis marcadores moleculares relacionados ao HCC como a expressão p53, p21, TIGAR e expressão gênica de AFP e HSP70.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

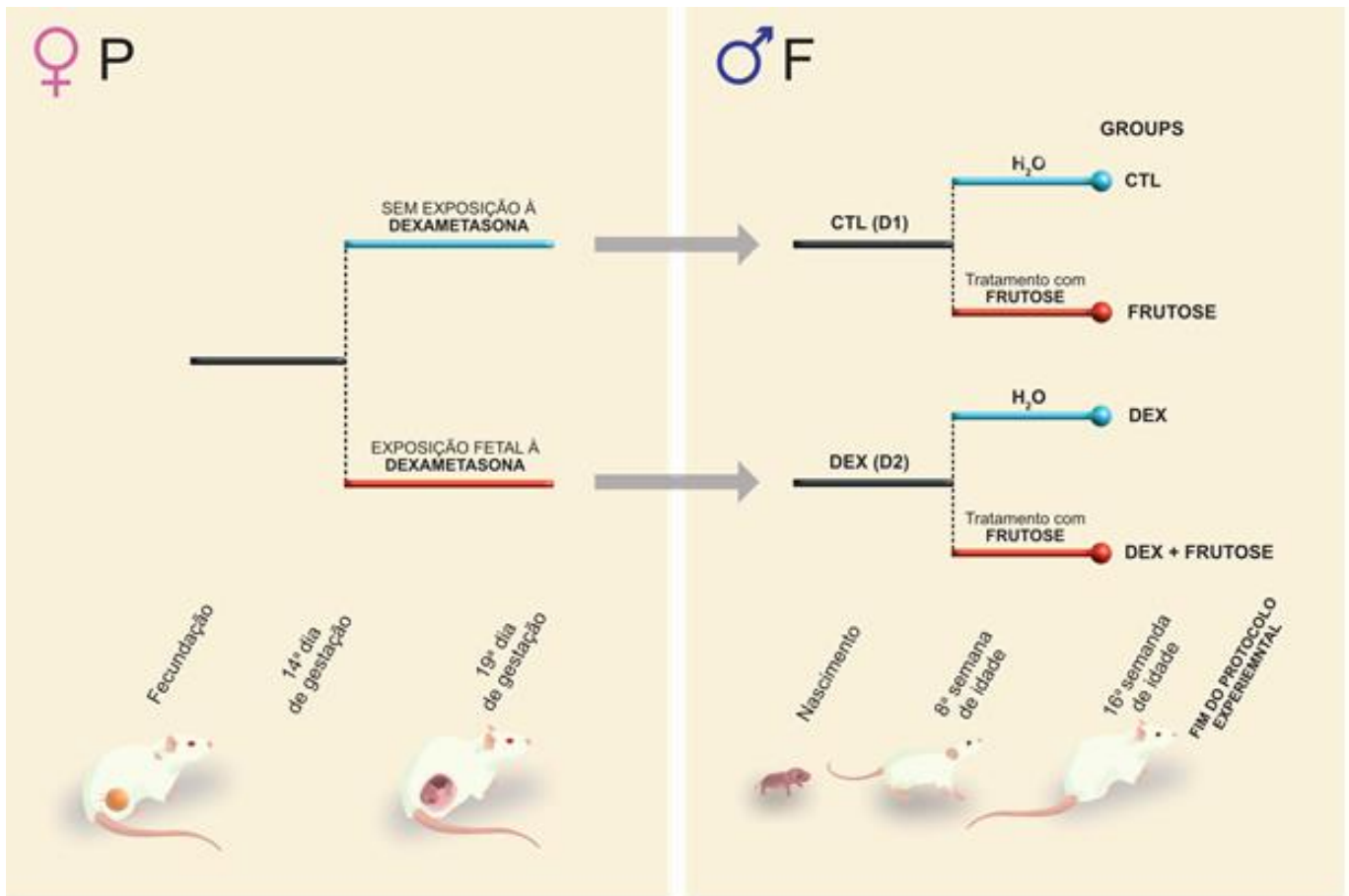
### ***4.1 Animais e Modelo experimental***

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo CEUA, certificado 100/14. Os casais de animais e as proles do sexo masculino utilizadas no experimento foram mantidas em salas separadas, sob temperatura controlada de 23°C, em ciclo claro-escuro de 12:12h com acesso a água potável ou solução de 10% de frutose e ração padrão *ad libitum*.

### ***4.2 Protocolo experimental***

Nesse modelo experimental, foram utilizadas as proles de ratas Wistar em duas condições: 1) sem exposição à DEX: ratas beberam apenas água, 2) sob exposição à DEX: nessa condição, as ratas foram tratadas diariamente durante o último terço da gestação (14°-19° dias) com DEX em água para beber (0,2 mg/kg massa corpórea). Com a finalidade de avaliar o efeito do consumo de frutose sobre o metabolismo hepático de ratos submetidos à reprogramação fenotípica por excesso de GCs, os animais machos com oito semanas de vida (d56), 3 a 4 animais por caixa, tiveram acesso à água *ad libitum* na presença ou ausência de 10% de frutose (p/v) durante oito semanas. Ao final do tratamento foram obtidos 4 grupos também avaliados em nosso estudo: prole controle que consumiu apenas água (CTL); prole controle tratada com frutose (frutose); e prole tratada com DEX durante a fase fetal (DEX) e posteriormente tratada com frutose na idade adulta (DEX+frutose) (Figura 3).





**FIGURA 3: PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DOS GRUPOS UTILIZADOS NESTE ESTUDO.** Elaborado por Fábio Takeo Sato. Prole controle que consumiu apenas água (CTL); prole controle tratada com frutose (frutose); e prole tratada com DEX durante a fase fetal (DEX) e posteriormente tratada com frutose na idade adulta (DEX+frutose)

### 4.3 Tratamento com frutose

A solução de frutose 10% foi preparada a partir da diluição de 100 ml de xarope concentrado (70%) em 600 ml de água potável. O xarope 70% foi preparado dissolvendo-se completamente 700g de frutose em 1 litro de água potável a 40°C e guardado em geladeira após o término. A solução 10% de frutose foi disponibilizada aos animais em garrafas preparadas em dias alternados para evitar fermentação e proliferação de fungos.

### 4.4 Composição corporal

Dados do peso, ingestão alimentar e volume dos líquidos foram obtidos semanalmente para posterior avaliação. A avaliação de porcentagem da gordura lateral foi realizada por imageamento por Raio X utilizando o sistema 'In-Vivo Imaging System FX PRO' (Carestream), disponível para uso sem custo nas facilidades do ICB (Centro de Apoio

de Facilidades à Pesquisa - CEFAP). A região da gordura lateral foi selecionada entre o espaço vertebral S3/S4 até a altura do joelho pelo programa Axio Vision Special Edition 64 bits.

#### **4.5 Testes Funcionais**

##### **4.5.1 Teste de tolerância à glicose (GTT)**

O GTT foi realizado de acordo com a metodologia previamente estabelecida (PANTALEÃO et al., 2017). Resumidamente, animais jejuados (início 08:00 a.m), realimentados por 2 horas (18:00-20:00), e jejuados no período noturno de 12 horas (20:00 até 08:00 do outro dia) foram submetidos à injeção intraperitoneal (i.p.) de solução de glicose 50% (2 g glicose/kg de peso corporal). As amostras de sangue foram coletadas da cauda nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 min para medição da glicemia.

##### **4.5.2 Teste de tolerância ao piruvato (PTT)**

O PTT foi realizado de acordo com metodologia previamente estabelecida (PANTALEÃO et al., 2017). Resumidamente, animais jejuados (início 08:00), realimentados por 2 horas (18:00-20:00), e jejuados no período noturno de 12 horas (20:00 até 08:00 do outro dia) foram submetidos à injeção i.p. de solução de piruvato de sódio (2g / kg de peso corporal). As amostras de sangue foram coletadas da cauda nos tempos 0, 15, 30, 60e 120 min para medição da glicemia. Os dados foram plotados em um gráfico de dispersão e os resultados analisados como área sob a curva.

##### **4.5.3 Teste de tolerância à insulina (ITT)**

O ITT foi realizado de acordo com metodologia estabelecida no laboratório (PANTALEÃO et al., 2017). Resumidamente, animais jejuados (início 08:00), realimentados por 2 horas (18:00-20:00), e jejuados no período noturno de 12 horas (20:00 até 08:00 do dia seguinte) foram submetidos à injeção i.p. de insulina (0,5 UI/kg de peso corporal). As amostras de sangue foram coletadas da cauda nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 30 e 45 min para medição da glicemia. A constante de decaimento da glicose (KITT, %/min) foi calculada a partir da regressão linear dos valores de glicemia obtidas durante o teste.

#### **4.6 Análise de parâmetros teciduais: glicogênio e lipídeos hepáticos**

As amostras de fígado foram rapidamente removidas, lavadas com PBS gelado, congeladas com nitrogênio líquido, pulverizadas e mantidas no -80°C até serem utilizadas. O conteúdo de glicogênio foi determinado de acordo com método descrito anteriormente (RODRIGUES et al., 2014). A extração lipídica do fígado foi realizada com base em um método previamente descrito (FOLCH et al; 1957). Resumidamente, as amostras foram homogeneizadas usando homogeneizador *Polytron PT 2100®* em uma solução de 4 ml de CHCl<sub>3</sub> e metanol (2: 1, v / v). O homogeneizado foi submetido à extração durante pelo menos 16 h a 4°C sob agitação suave em um falcon fechado. Depois disso, adicionou-se 0,6% de solução de NaCl ao extrato e centrifugou-se a 2000 g durante 20 min. A camada orgânica foi então recolhida e seca (Eppendorf Vacuum Concentrator Plus; Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Os lipídios foram solubilizados em 200 µl de isopropanol e quantificados usando kits comerciais padrão.

#### **4.7 Atividade enzimática**

As atividades de piruvato-quinase (PK: EC 2.7.1.40), fosfato de frutoquinase (PFK: EC 2.7.1.11), Hexoquinase (HK: EC 2.7.1.1), fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCK: EC 4.1.1.32), aldolase (ALDO: EC 4.1.2.13), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH: EC 1.1.1.49), lactato desidrogenase (LDH: EC 1.1.1.27), foram avaliadas usando ensaios espectrofotométricos, seguindo os métodos padrões previamente descritos, (ALP; NEWSHOLME; ZAMMIT, 1976; OPIE; NEWSHOLME, 1967; CRABTREE; NEWSHOLME, 1972; BERGMAYER *et al*, 1974).

Aproximadamente 50mg de fígado foi homogeneizado em 500 µL de 50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA (pH 7,4) adicionado a coquetel de inibidor de protease e 50 µL de TritonX100 1%, centrifugado a 12.000 rpm a 4°C por 10 minutos para separar o sobrenadante obtendo o homogenato. Os ensaios foram realizados no homogenato diluídos 10X com o mesmo tampão em que a amostra foi homogeneizada.

O ensaio para a atividade máxima PK (ZAMMIT; NEWSHOLME, 1978), utilizou tampão contendo 100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 80mM KCl, 0,05% TritonX100, 9U LDH, 0,17mM NADH e 5mM ADP, adicionado a 2µL de homogenato. A reação foi iniciada com 2mM de PEP e as leituras das absorbâncias foram realizadas a 340nm em placa UV de 96 poços.

O ensaio para a atividade máxima da PFK1 (OPIE; NEWSHOLME, 1967) utilizou tampão de ensaio contendo 50mM Tris-HCl, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 5mM KCl, 0,05% TritonX100, 2U LDH, 4U PK, 1mM ATP, 0,2mM NADH e 2mM PEP, adicionado a 10µL de homogenato. A reação foi iniciada com adição de 3mM de frutose-6-fosfato (F6P) e as absorbâncias serão lidas em placas UV a 340nm.

O ensaio para a atividade máxima da HK (CRABTREE; NEWSHOLME, 1972) utilizou tampão contendo 75mM Tris-HCl, 7,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8mM EDTA, 1,5mM KCl, 4mM β-mercaptoetanol, 0,05% TritonX100, 0,4mM NADP<sup>+</sup>, 2,5mM ATP e 1,4 U glicose-6-fosfatodesidrogenase (G6PDH), adicionado a 20µL homogenato. A reação foi iniciada com adição de 1mM de glicose e as absorbâncias foram lidas em placas UV a 340nm.

O ensaio para atividade máxima da PEPCK, descrito por OPIE & NEWSHOLME (1967), utilizou tampão constituído por 66mM de Tris-HCl, 1mM de MnCl<sub>2</sub>, 1mM fosfoenolpiruvato, 0,16mM NADH, 1,54mM IDP, 17mM NaHCO<sub>3</sub>, adicionados a 20µL de homogenato. A reação foi iniciada com adição de 12 Unidades (U) de malato desidrogenase e as absorbâncias foram lidas em placas UV a 340nm.

O ensaio para atividade máxima da aldolase (BERGMEYER et al., 1974) utilizou tampão contendo 90mM de Tris-HCl, 0,13mM de NAD<sup>+</sup> e 5 U de glicerofosfato desidrogenase/ triosefosfato isomerase ou 1,6 U de glicerol fosfato desidrogenase e 1,6 U de triose fosfato isomerase, adicionado a 20µL de homogenato. A reação foi iniciada com adição de 1,9 mM de Frutose 1,6 Fosfato e as absorbâncias foram lidas em placas UV a 340nm.

Os resultados dos ensaios para a atividade enzimática foram expressos como µmol/min por grama de tecido.

#### **4.8 Coloração de lípidos neutros por Oil Red O**

Os fragmentos de fígado foram imersos em Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek Europe B.V., Holanda) e congelados em n-hexano com nitrogênio líquido. Duas lâminas com três secções seriadas de 12 µm de espessura (200 µm de distância entre elas) foram obtidas de cada fragmento utilizando o criostato Leica CM1850 (Leica Biosystems, Alemanha), e montadas em lâminas de vidro silanizadas. As secções foram incubadas com Oil Red O por 5 minutos e depois enxaguadas com água de torneira por 30 minutos, de acordo com MEHLEM et al., 2013; PANTALEÃO et al., 2017. Em seguida, as lâminas foram revestidas com meio de montagem solúvel em água e lamínulas. Pelo menos três imagens

de cada secção foram capturadas com uma ampliação final de 20X usando um microscópio Olympus BX51TF de campo claro (*Olympus, Tóquio, JP*), equipado com uma câmera digital (*Olympus DP72; Olympus, Tóquio, JP*). As análises foram realizadas usando o software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>).

As imagens coloridas foram convertidas em escala de cinza e a densitometria foi realizada em todo o campo capturado. A coloração das secções e a aquisição das imagens foram realizadas em uma única rodada experimental, e a análise foi realizada assumindo um sinal de fundo (*background*) individual para cada imagem. Os dados são apresentados como densidade óptica Oil Red O.

#### **4.9 Análise de parâmetros sanguíneos**

Glicose, TG, colesterol e lactato foram realizados utilizando kits comerciais padrão (Labtest Diagnóstica SA, MG, Brasil). As concentrações séricas de insulina foram determinadas por ELISA, de acordo com as instruções do fabricante (EZRMI-13K, Millipore, MA, EUA).

#### **4.10 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR)**

A expressão de mRNA foi realizada de acordo com método padrão. Resumidamente, o RNA total foi extraído usando o reagente TRIzol® (Invitrogen) a partir de aproximadamente 100 mg de tecido e usado para a transcrição reversa primers aleatórios (*random primers*). A sequências dos primers utilizados e o número de acesso (*GeneBank*) dos genes estão listados na Tabela 1.

Gene	Temperatura de <i>Melting</i> (°C)	Sequência do <i>Primer</i>
<i>afp</i>	55,5°C	Sense: 5'-TTGCCTCAATGTGCTGCCAG -3'
NM_012493		Anti-sense: 5'-CGGAGTTCACAGGGTTTGCC-3'
<i>apoB</i>	55°C	Sense: 5'-CTGCGGTGGCAGAAATAACG-3'
NM_019287		Anti-sense: 5'-CCTTGAGCAAACCTTAGGTAGGG-3'
<i>hsp70</i>	60,7°C	Sense: 5'-GAGATCATCGCCAACGACCAG-3'
NM_031971		Anti-sense: 5'-CTCGCCCTTGAGTTCACCTGC-3'
<i>mtp</i>	56,3°C	Sense: 5'-TATGACCGTTTCTCCAAGAGTGG-3'
NM_001107727		Antisense: 5'-TCAAGTTCTCCTCTCCCTCATC-3'
<i>Sec22b</i>	56,3°C	Sense: 5'-CGTGCTCGGAGAAATCTCGG-3'
NM_001025686		Anti-sense: 5'-AACACGGCTACTGCTGCAAGC-3'
<i>hsp90</i>	56°C	Sense: 5'-CTGGGAAGACCACTTGGCAGTC-3'
BC082009		Anti-sense: 5'-CTCGGAATCAACCACACCACG-3'
<i>Rpl37a</i>	57,5°C	Sense: 5'-CAAGAAGGTCGGGATCGTGG-3'
X14069		Anti-sense: 5'-ACCAGGCAAGTCTCAGGAGGTG-3'

**Tabela 1: Sequência de primers utilizados e número de acesso dos genes utilizados para avaliação da expressão gênica**

#### **4.11 Extração de proteínas e imunoblotting**

Aproximadamente 50mg do tecido pulverizado e congelado foi homogeneizado em tampão TRIS-EDTA composto por 100mM TRIS, 2Mm EDTA, PH 7,4, inibidores de proteases (10mM pirofosfato de sódio, 100 mM fluoreto de sódio, 10 mM de ortovanadato de sódio, 2 mM de fenilmetilsulfonilfluoreto, 0,01 mg/mL de aprotinina) e 0,1% [v / v] Triton X-100. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, 4°C, 30 minutos. A concentração no sobrenadante foi determinada utilizando o método bradfort (Bio-Rad assay dye reagent, Carlisbad, CA, EUA) e diluído em tampão *Laemmli* (240mmM Tris-HCl, 0,8% dodecil sulfato de sódio, 40%glicerol, 0,02%azul de bromofenol e 200mM  $\beta$ -mercaptaetanol). Para o gel de eletroforese SDS-Poliacrilamida foram utilizados 30  $\mu$ g de proteína pipetadas em quantidades iguais. Os anticorpos primários utilizados foram: TIGAR (sc-68239), p53 (sc-6243) p21 (sc-6246) (Santa Cruz, CA, EUA); anti-LC3B (ab48394), anti-Beclin 1 (ab 62557) e anti QSTM1 (ab56416) (Abcam Cambridge, UK).

Foram usados anticorpos secundários conjugados com peroxidase de rábano (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), seguido por detecção Amersham Imager 600 (GE Healthcare Waukesha, WI, EUA) e quantificadas com auxílio do software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA). As imagens das bandas foram normalizadas pela densitometria das membranas após coloração com ponceau (0,1% de Ponceu S, 10% ácido acético glacial)

#### **4.12 Ensaio de produção de VLDL**

O ensaio de produção de VLDL foi realizado de acordo com método descrito anteriormente (PANTALEÃO *et al*; 2017). Resumidamente, o Tyloxapol (Triton WR-1339, Sigma Aldrich, St Louis, EUA) foi dissolvido em salina isotônica a 0,9% (v / v) e mantido sob agitação lenta e contínua até sua completa dissolução. Este administrado por injeção i.p. (500 mg / kg) nos ratos jejuados por 12 horas. Após 1, 3 e 6 horas, 100 $\mu$ L de sangue foi coletado da calda e os TGs foram medidos imediatamente usando kit comercial para dosagem de triglicerídeos (Labtest, Santa Lagoa, Brasil).

#### **4.13 Análise estatística**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (*mean standard error*, SE). Quando mais de uma variante foi comparada, utilizou-se Análise de Variância *two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey, quando os grupos CTL, DEX, frutose e DEX+frutose foram comparados. Em todos os resultados a significância estatística limite considerada foi de 5% ( $p < 0,05$ )

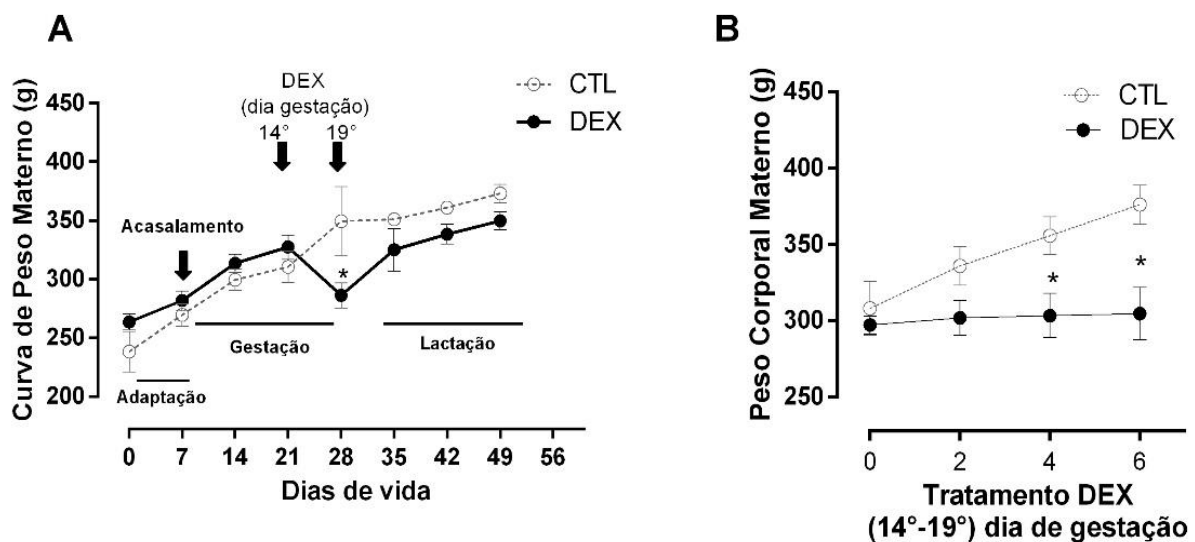
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Composição corporal materno e da prole

#### 5.1.1. Curva de peso materno

A figura 4A mostra a evolução do peso das fêmeas desde o período de adaptação no biotério até a lactação. O peso foi semelhante até o início do tratamento com DEX. Ao iniciar o tratamento, no último terço da gestação (14°-19° dias), as fêmeas DEX ganharam menos massa que as mães controle e apresentaram menor peso corporal a partir do quarto dia de tratamento, como evidenciado na Figura 4B.

#### 5.1.2 Curva de peso da prole

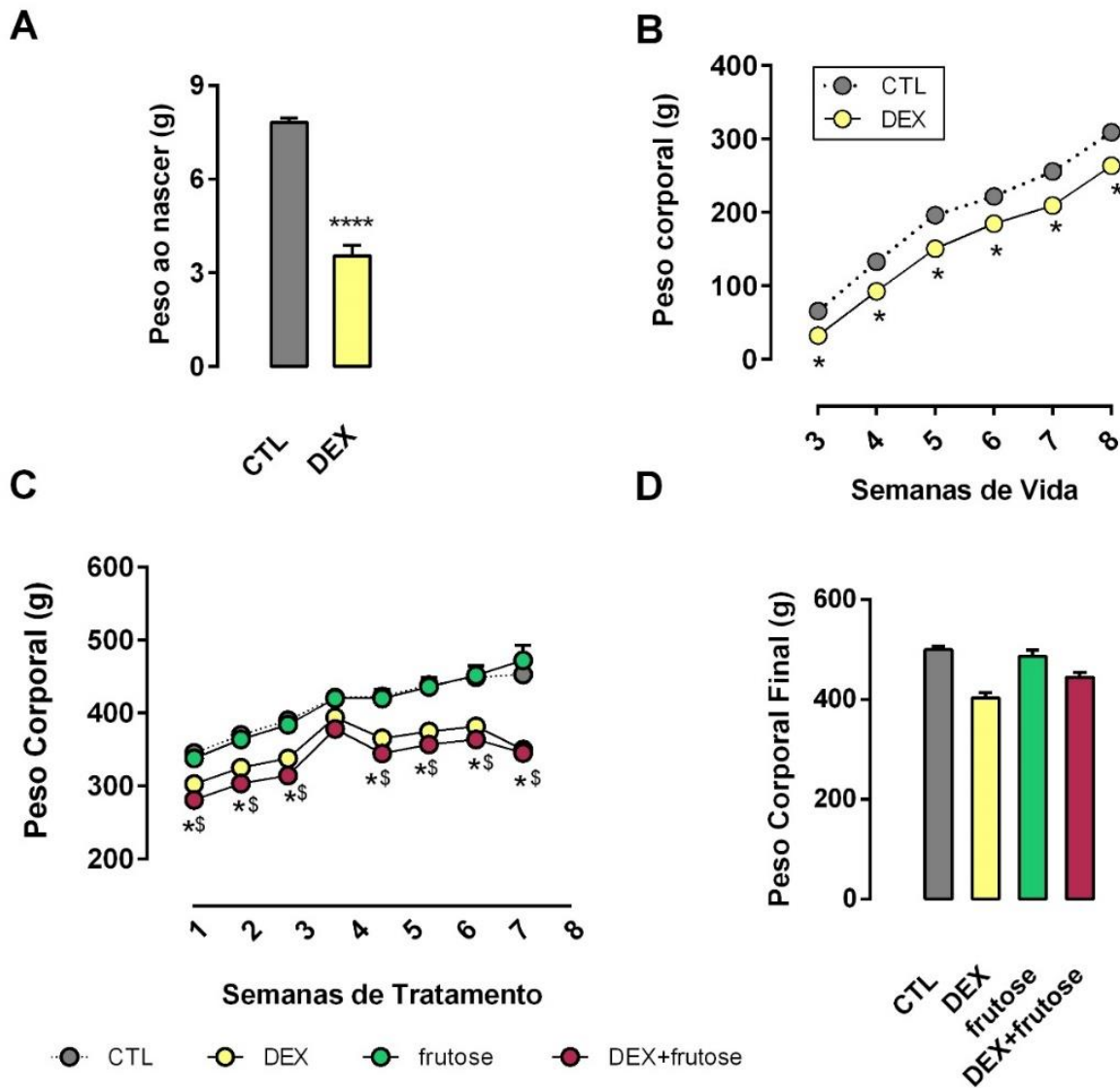


**FIGURA 4: EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL MATERNO (A)** curva de peso das matrizes correspondente aos períodos de adaptação, acasalamento, gravidez, lactação e desmame (n=5-8) **(B)** ganho de peso corporal de ratas tratadas ou não com DEX durante o terceiro período gestacional (N=5-8). CTL (controle), DEX (Tratado com Dexametasona, 200µg/kg de peso corpóreo/dia). Os resultados são apresentados como a média ± SEM. \* p<0,05, vs. grupo CTL.

No nosso modelo experimental, o tratamento com DEX exerceu um efeito de RCIU em machos, representado pelo menor peso ao nascer (54,62 %, p<0,0001 menor em relação a CTL) (figura 5 A); estes não exibem recuperação do crescimento até a 8 semana de vida (Figura 5B) (22,53 %, p<0,05 menor em relação a CTL) e nem após consumirem frutose por 8 semanas (Figura 5C) (18,26 %, p<0,05 menor a CTL). O peso corporal do



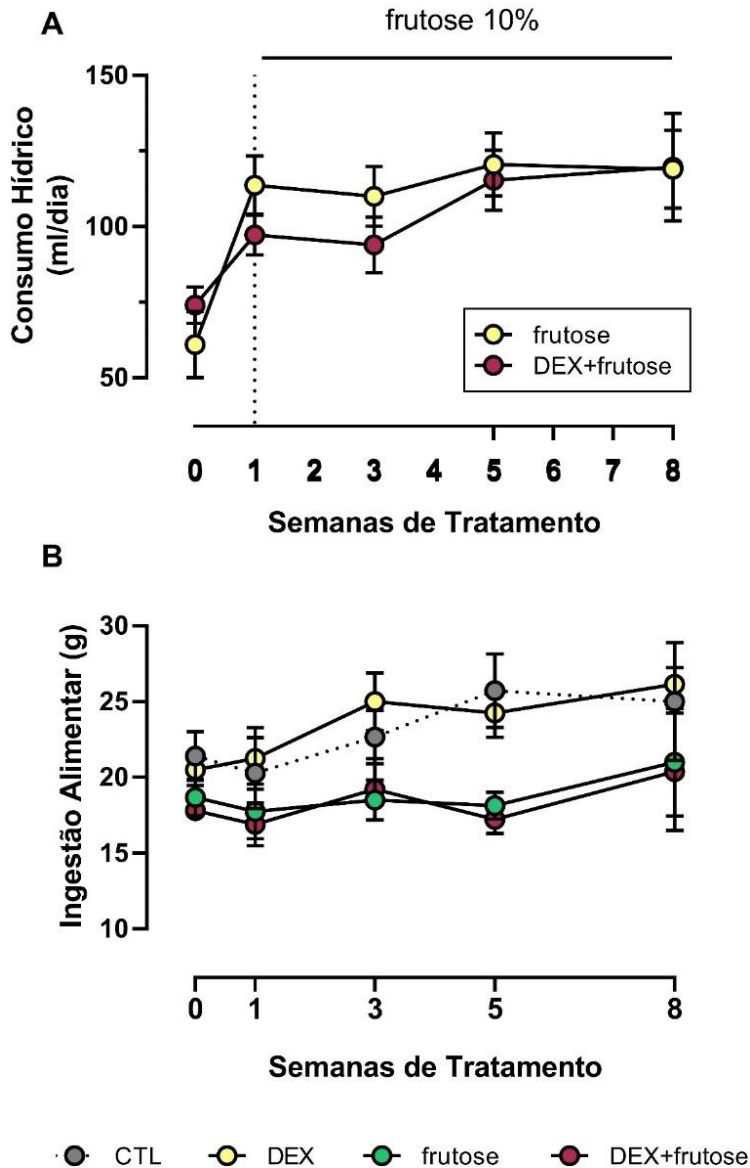
grupo frutose também não foi alterado após 8 semanas de consumo comparado ao grupo CTL, como mostra a evolução do peso. Figura 5C e o peso corpóreo final (Figura 5D).



**FIGURA 5: PARÂMETROS METABÓLICOS DA PROLE (A)** peso corporal da prole macho no primeiro dia de nascimento (d1) (n = 15-30 filhotes por grupo), **(B)** curva de peso da prole do nascimento até duas semanas de vida (n = 5-15), **(C)** curva de peso da prole do desmame até a 8ª semana de vida (n=8), **(D)** peso corporal final da prole do nascimento até 120 dias de vida (n = 15-30). CTL (controle), DEX (Tratado com Dexametasona na gestação, 200µg/kg de peso corpóreo/dia), frutose (Tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida), DEX+frutose (Tratado com Dexametasona na gestação, 200µg/kg de peso corpóreo/dia e posteriormente tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida). Os resultados são apresentados como a média ± SE. \* p<0,05, vs. grupo CTL; §p<0,05, vs. frutose, & p<0,05, vs. grupo DEX.

## 5.2 Consumo hídrico e ingestão alimentar

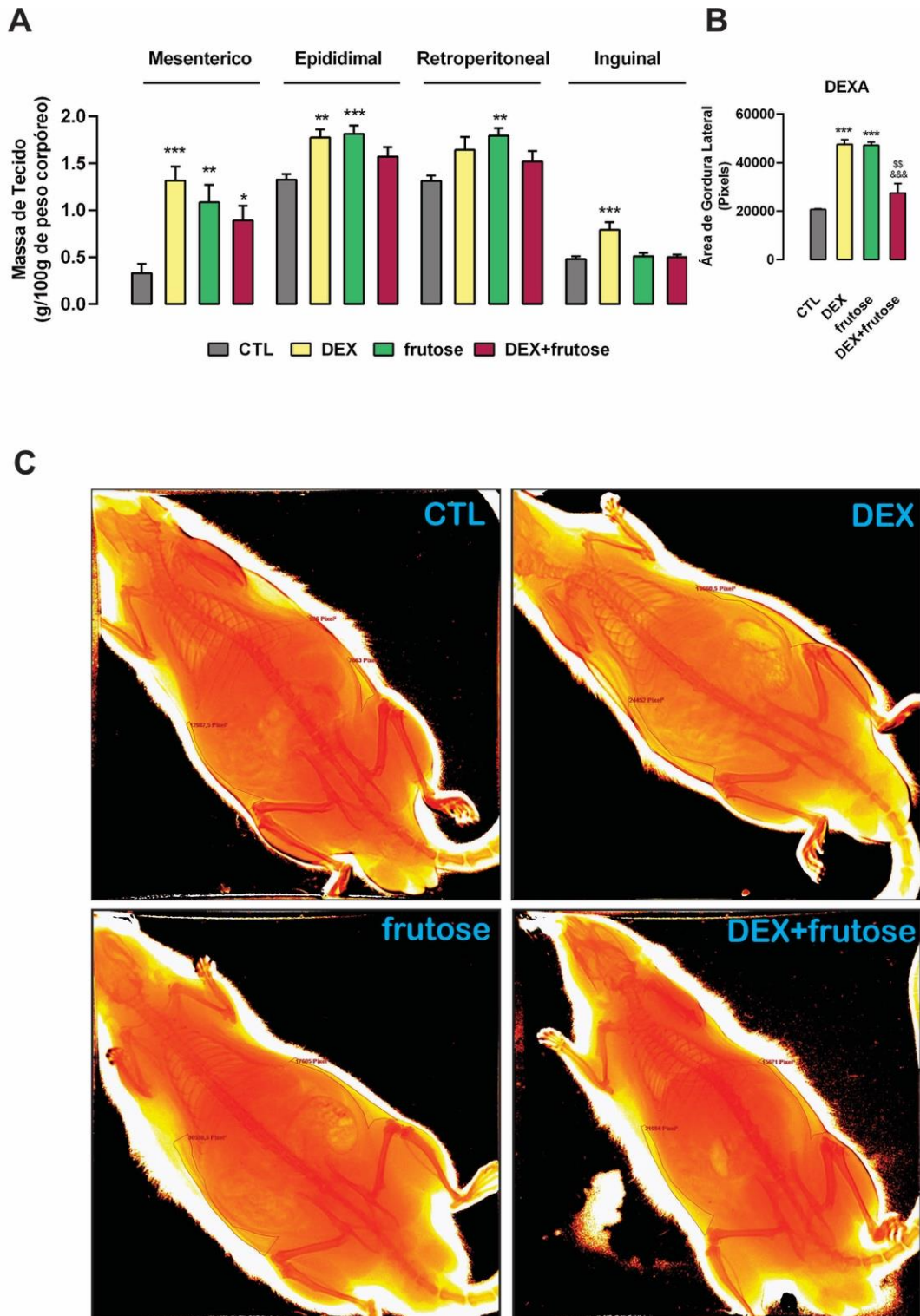
O consumo hídrico de 10% de frutose aumentou, ao passo que a ingestão alimentar diminuiu ao longo das 8 semanas comparado ao início do tratamento. (Figuras 6A e 6B).



**FIGURA 6: CONSUMO ALIMENTAR DA PROLE (A)** volume de frutose em ml/animal/24 horas durante 8 semana de tratamento. **(B)** ingestão alimentar em grama/animal/24 horas durante 8 semana de tratamento. A ingestão alimentar foi avaliada uma vez por semana e frutose de 2 a 3 vezes por semana e calculado pela diferença entre a oferta e a sobra em grama ou ml dividido pelo número de animais da caixa. CTL (controle), DEX (Tratado com Dexametasona na gestação, 200µg/kg de peso corpóreo/dia), frutose (Tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida), DEX+frutose (Tratado com Dexametasona na gestação, 200µg/kg de peso corpóreo/dia e posteriormente tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida). Os resultados são apresentados como a média ± SE.

### ***5.3 Adiposidade***

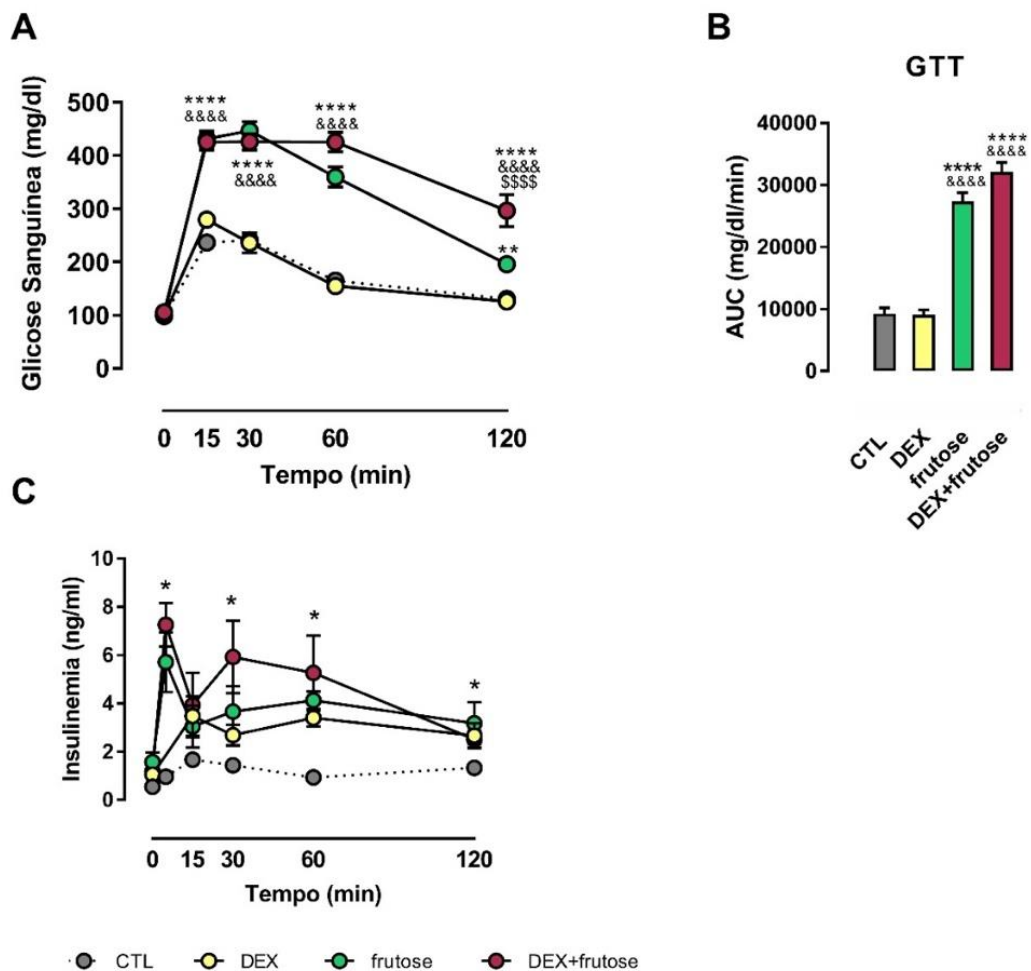
Não foi observado aumento do peso corporal, mas encontramos aumento na adiposidade, representada pelo aumento do mesentérico no grupo DEX, frutose e DEX+frutose (respectivamente 295,8 %,  $p<0,001$  e 225,81%,  $p<0,01$ , 167,77%,  $p<0,05$  superior ao CTL), epididimal nos grupos DEX, frutose (respectivamente 33,48%,  $p<0,001$  e 36,5%,  $p<0,01$ , acima de CTL), retroperitoneal no grupo frutose (36,70,  $p<0,001$ ), e inguinal no grupo DEX (64,82%,  $p<0,001$  acima do CTL) (Figura 7A) e da área de gordura lateral nos grupos DEX e frutose (respectivamente 130%,  $p<0,01$ , 128%,  $p<0,01$  e 115%,  $p<0,05$ , superior ao grupo CTL) (Figuras 7B e 7C).



**FIGURA 7: COMPOSIÇÃO CORPORAL DA PROLE:** (A) massa de tecido adiposo mesentérico, epididimal, retroperitoneal e inguinal da prole corrigido por 100 gramas de peso corporal (n = 10-30) (B) cálculo da área de gordura lateral obtida da técnica de imageamento DEXA (C) imagem representativa da Área de gordura lateral obtida da técnica de imageamento DEXA (n = 3). CTL (controle), DEX (Tratado com Dexametasona na gestação, 200µg/kg de peso corpóreo/dia), frutose (Tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida), DEX+frutose (Tratado com Dexametasona na gestação, 200µg/kg de peso corpóreo/dia e posteriormente tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida). Os resultados são apresentados como a média ± SE. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 vs. grupo CTL; \$ p<0,05, \$\$ p<0,01, \$\$\$ p<0,001 vs. frutose e & p<0,05, && p< 0, 01 vs. grupo DEX.

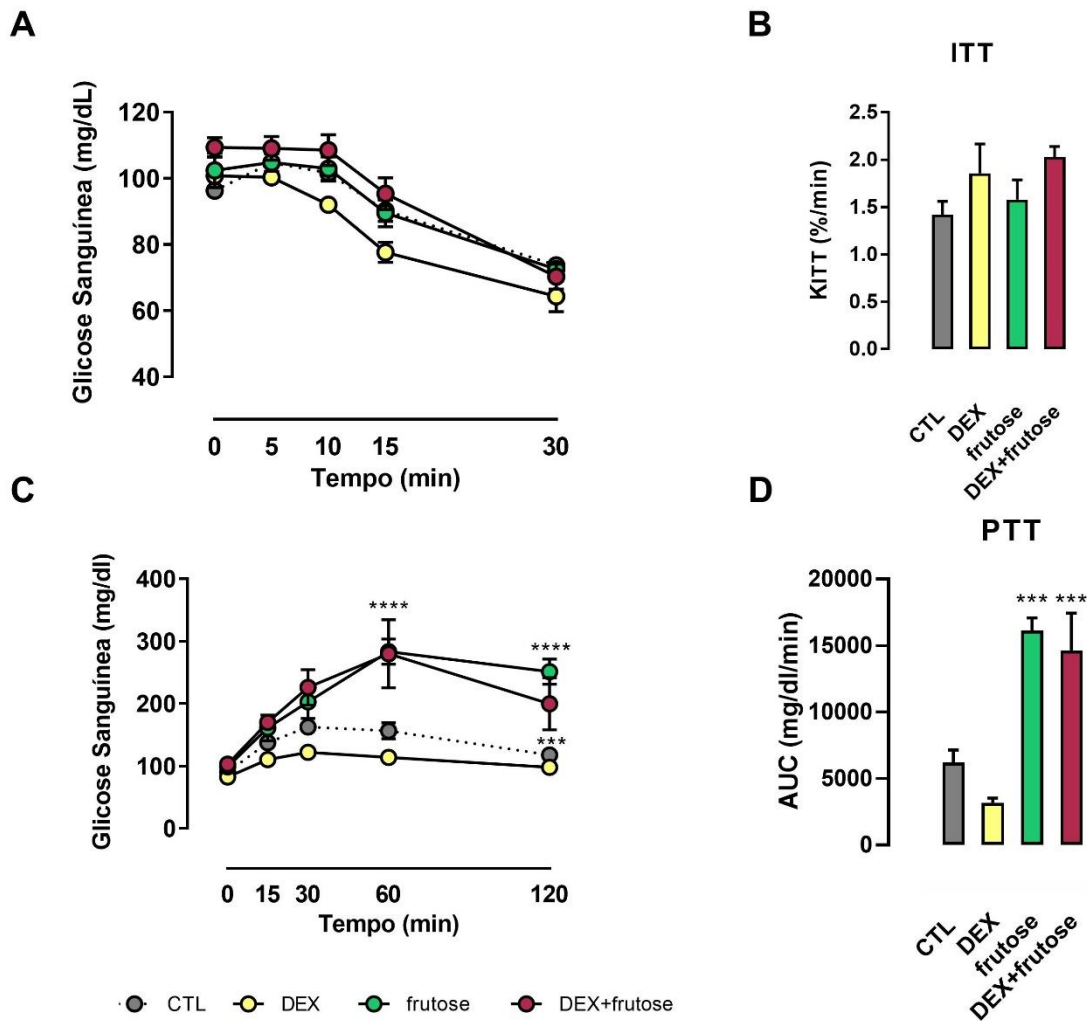
#### 5.4 Caracterização metabólica do modelo em estudo

Ao final do tratamento com frutose, avaliamos a tolerância dos animais à administração intraperitoneal de glicose, de insulina e de piruvato. Os grupos frutose e DEX+frutose apresentaram intolerância à glicose comparado ao grupo controle após sobrecarga de glicose (2 g glicose/kg de peso corporal) como observado na curva glicêmica e na área sob a curva (196,11%,  $p < 0,0001$  e 247,6%,  $p < 0,0001$  respectivamente, superior aos CTL) (Figuras 8A e 8B). Os níveis de insulina em jejum aumentaram nos grupos frutose e DEX+frutose estimulado pela carga de glicose intraperitoneal (Figura 8C).



**FIGURA 8: TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE (GTT): (A)** GTT da prole com 120 dias de vida após tratamento com solução de frutose 10% (frutose, DEX+ frutose) ou água (CTL ou DEX) ( $n = 5-8$ ), **(B)**, área sob a curva referente ao GTT ( $n = 5-8$ ). CTL (controle), DEX (Tratado com Dexametasona na gestação, 200 $\mu$ g/kg de peso corpóreo/dia), frutose (Tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida), DEX+frutose (Tratado com Dexametasona na gestação, 200 $\mu$ g/kg de peso corpóreo/dia e posteriormente tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida). Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SE. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. grupo CTL.

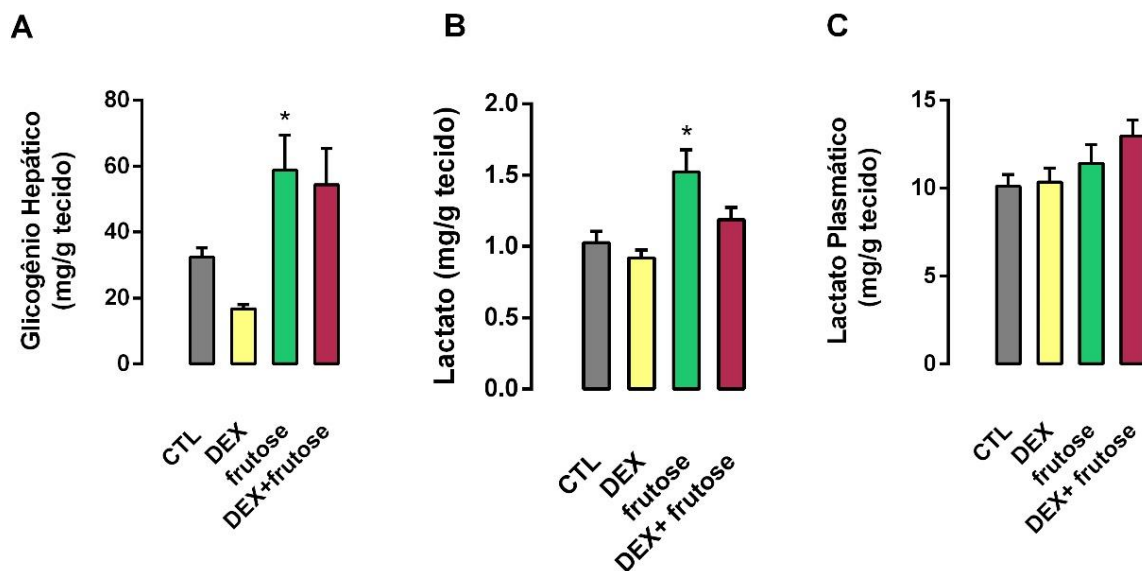
Os grupos frutose e DEX+frutose não exibiram intolerância a ação da insulina no nosso modelo experimental (Figuras 9A e 9B), porém apresentaram maior síntese de glicose a partir de piruvato (159,65 %,  $p < 0,001$  e 135,56 %,  $p < 0,001$  respectivamente, superior aos CTL). (Figuras 9 A e 9B).



**FIGURA 9: TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT) E AO PIRUVATO (PTT): (A)** curva glicêmica após estímulo intraperitoneal com insulina da prole com 120 dias de vida após tratamento com solução de frutose 10% (frutose, DEX+frutose) ou água (CTL, DEX) ( $n = 8-15$ ), **(B)** KITT da prole com 120 dias de vida ( $n = 8-15$ ), **(C)** curva glicêmica após estímulo intraperitoneal com piruvato **(D)** área sob a curva referente ao PTT ( $n = 5$ ). CTL (controle), DEX (Tratado com Dexametasona na gestação,  $200\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corpóreo/dia), frutose (Tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida), DEX+frutose (Tratado com Dexametasona na gestação,  $200\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corpóreo/dia e posteriormente tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida). Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SE\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  vs. grupo CC.

### 5.5 Glicogênio hepático, lactato e atividade máxima de enzimas

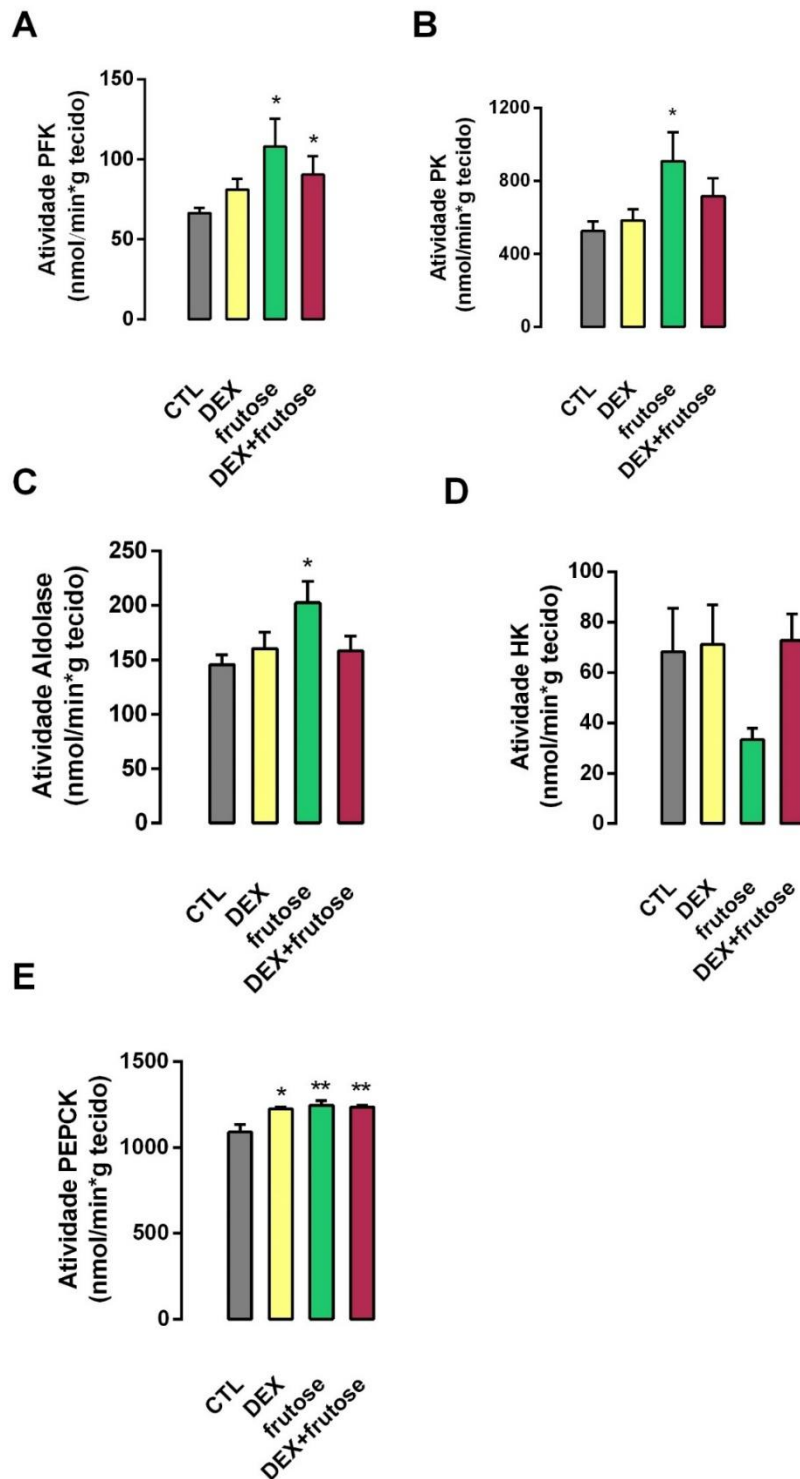
O conteúdo de glicogênio hepático aumentou no grupo frutose (81,72 %,  $p < 0,05$  maior que CTL), sem aumento no grupo DEX+frutose, apesar de apresentar uma tendência (Figura 10A). O lactato hepático foi 48,4 % superior no grupo frutose comparado ao CTL ( $p < 0,05$ ), mas não apresentou diferença no soro dos grupos avaliados (Figuras 10B e 10C).



**FIGURA 10: CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO E LACTATO HEPÁTICO E PLASMÁTICO.** Os ratos CTL, DEX, frutose e DEX+frutose foram submetidos a jejum durante 12 horas e a eutanásia com 120 dias de vida. **(A)** conteúdo de glicogênio hepático, **(B)** lactato hepático e **(C)** lactato plasmático. CTL (controle), DEX (Tratado com Dexametasona na gestação, 200µg/kg de peso corpóreo/dia), frutose (Tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida), DEX+frutose (Tratado com Dexametasona na gestação, 200µg/kg de peso corpóreo/dia e posteriormente tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida). Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SE. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,01$  vs. CC; &  $p < 0,05$ , &&  $p > 0,01$ , &&&  $p < 0,001$  versus grupo DX; \$\$  $p < 0,01$  vs. grupo CF (N = 5-13).

A atividade hepática máxima da fosfofructoquinase-1 (PFK-1) aumentou no fígado do grupo frutose e DEX+frutose (62,52 %;  $p < 0,05$ ; 49,73%;  $p < 0,05$  respectivamente maior ao CTL) e no grupo DEX+frutose (Figura 11A). A atividade hepática máxima da piruvato quinase (PK) foi maior no grupo frutose (72,47% maior comparado ao CTL,  $p < 0,05$ ) (Figura 11B). A atividade hepática da aldolase também aumentou apenas no grupo frutose. (39,07% maior comparado ao CTL,  $p < 0,05$ ) (Figura 11C), A atividade hepática máxima da HK não apresentou diferença significativamente entre os grupos (Figura 11D). A atividade máxima da PEPCK aumentou nos 3 grupos DEX, frutose, e DEX+frutose (12,48%;  $p < 0,05$ ; 14,5%;  $p < 0,01$  e 13,59 % respectivamente maior comparado ao CTL).



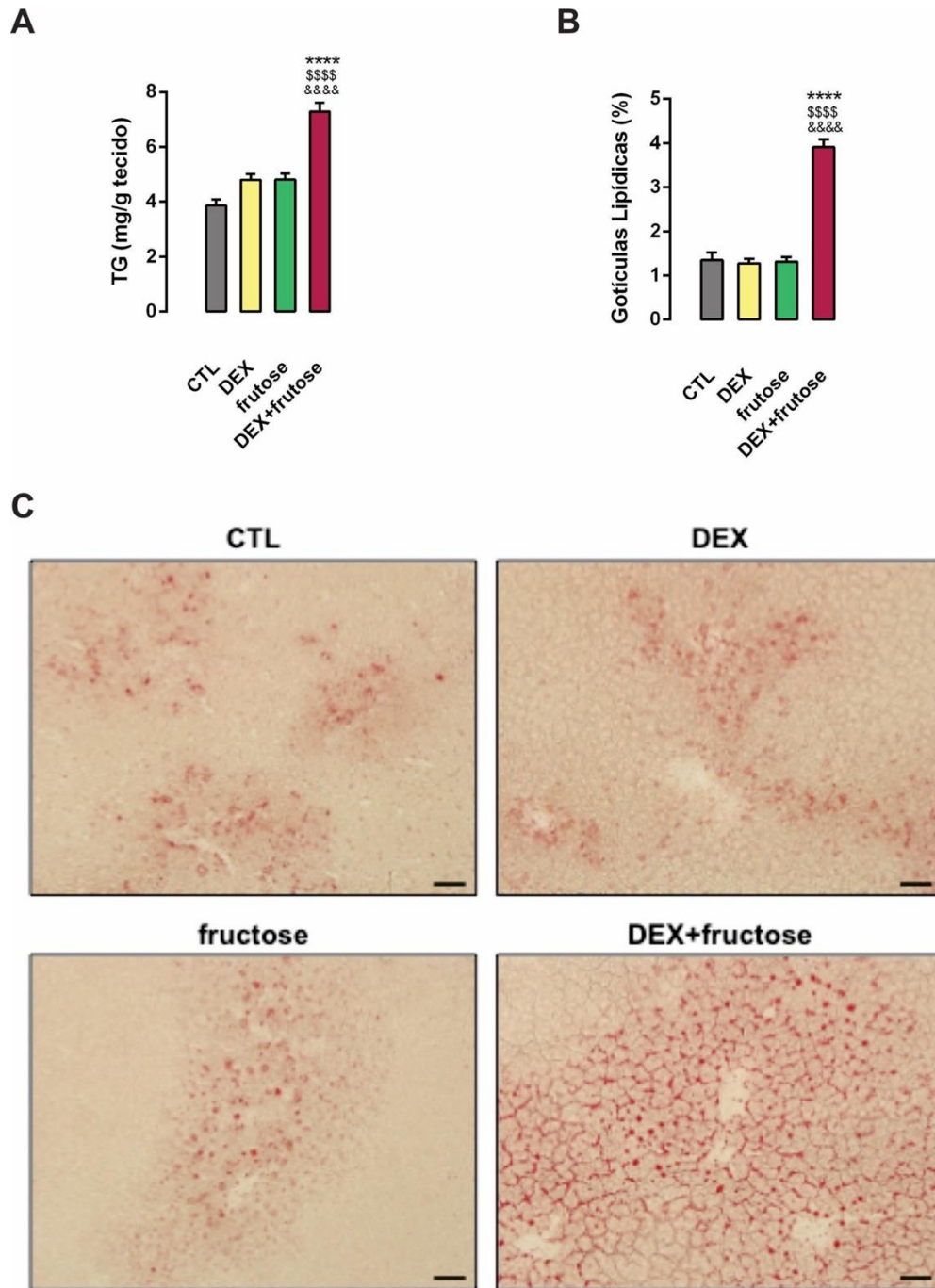


**FIGURA 11: ATIVIDADE HEPÁTICA DE PFK, PK, ALDOLASE, HK E PEPCK EM RATOS EXPOSTOS A DEX DURANTE A GRAVIDEZ E TRATADOS OU NÃO COM FRUTOSE NA VIDA ADULTA.** Os ratos CTL, DEX, frutose e DF foram submetidos a jejum durante 12 horas e submetidos a eutanásia com 16 semanas de idade. As amostras de fígado foram processadas para a medição das atividades de (A) PFK, (B) PK, (C) Aldolase, (D) HK, (E) PEPCK. CTL (controle), DEX (Tratado com Dexametasona na gestação, 200µg/kg de peso corpóreo/dia), frutose (Tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida), DEX+frutose (Tratado com Dexametasona na gestação, 200µg/kg de peso corpóreo/dia e posteriormente tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida). Os resultados são apresentados como a média ± SE. \* p < 0,05 vs. CTL (N = 10 -30).



### ***5.6 TG e imunohistoquímica do fígado***

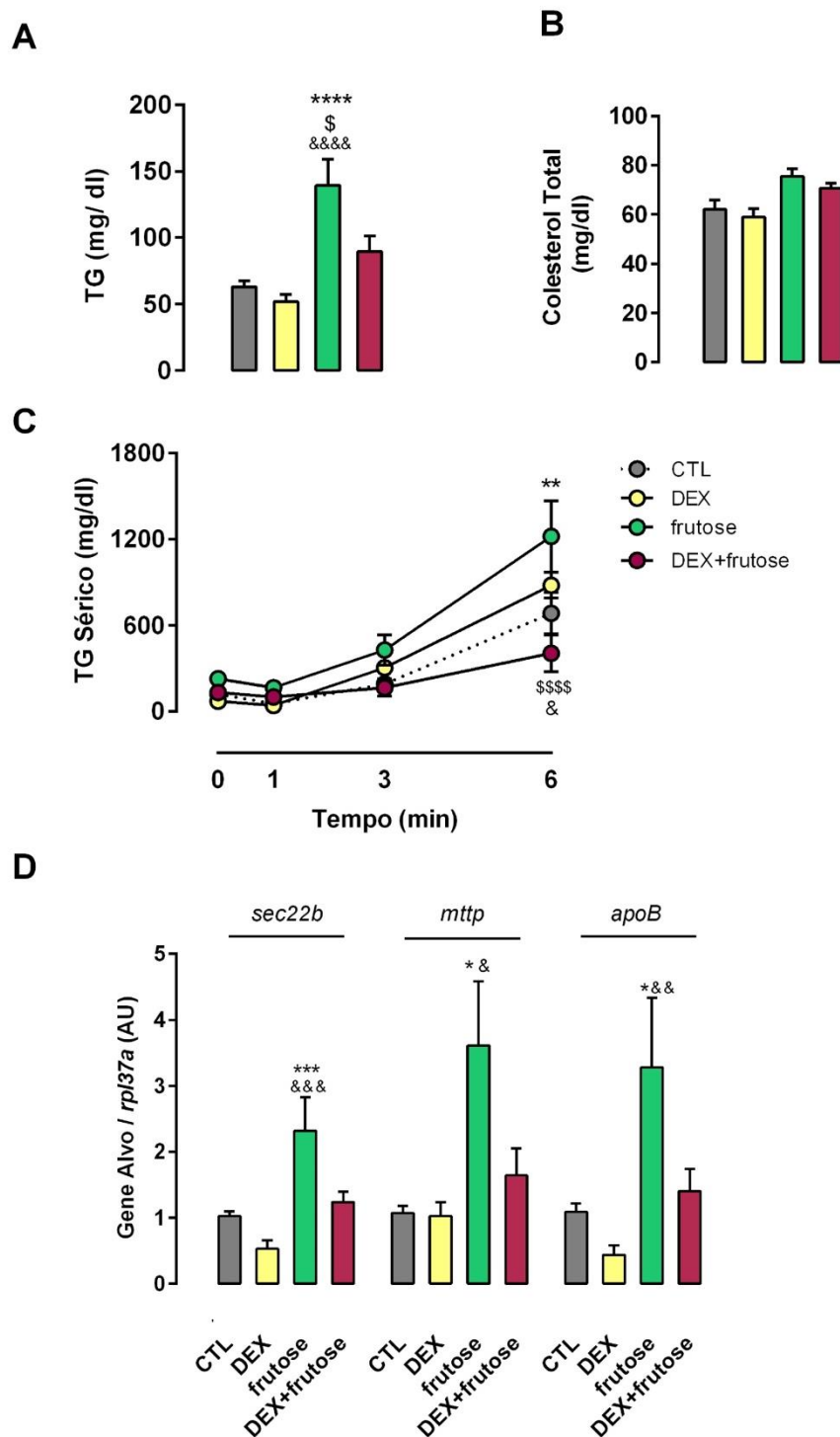
O conteúdo de TG hepáticos aumentou apenas em ratos DEX+frutose (88,32 % maior que CLT,  $p < 0,0001$ ; 51,80 % maior que frutose,  $p < 0,0001$ ) (Figura 12A); esse aumento também foi observado no grupo DEX+frutose por análise de secções de fígado coradas com Oil red O (190,2% maior que CLT,  $p < 0,0001$ ; 208,52% maior que DEX,  $p < 0,0001$ ; e 197,71% maior que frutose,  $p < 0,0001$ ) (Figuras 12B e 12C).



**FIGURA 12: PARÂMETROS RELACIONADOS AO METABOLISMO LIPÍDICO.** Os ratos CTL, DEX, frutose e DF foram submetidos a jejum durante 12 horas e submetidos a eutanásia com 16 semanas de idade. O lipídeo hepático foi extraído para dosagem de **(A)** triglicérides hepáticos. Um fragmento do fígado foi fixado para avaliar as **(B)** gotículas lipídicas após Oil red O.R.O **(C)** imagens de fragmentos do fígado. CTL (controle), DEX (Tratado com Dexametasona na gestação, 200µg/kg de peso corpóreo/dia), frutose (Tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida), DEX+frutose (Tratado com Dexametasona na gestação, 200µg/kg de peso corpóreo/dia e posteriormente tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida). Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SE. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,01$  vs. CC; &  $p < 0,05$ , &&  $p > 0,01$ , &&&  $p < 0,001$  versus grupo DX; \$\$  $p < 0,01$  vs. grupo CF (N = 5-13). (N = 10 -30).

### **5.7 TG sérico, secreção hepática de VLDL-TG e expressão gênica hepática de *sec22b*, *mttp* e *apoB*.**

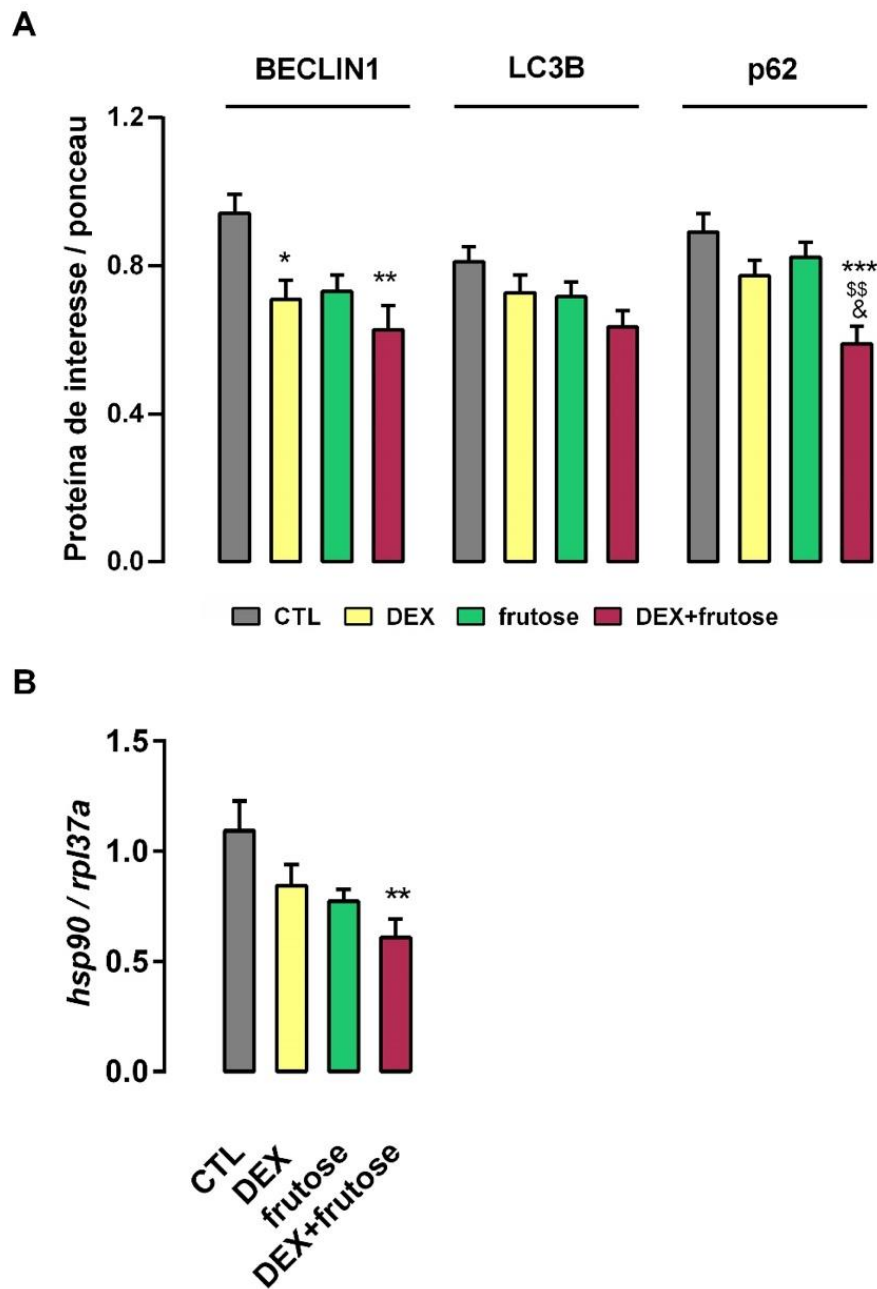
Os níveis de TG em jejum aumentou apenas no grupo frutose (121,76% superior ao CTL,  $p < 0,001$ ), como mostra a Figura 13A. Os níveis de colesterol não foram alterados nos três grupos experimentais em comparação ao CTL (Figura 13B). O grupo frutose apresentou maior capacidade de acumular TG no sangue comparado ao grupo CTL, representado pelo aumento das concentrações de TG em 6 horas após injeção de Tyloxapol. (Figura 13C). Já no grupo DEX+frutose foi observado resultado contrário, uma diminuição das concentrações de TG em 6 horas após injeção de Tyloxapol comparado ao DEX e frutose. A expressão dos genes *sec22*, *mttp* e *apoB*, envolvidos na secreção, montagem e síntese de VLDL, aumentaram no fígado do grupo frutose (respectivamente 126,71%,  $p < 0,001$ ; 76,3%,  $p < 0,05$ ; e 34,49%,  $p < 0,05$  em relação ao CTL), mas diminuiu ou não foi alterada no grupo DEX+frutose (*sec22b* foi 50% menor que frutose,  $p < 0,05$ , *mtp* foi 43,9% menor que frutose,  $p < 0,05$  e *apoB* foi 40% menor que frutose,  $p < 0,05$ ) (Figura 13D).



**FIGURA 13: PARÂMETROS LIPÍDICOS E PRODUÇÃO DE VLDL.** Os ratos CTL, DEX, frutose e DEX+frutose foram submetidos a jejum durante 12 horas e a eutanásia com 16 semanas de idade. O soro foi coletado para dosagem de **(A)** triglicérides e **(B)** colesterol Total. Após jejum os ratos foram submetidos à injeção de Tyloxapol para análise do **(C)** TG sérico. As amostras de fígado também foram utilizadas para extração de RNA para qPCR para análise da expressão gênica de **(D)** *sec22*, *mttp* e *apoB*. CTL (controle), DEX (Tratado com Dexametasona na gestação, 200µg/kg de peso corpóreo/dia), frutose (Tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida), DEX+frutose (Tratado com Dexametasona na gestação, 200µg/kg de peso corpóreo/dia e posteriormente tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida). Os resultados são apresentados como a média ± SE. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,01 vs. CC; & p < 0,05, && p > 0,01, &&& p < 0,001 versus grupo DX; \$\$ p < 0,01 vs. grupo CF (N = 5-13).

### **5.8 Autofagia**

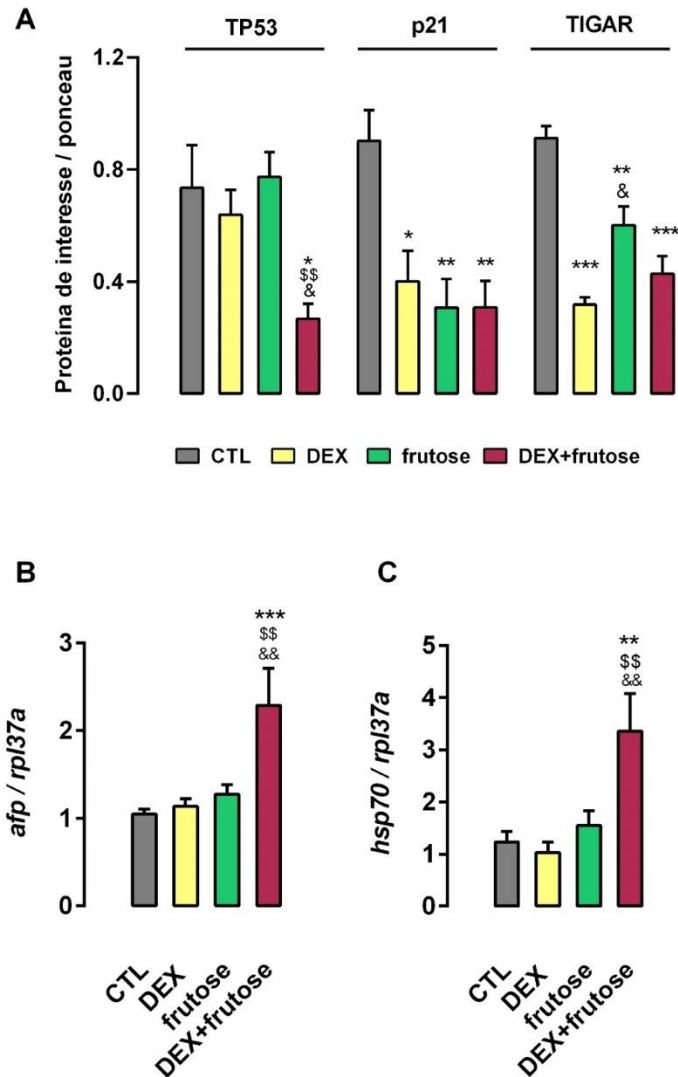
As proteínas beclin1, p62 e LC3B foram avaliadas para saber se a autofagia poderia estar desregulada no nosso modelo experimental e contribuir para o acúmulo de gotículas de gordura. A expressão proteica de beclin1 e p62 foram reduzidas no grupo DEX+frutose (respectivamente 33,39%,  $p < 0,01$ ; 33,94%,  $p < 0,001$  menor que o grupo CTL); não observamos diferença significativa na expressão da LC3 (Figura 14A). A expressão gênica de HSP90 é reduzida no grupo DEX+frutose (44,35%;  $p < 0,01$  menor que o grupo CTL) como mostra a figura 14B. As imagens representativas e respectivos ponceous encontram-se em anexo na figura 16 B.



**FIGURA 14: ANÁLISE DA VIA AUTOFÁGICA.** Os ratos CTL, DEX, frutose e DEX+frutose foram submetidos a jejum durante 12 horas e a eutanásia com 16 semanas de idade. O fígado foi processado para **(A)** westem blotting de BECLIN, LC3 e P62. CTL (controle), DEX (Tratado com Dexametasona na gestação, 200µg/kg de peso corpóreo/dia), frutose (Tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida), DEX+frutose (Tratado com Dexametasona na gestação, 200µg/kg de peso corpóreo/dia e posteriormente tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida). Os resultados são apresentados como a média ± SE. \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,01 vs. CC; & p <0,05, && p > 0,01, &&& p < 0,001 versus grupo DX; \$\$\$ p <0,01 vs. grupo CF (N = 5-13).

### 5.9 Marcadores Moleculares relacionados ao HCC

A expressão proteica de TP53, P21 e TIGAR diminuiu no grupo DEX+frutose, quando comparado ao CTL (Figura 15A). A expressão gênica *afp* e *hsp70* aumentaram apenas em DEX+frutose (respectivamente 118,8 %,  $p < 0,001$ ; 172,7%,  $p < 0,01$  maior que o grupo CTL) (Figuras 15B e 15C).



**FIGURA 15: ANÁLISE DOS MARCADORES MOLECULARES RELACIONADOS AO CARCINOMA HEPATOCELULAR.** Os ratos CTL, DEX, frutose e DEX+frutose foram submetidos a jejum durante 12 horas e a eutanásia com 16 semanas de idade. O fígado foi processado para (A) westem blotting de p53, p21 e TIGAR. As amostras de fígado também foram utilizadas para extração de RNA para qPCR para análise da expressão gênica de (B) CTL (controle), DEX (Tratado com Dexametasona na gestação, 200µg/kg de peso corpóreo/dia), frutose (Tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida), DEX+frutose (Tratado com Dexametasona na gestação, 200µg/kg de peso corpóreo/dia e posteriormente tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida). Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SE. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,01$  vs. CC; &  $p < 0,05$ , &&  $p > 0,01$ , &&&  $p < 0,001$  versus grupo DX; \$\$  $p < 0,01$  vs. grupo CF (N = 5-13).

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo descreve uma alteração metabólica única em que a exposição *in utero* à DEX leva a uma resposta exacerbada aos efeitos da frutose sobre o metabolismo lipídico hepático. Mostramos que a prole de mães tratadas com DEX no início da vida que consumiram frutose na idade adulta apresentam maior acúmulo de lipídeos e TGs hepáticos, disfunção autofágica e regulação dos marcadores tumorais envolvidos no desenvolvimento de HCC quando comparados a ratos expostos à frutose nascidos de mães não tratadas.

A composição corporal materna na desnutrição e no excesso de peso, além de outros fatores ambientais, contribui para o menor aporte de nutrientes e oxigênio para o feto (MCMILLEN; ROBINSON, 2005) e estão relacionados com a RCIU (NYIRENDA et al., 1998) e o menor peso ao nascer (HEERMAN et al., 2014). Assim, inicialmente avaliamos a evolução da massa corporal materna e da prole, e a composição corporal da prole após o consumo de frutose.

Observamos que os animais DEX não foram capazes de recuperar o peso corporal, independente do consumo de frutose. Além disso a exposição a 10% de frutose na água de beber por 8 semanas não alterou o peso corporal. Resultados semelhantes, utilizando a mesma concentração e tempo de tratamento, já foram publicados (SANTOS; FARAH, 2011). Nos nossos resultados ainda mostraram uma queda no consumo de ração em decorrência do consumo de frutose, indicando compensação calórica. Isso poderia ser explicado por que a ingestão de uma dieta que contém uma grande quantidade de frutose comparada com outra onde os carboidratos são substituídos permitindo a ingestão da mesma quantidade calórica, parece não exercer efeitos sobre o peso corporal (SIEVENPIPER et al., 2012).

Esta resposta também depende muito da concentração de frutose, tempo de tratamento e formas de exposição (ração ou água). Por exemplo, um trabalho realizado em ratos demonstrou que o consumo de água com 20% de frutose por 8 semanas induziu o ganho de peso corpóreo, deposição de tecido abdominal, incluindo o mesentérico, retroperitoneal e epididimal, hipertensão arterial e hiperglicemia (MAMIKUTTY et al., 2014). Em outro estudo, o consumo de frutose a 20% na água de beber por 8 semanas, além de aumentar o ganho de peso, elevou os níveis de TG, glicose sanguínea e adiposidade (SANDEVA et al., 2015).



Curiosamente, não observamos aumento da massa de gordura epididimal, retroperitoneal e inguinal no grupo DEX+frutose quando comparado ao CTL. Além disso, o consumo de frutose, apesar de aumentar a gordura visceral mesentérica, aumenta menos quando comparado ao grupo DEX ou frutose. Este resultado associado ao aumento da intolerância à glicose, maior síntese desta a partir do piruvato, aumento da insulina sérica após estímulo com glicose durante o GTT e aumento de TGs hepáticos indica que a glicose poderia estar sendo armazenada como TG preferencialmente no fígado do grupo DEX+frutose. Além disso, já é sabido que os ácidos graxos provenientes da lipólise do tecido adiposo visceral, liberados na circulação portal e drenados para fígado podem contribuir para o acúmulo de lipídeos hepáticos na DHGNA (LIM et al., 2010).

A RI é a característica mais comum para desenvolvimento e progressão da DHGNA (CHAO et al., 2019). Um estudo realizado por Mostarda e colaboradores (2012) utilizando 10% de frutose na água de beber por 10 semanas mostrou diminuição do kITT neste grupo. Apesar de não encontrarmos diferenças significativas no teste de ITT no nosso modelo, a insulinemia aumentou em DEX+frutose e frutose após estímulo com glicose durante o GTT, sugerindo resistência a ação da insulina nestes grupos.

Os lipídeos se acumulam no fígado quando a entrada/síntese de lipídios excede a sua utilização. Ou seja, o aumento da lipogênese de novo, aumento da reesterificação de ácidos graxos e glicerol da lipólise no TA, aumento da endocitose de TG mediada por LDL e diminuição da  $\beta$ -oxidação mitocondrial, diminuição da secreção de TG em partículas de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) contribuem isoladamente ou em conjunto para o acúmulo de gotículas lipídicas (HORST; SHERLIE, 2017).

Na medida em que não observamos aumento significativo de TGs séricos, avaliamos a secreção hepática de VLDL-TG pelo acúmulo de TG no sangue após um desafio com o tiloxapol, um inibidor da lipoproteína lipase (LPL). A transcrição gênica da LPL é estimulada pela insulina e glucagon nos adipócitos, e a proteína é translocada para capilares, onde aumenta a liberação dos lipídeos do VLDL e quilomicros para ser estocado nos adipócitos como TG (NASCIMENTO et al., 2008). Assim, o aumento de TG circulante após a inibição da LPL pelo tiloxapol reflete a produção e secreção de VLDL pelo fígado. Desta forma, o acúmulo de TG no fígado do grupo DEX+frutose pode ser explicado pela produção/secreção prejudicada de VLDL, pois exibem menor concentração sérica de TG após injeção de tiloxapol quando comparado ao grupo frutose e DEX+frutose.

Com a diminuição da produção/secreção de VLDL-TG, o TG não seria exportado para o tecido adiposo e seria acumulado no fígado. A diminuição da expressão de mttp, ApoB e sec22b confirmam esta hipótese, visto que são responsáveis pela produção, montagem e secreção de VLDL-TG. Em contrapartida, sugerimos que no grupo frutose o aumento da concentração sérica de TG após injeção de tiloxapol ocorreu pelo aumento de partículas de VLDL ao invés da depuração de TG do VLDL, já que este grupo não exibiu aumento de TG no fígado, exibiu aumento da expressão de mttp, apoB e sec22b e ainda apresentou aumento sérico de TG na ausência de tiloxapol.

No consumo crônico e excessivo de frutose, a maior parte dela é metabolizada no fígado. Sendo assim, tornou-se importante avaliar se o modelo adotado exhibe alterações nos passos metabólicos que conduzem ao destino da frutose. Após captação pelos hepatócitos, a frutose é fosforilada a frutose-1-fosfato pela enzima fosfofrutoquinase ou cetohecoquinase (HORST; SHERLIE, 2017). A clivagem de frutose-1-fosfato pela ALDOB e triocinase forma diidroxiacetona fosfato e gliceraldeído. O gliceraldeído é fosforilado em gliceraldeído 3-fosfato pela triose-cinase. Dependendo do estado alimentar, da genética e dos padrões alimentares, os destinos para o gliceraldeído 3-fosfato derivado da frutólise incluem a síntese de glicogênio pela glicogênese, glicose pela gliconeogênese, produção de lactato ou acetil-COA. Este último poderá ser oxidado a CO<sub>2</sub> no ciclo de Krebs ou convertido em ácidos graxos na lipogênese. (HORST et al., 2017).

Já era esperado que o consumo crônico de frutose levaria aumento no conteúdo de glicogênio hepático, sendo descrito resultados semelhantes em outros estudos (KOO *et al*;2008). Como não observamos no grupo DEX+frutose diferenças em relação ao lactato hepático e sérico e não observamos alteração significativa no glicogênio hepático, acreditamos que a maior parte da frutose absorvida está sendo metabolizada e armazenada como TG no fígado. O excesso de glicose associado ao aumento de insulina estimula a síntese de ácidos graxos e TG promovendo a formação de deposição de TG no fígado. Como vimos anteriormente essa deposição seria intensificada neste grupo pela redução na produção de VLDL.

No grupo frutose observamos aumento da atividade máxima da PFK, PK e ALDOLASE enzimas chaves da via glicolítica, e aumento do lactato hepático, o que indica que a frutose absorvida está sendo convertida em piruvato na via glicolítica e parcialmente convertida em lactato. A glicólise no fígado, diferentemente de outros tecidos, não ocorre apenas para a produção de energia, mas sim, em conjunto com a via

da pentose fosfato, para gerar piruvato, que será descarboxilado a Acetil-CoA conduzindo a síntese de ácidos graxos e finalmente à produção de VLDL-TG (SALWAY, 2009). Nossos resultados indicam que o estoque ocorre preferencialmente no tecido adiposo deste grupo, o que é corroborado pela maior massa de tecido adiposo epididimal, mesentérico e retroperitoneal no grupo frutose, quando comparado ao grupo DEX+frutose. Ademais, a via da glicólise inicia-se com a conversão da frutose em frutose 6-fosfato, sem a participação da HK; sendo assim a ausência de alteração desta enzima entre os grupos não invalida nossa hipótese.

A PEPCK hepática contribui de forma importante para a homeostasia da glicose. Ela catalisa a reação de descarboxilação do oxaloacetato a fosfoenolpiruvato transformando precursores metabólicos - como lactato, glicerol, glutamina e alanina - em glicose, processo conhecido como gliconeogênese (SALWAY, 2009). A atividade máxima desta enzima se mostrou aumentada em DEX, DEX+frutose e frutose comparada ao CTL, indicando aumento da gliconeogênese nestes grupos. Nos grupos frutose e DEX+frutose, o aumento da área sob a curva do teste de tolerância ao piruvato (PTT) reforçam esta hipótese.

No entanto o aumento da atividade máxima de PEPCK no grupo DEX não ocorreu em paralelo ao aumento da área sob a curva do PTT. Isso poderia ser explicado porque a PEPCK não tem função exclusiva na gliconeogênese, a sua principal função é na cataplerose (WANG; DONG, 2019) que consiste em converter intermediários do ciclo do ácido cítrico, como oxaloacetato em fosfoenolpiruvato fornecendo carbono para vários processos entre eles a gliceroneogênese (HANSON, 2009), crucial para a síntese de novo de glicerol 3-fosfato a partir de outros precursores além de glicose e glicerol (NYE; HANSON KALHAN, 2008) viabilizando a reeterificação de ácidos graxos, onde os ácidos graxos hidrolisados podem ser re-incorporados em TG nos adipócitos (WEBER et al., 2012). Alguns estudos mostram que a deleção genética da enzima conduz a perda drástica no tecido adiposo (HANSON, 2009).

Além disso, a expressão de PEPCK no fígado pode aumentar em resposta a DEX ou cortisol. Este passa pela membrana lipídica do fígado e liga-se ao receptor de GCs, dimeriza o complexo cortisol/GR, no núcleo une-se a região de elemento de resposta ao glicocorticoide (GRE) contribuindo para a maior síntese de PEPCK (WANG; DONG, 2019). A exposição a DEX durante o final da gravidez levou ao aumento de 25% da expressão de mRNA de GR e da expressão e atividade da PEPCK na prole (NYIRENDA et al., 1998).

Além da diminuição da produção de VLDL-TG, postulamos a hipótese de que o acúmulo de lipídeos hepáticos poderia ser decorrente de um prejuízo da autofagia nos hepatócitos. O fluxo autofágico defeituoso desempenha um papel importante no desenvolvimento de várias doenças metabólicas, entre elas a esteatose hepática em roedores (SINGH et al., 2009; YANG, 2010; DONG; CZAJA, 2015) e em humanos (GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2014). A degradação de componentes citoplasmáticos por meio do processo autofágico inicia-se com a formação do fagóforo, por um processo dependente de Beclin1. A diminuição da Beclin1, observada no grupo DEX+ frutose, é um indício de prejuízo na autofagia (KHAMBU et al., 2018).

Considerando a importância do processo autofágico na gênese e progressão de tumores, o prejuízo autofágico é considerado um mau prognóstico para HCC. Um estudo realizado em pacientes com HCC, 68,3% deles apresentaram redução na expressão de Beclin 1, sendo que o prognóstico de sobrevivência foi superior naqueles que apresentaram aumento na Beclin 1 (SHI et al., 2009).

A continuidade na expansão do fagóforo é mediada por muitas vias, uma delas inclui a conjugação de LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3). A diminuição da proteína LC3 em mamíferos poderia significar tanto prejuízo quanto aumento do fluxo autofágico (KLIONSKY et al., 2012), sendo assim ela não deve ser avaliada isoladamente, mas sim em conjunto com outros resultados. No nosso modelo não observamos diferença estatística da expressão desta proteína.

Após a expansão do fagóforo ocorre a degradação autofágica dos alvos transportados por proteínas adaptadoras como a p62. A degradação autofágica é inversamente correlacionada com os níveis de p62 (NISSAR et al, 2017). Nos nossos resultados a p62 mostrou-se reduzida, o que inicialmente poderia significar aumento do fluxo autofágico. Entretanto, é sabido que p62 é uma proteína adaptadora que regula a autofagia seletiva via seus domínios de interação com outras proteínas, e que sua atividade é finamente regulada por modificações pós-tradução (LIN et al, 2013). Dentre as modificações, a fosforilação nos resíduos Ser<sup>349</sup>, Ser<sup>403</sup> e Ser<sup>407</sup> são necessárias para a ligação dos substratos (LAMARK; SVENNING; JOHANSEN, 2017). A inibição da fosforilação da p62 nos resíduos Ser<sup>403</sup> e Ser<sup>407</sup> suprime a ligação com proteínas ubiquitinadas e previne a co-localização da p62 no fagóforo (WATANABE; TANAKA, 2017). Assim, a redução do conteúdo proteico de p62 observada no grupo DEX+ frutose

pode não refletir aumento da autofagia; a análise da fosforilação da p62 é necessária para elucidar este fenômeno.

Cabe aqui também destacar que HSF1 (*heat shock factor 1*) é um fator de transcrição que está envolvido na ativação da p62 (WATANABE; TANAKA, 2017). A fosforilação de p62 é mediada pela via de resposta ao estresse, onde a fosforilação de p62 é reduzida pela inibição de HSF1 (WATANABE; TANAKA, 2017). A atividade de HSF1 é regulada pela HSP90 (*heat shock protein 90*) (ALI et al., 1998), uma chaperona molecular que regula a estabilidade e função de diversas proteínas. Em células normais, HSP90 está envolvida no enovelamento de proteínas e na homeostasia celular. Em células tumorais, HSP90 facilita a expressão de oncogenes e inibe os processos de morte celular (KAPLAN & LI 2012; WHITESELL & LINDQUIST, 2005). Quanto maior a expressão de HSP90, maior será a fosforilação de p62 (WATANABE; TANAKA, 2017). Observamos menor expressão gênica de HSP90 no grupo DEX+frutose, sendo assim esperaríamos uma redução na fosforilação de p62, menor acoplamento de proteínas ubiquitinadas e menor colocalização de p62 com proteínas propensas a agregação, corroborando com o prejuízo autofágico.

Com o intuito de investigar se a dieta rica em frutose poderia favorecer o aparecimento de HCC nos animais expostos à DEX no período fetal, avaliamos algumas vias que relacionam a esteatose hepática ao HCC.

A proteína p53 é o mais conhecido supressor tumoral que regula positivamente o reparo de DNA e a parada do ciclo celular quando há estresse oncogênico e, em casos de exposição prolongada ao estresse, desencadeia a apoptose (VOUSDEN; PRIVES, 2009). Mais recentemente, sua ação na regulação de vias metabólicas vem sendo desvendada (BERKERS et al., 2013).

Um dos alvos metabólicos da p53 descrito foi o gene TIGAR (*TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator*) (BENSAAD et al., 2006). TIGAR catalisa a remoção do grupamento fosfato da frutose-2,6-bifosfato (F-2,6-BP), resultando na formação de frutose-6-fosfato (F-6-P) e conseqüente redução dos níveis intracelulares de (F-2,6-BP) (BENSAAD et al., 2006). F-2,6-BP é um regulador alósterico da PFK-1, que catalisa a adição de um fosfato à (F-6-P) para formar frutose-1,6-bifosfato (F-1,6-BP), um passo essencial da glicólise. Assim, sua ação resulta na inibição da glicólise. Assim, a redução de TIGAR observada no grupo DEX+frutose é paralela à redução de p53 e ao aumento da atividade da PFK-1, provavelmente por redução dos níveis de F-2,6-BP. Como

discutido anteriormente, a estimulação da via glicolítica gera Acetil-CoA, que pode ser direcionado para a síntese de ácidos graxos.

Sob o ponto de vista de resposta ao estresse celular, TIGAR promove a parada do ciclo celular por reduzir os níveis de ATP (MADAN et al., 2012). Esta ação é coordenada com as diversas funções antitumorais da p53. No fígado, devido à sua característica de ser um tecido dinâmico com exposição direta a nutrientes da dieta, as ações da p53 são complexas, e ainda não há consenso na literatura sobre sua função na regulação da homeostasia e disfunção hepática.

Devido à disponibilidade limitada de biopsias de fígado, os dados de expressão de p53 em pacientes com DHGNA são escassos. Um estudo de imuno-histoquímica conduzido em 84 pacientes mostrou uma discreta correlação positiva entre a expressão de p53 e a severidade da doença hepática (PANASIUK et al., 2006). Em camundongos, o primeiro relato da correlação entre p53 e a esteatose hepática foi descrito em um estudo observacional, onde foi observado a presença de p53 no núcleo em dois modelos de doença gordurosa hepática (YAHAGI et al., 2004). Evidências funcionais só apareceram a partir dos primeiros camundongos nocaute para p53, que morriam por volta do sexto mês de vida devido ao desenvolvimento de linfomas ou sarcomas severos (DONEYOWER et al., 1992).

Entretanto, o fenótipo hepático destes animais só foi estudado quase 20 anos depois (JIANG et al., 2011; WANG et al., 2013). Neste último trabalho, Wang e colaboradores demonstraram que camundongos jovens nocauteados para p53 desenvolvem esteatose hepática, que se mostrou mais pronunciada quando alimentados com dieta rica em gordura. Outros estudos, que utilizaram animais adultos com nocaute induzido por *p53-floxed*, também demonstraram a presença de hepato-esteatose com dieta regular, o que indicou que a deleção aguda de p53 no fígado é suficiente para produzir o acúmulo de lipídeos por mecanismos independentes de efeitos sobre o desenvolvimento ou de respostas adaptativas que podem ocorrer em modelos clássicos de nocaute (PORTEIRO et al., 2018; PROKESCH et al., 2017).

Consistente com a hipótese de que a p53 é importante para o controle da homeostase lipídica no fígado, tanto a ativação farmacológica (PORTEIRO et al., 2018) quanto a super-expressão induzida pelo *knockdown* do miR-21 - que reduz a expressão de p53 - (WU et al., 2016), resultaram na redução do conteúdo de lipídeos em camundongos alimentados com dieta rica em gordura. Em conjunto, as evidências

colocam p53 como regulador chave do metabolismo hepático de lipídeos, onde a redução de sua atividade aumenta e sua ativação atenua a esteatose hepática.

Como mencionado anteriormente, p53 exerce suas ações pela trans-ativação de vários genes inibidores do crescimento ou genes apoptóticos. A proteína p21, uma inibidora da cinase dependente de ciclina (CDK), é um alvo direto da p53 que medeia a parada do ciclo celular (DENG et al., 1995; BRUGAROLAS et al., 1995). Apesar de sua função importante de interromper a proliferação celular e de sua habilidade de promover a diferenciação e senescência, há fortes evidências de que, sob certas condições p21 pode promover a proliferação celular e a oncogenicidade (RONINSON, 2002). Assim, dependendo do contexto celular, p21 pode agir como supressor de tumor ou como oncogene. Nossos resultados mostraram que redução de p21 no grupo DEX+frutose paralela a expressão de p53, indicando assim que, neste grupo, a inibição da via é oncogênica.

Entretanto, nos grupos DEX e frutose, a redução da expressão da p21 ocorre independentemente da redução da p53. Além da regulação de p21 por p53, já é bem conhecido que ocorre regulação independente de p53 (ABBAS; DUTTA, 2009). A transcrição do gene codificador da p21 (*cdkn1a*) é também ativada por vários receptores nucleares, como receptor de retinóide, receptor de vitamina D e receptor de andrógenos. Os fatores de transcrição SP1, SP3, AP2, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , NeuroD1, GAX, HoXA10 e os STATs também regulam a expressão de p21, em resposta a uma grande variedade de estímulos. Além disso, vários fatores transcricionais cooperam com o co-ativador p300-CREBBP para a ativação do promotor de *cdkn1a* (ABBAS; DUTTA, 2009). Neste trabalho não investigamos o mecanismo pelo qual a redução da expressão de p21 não acompanhou a de p53 nos grupos DEX e frutose, mas certamente deve envolver pelo menos um mecanismo independente de p53.

Com o intuito de verificar se a redução da via p53-p21 poderia indicar potencial oncogênico no fígado de ratos DEX+frutose, avaliamos a expressão de alguns marcadores de HCC, a saber: alfa-feto proteína (AFP) e proteína de choque térmico 70 (HSP70) (ZHAO; JU; LI, 2013).

Diferentemente do teste sorológico para AFP, padrão ouro para diagnóstico precoce de HCC, a análise de AFP por mRNA é utilizada com eficácia em pacientes com HCC após cirurgia, para prever o surgimento de metástase, já que é considerado um marcador biológico para células ativas de HCC (NEGAHDARY et al., 2015).

Também observamos aumento da expressão gênica da HSP70 no grupo DEX+frutose. Assim como o AFP, HSP70 é um importante biomarcador para o HCC e a sua expressão foi detectada em mais de 70% dos casos da doença (ZHAO; JU; LI, 2013). Um estudo publicado por Diehl e colaboradores (2003) mostrou que ela inibiu a via da p53, impedindo a apoptose e contribuindo para o crescimento das células tumorais; ademais, a superexpressão dessa proteína está relacionada com metástase e mau prognóstico da doença (NEGAHDARY et al., 2015). Dessa forma, é provável que a exposição a DEX durante o desenvolvimento fetal potencializa os efeitos da frutose sobre as alterações no metabolismo lipídico hepático favorecendo o aparecimento de HCC.



## 7 CONCLUSÕES

A exposição pré-natal à DEX modula o metabolismo lipídico frente a alta ingestão de frutose na vida adulta. A prole de mães tratadas com DEX desenvolvem intolerância à glicose e aumento da gliconeogênese que, associados a redução na produção de VLDL e prejuízo na autofagia, conduzem ao acúmulo de gotículas lipídicas no fígado em resposta à ingestão de frutose. Como consequência, o consumo de frutose modula a expressão de marcadores moleculares relacionados ao metabolismo lipídico hepático que podem favorecer o desenvolvimento de HCC.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, T.; DUTTA, A. P21 in cancer: Intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 6, p. 400–414, 2009.

ALBERTI, K. G. M.; ZIMMET, P.; SHAW, J. Metabolic syndrome K. G. M. M. Alberti et al. Special Report Special report Diabetic Medicine Blackwell Publishing Ltd DME 23 0742-3071 Oxford, UK Blackwell Publishing, 2006 Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the In. **Abstract and Applied Analysis**, v. 2010, p. 469–480, 2010.

ALP, P.R.; NEWSHOLME, E.A.; ZAMMIT, V.A. Activities of citrate synthase and NAD<sup>+</sup>-linked and NADP<sup>+</sup>-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J* 1976, 154, 689-700.

ARENTSON-LANTZ, E. J.; ZOU, M.; TEEGARDEN, D.; BUHMAN, K. K.; DONKIN, S. S. Maternal high fructose and low protein consumption during pregnancy and lactation share some but not all effects on early-life growth and metabolic programming of rat offspring. **Nutrition Research**, v. 36, n. 9, p. 937–946, 2016.

BARET, G.; PEYRONNET, J.; GRASSI-KASSISSE, D.; DALMAZ, Y.; WIERNSPERGER, N.; GÉLOËN, A. Increased intraabdominal adipose tissue mass in fructose fed rats: Correction by metformin. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 110, n. 6, p. 298–303, 2002.

BARKER, D. J. P. The Developmental Origins of Adult Disease. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. September, p. 588S-595S, 2004.

BARROWS, B. R.; PARKS, E. J. Contributions of different fatty acid sources to very low-density lipoprotein-triacylglycerol in the fasted and fed states. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 91, n. 4, p. 1446–1452, 2006.

BENEDIKTSSON, R. et al. Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *The Lancet*, v. 341, n. 8841, p. 339–341, 1993.

BENSAAD, K.; TSURUTA, A.; SELAK, M. A.; VIDAL, M. N. C.; NAKANO, K.; BARTRONS, R.; GOTTLIEB, E.; VOUSDEN, K. H. TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis. **Cell**, v. 126, n. 1, p. 107–120, 2006.

BERGMEYER HU, Bernt E. Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase. In: Bergmeyer HU, editor. **Methods of Enzymatic Analysis**. New York: Academic Press; 1974. pp. 1205–1215. [[Google Scholar](#)]

BERGMEYER, H.U.; BERNT, E.; HESS, B. Lactic Dehydrogenase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd ed.; Bergmeyer, H.U., Ed.; Verlag Chemie: Germany, 1965 (e-book).

BERKERS, C. R.; MADDOCKS, O. D. K.; CHEUNG, E. C.; MOR, I.; VOUSDEN, K. H. Metabolic regulation by p53 family members. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 5, p. 617–633, 2013.

BONAMIN, L. V.; MORAES, C. L. DE; SANCHES, F.; CARDOSO, T. N.; SATO, C.; DURAN FILHO, C.; MARTINI, L. C. Rats Born to Mothers Treated with Dexamethasone 15 cH Present Changes in Modulation of Inflammatory Process. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1–10, 2012.

BONEY, C. M. Metabolic Syndrome in Childhood: Association With Birth Weight, Maternal Obesity, and Gestational Diabetes Mellitus. **Pediatrics**, v. 115, n. 3, p. e290–e296, 2005.

BORÉN, J.; TASKINEN, M. R.; OLOFSSON, S. O.; LEVIN, M. Ectopic lipid storage and insulin resistance: A harmful relationship. **Journal of Internal Medicine**, v. 274, n. 1, p. 25–40, 2013.

BRAY GA. Fructose--how worried should we be?. **Medscape J Med**. Jul 9;v.10. n.7, p.159. 2008

BRUCE, K. D.; BYRNE, C. D. The metabolic syndrome: Common origins of a multifactorial disorder. **Postgraduate Medical Journal**, v. 85, n. 1009, p. 614–621, 2009.

BURGIO, E.; LOPOMO, A.; MIGLIORE, L. Obesity and diabetes: from genetics to epigenetics. **Molecular biology reports**, v. 42, n. 4, p. 799–818, 2015.

BURTON, P. J.; WADDELL, B. J. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the rat placenta: developmental changes and the effects of altered glucocorticoid exposure. **The Journal of endocrinology**, v. 143, n. 3, p. 505–13, 1994.

CALICETI, C.; CALABRIA, D.; RODA, A.; CICERO, A. F. G. Fructose intake, serum uric acid, and cardiometabolic disorders: A critical review. **Nutrients**, v. 9, n. 4, p. 1–15, 2017.

CANANI, R. B. et al. Epigenetic mechanisms elicited by nutrition in early life. **Nutrition Research Reviews**, v. 24, n. 2, p. 198–205, 2011.

CHAO, H.-W.; CHAO, S.-W.; LIN, H.; KU, H.-C.; CHENG, C.-F. Homeostasis of Glucose and Lipid in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, p. 298, 2019.

CHAPMAN, K.; HOLMES, M.; SECKL, J. 11 -Hydroxysteroid Dehydrogenases: Intracellular Gate-Keepers of Tissue Glucocorticoid Action. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 3, p. 1139–1206, 2013.

CLAYTON, Z. E.; VICKERS, M. H.; BERNAL, A.; YAP, C.; SLOBODA, D. M. Early life exposure to fructose alters maternal, fetal and neonatal hepatic gene expression and leads to sex-dependent changes in lipid metabolism in rat offspring. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–28, 2015.

CLEASBY, M. E.; KELLY, P. A. T.; WALKER, B. R.; SECKL, J. R. Programming of rat muscle and fat metabolism by in utero overexposure to glucocorticoids. **Endocrinology**, v. 144, n. 3, p. 999–1007, 2003.

COUCHEPIN, C.; KIM-ANNE, L. Ê.; BORTOLOTTI, M.; ENCARNACAO, J. A. DA; OBONI, J. B.; TRAN, C.; SCHNEITER, P.; TAPPY, L. Markedly blunted metabolic effects of fructose in healthy young female subjects compared with male subjects. **Diabetes Care**, v. 31, n. 6, p. 1254–1256, 2008.

DENG, C.; ZHANG, P.; WADE HARPER, J.; ELLEDGE, S. J.; LEDER, P. Mice Lacking p21 CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. **Cell**, v. 82, n. 4, p. 675–684, 1995.

DIEHL, J. A.; YANG, W.; RIMERMAN, R. A.; XIAO, H.; EMILI, A. Hsc70 Regulates Accumulation of Cyclin D1 and Cyclin D1-Dependent Protein Kinase. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 5, p. 1764–1774, 2003.

DING, Z. BIN; SHI, Y. H.; ZHOU, J.; QIU, S. J.; XU, Y.; DAI, Z.; SHI, G. M.; WANG, X. Y.; KE, A. W.; WU, B.; FAN, J. Association of autophagy defect with a malignant phenotype and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. **Cancer Research**, v. 68, n. 22, p. 9167–9175, 2008.

DONG, B.; SINGH, A. B.; AZHAR, S.; SEIDAH, N. G.; LIU, J. High-fructose feeding promotes accelerated degradation of hepatic LDL receptor and hypercholesterolemia in hamsters via elevated circulating PCSK9 levels. **Atherosclerosis**, v. 239, n. 2, p. 364–374, 2015.

DONG, H.; CZAJA, M. J. Regulation of lipid droplets by autophagy. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 22, n. 6, p. 234–240, 2011.

DORNAS, W. C.; LIMA, W. G. DE; PEDROSA, M. L.; SILVA, M. E. Health Implications of High-Fructose Intake. v. 1, 2015.

DOUARD, V.; CUI, X. L.; SOTEROPOULOS, P.; FERRARIS, R. P. Dexamethasone sensitizes the neonatal intestine to fructose induction of intestinal fructose transporter (Slc2A5) function. **Endocrinology**, v. 149, n. 1, p. 409–423, 2008.

EXTON, J.; MILLER, T.; HARPER, S.; PARK, C. Carbohydrate metabolism in perfused livers of adrenalectomized and steroid-replaced rats. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 230, n. 1, p. 163–170, 2017.

FAEH, D.; MINEHIRA, K.; SCHWARZ, J. M.; PERIASAMY, R.; PARK, S.; TAPPY, L. Erratum: Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men (Diabetes (2005) 54, (1907-1913)). **Diabetes**, v. 55, n. 2, p. 563, 2006.

FOWDEN, A. L.; VALENZUELA, O. A.; VAUGHAN, O. R.; JELLYMAN, J. K.; FORHEAD, A. J. Glucocorticoid programming of intrauterine development. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 56, p. S121–S132, 2016.

G., L.; R., T. Fructose consumption and consequences for glycation, plasma triacylglycerol, and body weight: Meta-analyses and meta-regression models of intervention studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 5, p. 1419–1437, 2008.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Living with the past: Evolution, development, and patterns of disease. **Science**, v. 305, n. 5691, p. 1733–1736, 2004.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A. *et al.* Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD. **Cell Death and Disease**, v. 5, n. 4, 2014.

GUIMARAES, P. S.; OLIVEIRA, M. F.; BRAGA, J. F.; NADU, A. P.; SCHREIHOFFER, A.; SANTOS, R. A. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Increasing angiotensin-(1-7) levels in the brain attenuates metabolic syndrome-related risks in fructose-fed rats. **Hypertension**, v. 63, n. 5, p. 1078–1085, 2014.

GUZMÁN, C.; CABRERA, R.; CÁRDENAS, M.; LARREA, F.; NATHANIELSZ, P. W.; ZAMBRANO, E. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. **Journal of Physiology**, v. 572, n. 1, p. 97–108, 2006.

HANOVER LM1, WHITE JS. Manufacturing, composition, and applications of fructose. **Am J Clin Nutr**, v.58, n.5, p.724S-732S. 1993

HANSON, R. W. Thematic Minireview Series: A Perspective on the Biology of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase 55 Years After Its Discovery. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 40, p. 27021–27023, 2009.

HEERMAN, W. J. *et al.* Interaction between maternal prepregnancy body mass index and gestational weight gain shapes infant growth. **Academic Pediatrics**, v. 14, n. 5, p. 463–470, 2014.

HIRANO, T.; MAMO, J.; POAPST, M.; STEINER, G. Very-low-density lipoprotein triglyceride kinetics in acute and chronic carbohydrate-fed rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 255, n. 3, p. E236–E240, 1988.

HOLMES, M. C. The Mother or the Fetus? 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Null Mice Provide Evidence for Direct Fetal Programming of Behavior by Endogenous Glucocorticoids. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 14, p. 3840–3844, 2006.

HORST, K. W. Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 981, 2017.

HORST, K. W. TER; GALEN, K. A. VAN; GILIJAMSE, P. W.; HARTSTRA, A. V.; GROOT, P. F. DE; VALK, F. M. VAN DER; ACKERMANS, M. T.; NIEUWDORP, M.; ROMIJN, J. A.; SERLIE, M. J. Methods for quantifying adipose tissue insulin resistance in overweight/obese humans. **International Journal of Obesity**, v. 41, n. 8, p. 1288–1294, 2017.

HUANG, P. L. A comprehensive definition for metabolic syndrome. **Disease Models & Mechanisms**, v. 2, n. 5–6, p. 231–237, 2009.

HWANG, I. S.; HO, H.; HOFFMAN, B. B.; REAVEN, G. M. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. **Hypertension**, v. 10, n. 5, p. 512–516, 1987.

IIZUKA, K.; HORIKAWA, Y. ChREBP: A Glucose-activated Transcription Factor Involved in the Development of Metabolic Syndrome. **Endocrine Journal**, v. 55, n. 4, p. 617–624, 2008.

INSEL PM, TURNER RE, ROSS D. Nutrition. 3<sup>a</sup> ed. Sudbury, Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers, Inc.; cop.2007

ITH, M.; KREIS, R.; FAEH, D.; BORTOLOTTI, M.; TRAN, C.; BOESCH, C.; TAPPY, L. Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 1, p. 1760–1765, 2009.

JANG, C.; HUI, S.; LU, W.; COWAN, A. J.; MORSCHER, R. J.; LEE, G.; LIU, W.; TESZ, G. J.; BIRNBAUM, M. J.; RABINOWITZ, J. D. The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 2, p. 351–361.e3, 2018.

JEGATHEESAN, P.; BANDT, J. P. DE. Fructose and NAFLD: The multifaceted aspects of fructose metabolism. **Nutrients**, v. 9, n. 3, p. 1–13, 2017.

JIANG, P.; DU, W.; WANG, X.; MANCUSO, A.; GAO, X.; WU, M.; YANG, X. P53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 3, p. 310–316, 2011.

KANG, H. J. *et al.* ChREBP regulates fructose-induced glucose production independently of insulin signaling. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 11, p. 4372–4386, 2016.

KAPLAN, K. B.; LI, R. A prescription for “stress” - the role of Hsp90 in genome stability and cellular adaptation. **Trends in Cell Biology**, v. 22, n. 11, p. 576–583, 2012.

KHAMBU, B.; YAN, S.; HUDA, N.; LIU, G.; YIN, X.-M. Autophagy in non-alcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease. **Liver Research**, v. 2, n. 3, p. 112–119, 2018.

KLIONSKY *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. **Autophagy** 8:4, 445–544; April 2012

LAMARK, T.; SVENNING, S.; JOHANSEN, T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. **Essays In Biochemistry**, v. 61, n. 6, p. 609–624, 2017.

LAMBERT, J. E.; RAMOS-ROMAN, M. A.; BROWNING, J. D.; PARKS, E. J. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 146, n. 3, p. 726–735, 2014.

LANGLEY-EVANS, S. C.; PHILLIPS, G. J.; BENEDIKTSSON, R.; GARDNER, D. S.; EDWARDS, C. R. W.; JACKSON, A. A.; SECKL, J. R. Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat. **Placenta**, v. 17, n. 2–3, p. 169–172, 1996.

LAWLOR, D. A. et al. Epidemiologic evidence for the fetal overnutrition hypothesis: Findings from the Mater-University study of pregnancy and its outcomes. **American Journal of Epidemiology**, v. 165, n. 4, p. 418–424, 2007.

LEBENTHAL, E.; SUNSHINE, P.; KRETCHMER, N. Effect of carbohydrate and corticosteroids on activity of -glucosidases in intestine of the infant rat. **The Journal of clinical investigation**, v. 51, n. 5, p. 1244–1250, 1972.

LESAGE, J.; BLONDEAU, B.; GRINO, M.; BRÉANT, B.; DUPOUY, J. P. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. **Endocrinology**, v. 142, n. 5, p. 1692–1702, 2001. LEVOY, M. Color I: trichromatic theory. **Digital Photography**, n. April, p. 445–544, 2011.

LI, M.; REYNOLDS, C. M.; SEGOVIA, S. A.; GRAY, C.; VICKERS, M. H. Developmental Programming of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Effect of Early Life Nutrition on Susceptibility and Disease Severity in Later Life. **BioMed Research International**, v. 2015, n. 2, p. 1–12, 2015.

LIM, J. S.; MIETUS-SNYDER, M.; VALENTE, A.; SCHWARZ, J. M.; LUSTIG, R. H. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, n. 5, p. 251–264, 2010.

LIN, X.; LI, S.; ZHAO, Y.; MA, X.; ZHANG, K.; HE, X.; WANG, Z. Interaction Domains of p62: A Bridge Between p62 and Selective Autophagy. **DNA and Cell Biology**, v. 32, n. 5, p. 220–227, 2013.

LING, C.; GROOP, L. Epigenetics: A molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 58, n. 12, p. 2718–2725, 2009.

LUO, Z.-C. Mechanisms of developmental programming of the metabolic syndrome and related disorders. **World Journal of Diabetes**, v. 1, n. 3, p. 89, 2010.

MADAN, E.; GOGNA, R.; KUPPUSAMY, P.; BHATT, M.; PATI, U.; MAHDI, A. A. TIGAR induces p53-mediated cell-cycle arrest by regulation of RB-E2F1 complex. **British Journal of Cancer**, v. 107, n. 3, p. 516–526, 2012.

MAMIKUTTY, N. et al. The Establishment of Metabolic Syndrome Model by Induction of Fructose Drinking Water in Male Wistar Rats. v. 2014, p. 1–8, 2014.

MARTIN-GRONERT, M. S.; OZANNE, S. E. Experimental IUGR and later diabetes. **Journal of Internal Medicine**, v. 261, n. 5, p. 437–452, 2007.

MCGARRY, J. D. Ketogenesis and Lipogenesis: Metabolic Integration in Health and Disease. **Biochemical Society Transactions**, n. i, 1995.

MCMILLEN, I.; ROBINSON, J. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 2, p. 571–633, 2005.

MILLER, A.; ADELI, K. Dietary fructose and the metabolic syndrome - **Curr Opin Gastroenterol** - 2008.pdf. 2008.

MISRA, A.; KHURANA, L. Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 11 SUPPL. 1, p. 9–30, 2008.

MONTEIRO, C. A.; CONDE, W. L.; POPKIN, B. M. The Burden of Disease from Undernutrition and Overnutrition in Countries Undergoing Rapid Nutrition Transition: A View from Brazil. **American Journal of Public Health**, v. 94, n. 3, p. 433–434, 2004.

MORRIS, M.; ARAUJO, I. C.; POHLMAN, R. L.; MARQUES, M. C.; RODWAN, N. S.; FARAH, V. M. A. Timing of fructose intake: An important regulator of adiposity. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 39, n. 1, p. 57–62, 2012.

MOZAFFARIAN, D.; HAO, T.; RIMM, E. B.; WILLETT, W. C.; HU, F. B. Changes in Diet and Lifestyle and Long-Term Weight Gain in Women and Men. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 25, p. 2392–2404, 2011.

NAKAGAWA, H.; HAYATA, Y.; KAWAMURA, S.; YAMADA, T.; FUJIWARA, N.; KOIKE, K. Lipid Metabolic Reprogramming in Hepatocellular Carcinoma. **Cancers**, v. 10, n. 11, p. 447, 2018.

NAKAGAWA, T. *et al.* A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 290, n. 3, p. F625–F631, 2006.

NAKATSUKA, A. *et al.* RXR antagonism induces G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cell cycle arrest and ameliorates obesity by up-regulating the p53-p21<sup>Cip1</sup> pathway in adipocytes. **Journal of Pathology**, v. 226, n. 5, p. 784–795, 2012.

NEGAHDARY, M.; EFTEKHARI, A.; MIRZAEI, S.; BASIRIZADEH, M.; GHOBADZADEH, S. Tumor Markers and Hepatocellular Carcinoma. **Journal of Biology and Today's World**, v. 4, n. 6, p. 124–131, 2015.

NISSAR, A. U.; SHARMA, L.; MUDASIR, M. A.; NAZIR, L. A.; UMAR, S. A.; SHARMA, P. R.; VISHWAKARMA, R. A.; TASDUQ, S. A. Chemical chaperone 4-phenyl butyric acid (4-PBA) reduces hepatocellular lipid accumulation and lipotoxicity through induction of autophagy. **Journal of lipidic Research**, v. 58, n.9, p. 1855–1868, 2017

NYE, C. K.; HANSON, R. W.; KALHAN, S. C. Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 41, p. 27565–27574, 2008.



NYIRENDA, M. J. et al. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 10, p. 2174–2181, 1998.

NYIRENDA, M. J. et al. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 10, p. 2174–2181, 1998.

NYIRENDA, M. J. et al. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 10, p. 2174–2181, 1998.

PAN, M.; CEDERBAUM, A. I.; ZHANG, Y. L.; GINSBERG, H. N.; WILLIAMS, K. J.; FISHER, E. A. Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 9, p. 1277–1287, 2004.

PANASIUK, A.; DZIECIOL, J.; PANASIUK, B.; PROKOPOWICZ, D. Expression of p53, Bax and Bcl-2 proteins in hepatocytes in non-alcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 38, p. 6198–6202, 2006.

PANTALEÃO, L. C. *et al.* Prolonged fasting elicits increased hepatic triglyceride accumulation in rats born to dexamethasone-Treated mothers. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

PARKS, E. J.; HELLERSTEIN, M. K. Thematic review series: Patient-Oriented Research. Recent advances in liver triacylglycerol and fatty acid metabolism using stable isotope labeling techniques. **Journal of Lipid Research**, v. 47, n. 8, p. 1651–1660, 2006.

PEREIRA, R. M.; BOTEZELLI, J. D.; CRUZ RODRIGUES, K. C. DA; MEKARY, R. A.; CINTRA, D. E.; PAULI, J. R.; SILVA, A. S. R. DA; ROPELLE, E. R.; MOURA, L. P. DE. Fructose consumption in the development of obesity and the effects of different protocols of physical exercise on the hepatic metabolism. **Nutrients**, v. 9, n. 4, p. 1–21, 2017.

PINNEY, S. E.; SIMMONS, R. A. Metabolic programming, Epigenetics, and gestational diabetes mellitus. **Current Diabetes Reports**, v. 12, n. 1, p. 67–74, 2012.

POPKIN, B. M.; ADAIR, LI. S.; NG, S. W. NOW AND THEN: The Global Nutrition Transition: The Pandemic of Obesity in Developing Countries. **Nutrients**, v. 58, n. 1, p. 1–10, 2017.

POPKIN, B. M.; KIM, S. The Nutritional Transition and Diet-Related Chronic Diseases in Asia. n. 2001, 2011.

PORTEIRO, B. *et al.* Corrigendum: Hepatic p63 regulates steatosis via IKK $\beta$ /ER stress. **Nature communications**, v. 8, n. May, p. 16059, 2017.

PORTEIRO, B. *et al.* Pharmacological stimulation of p53 with low-dose doxorubicin ameliorates diet-induced nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. **Molecular Metabolism**, v. 8, n. February 2018, p. 132–143, 2018.

PRAGER, G. N.; ONTKO, J. A. Direct effects of fructose metabolism on fatty acid oxidation in a recombined rat liver mitochondria-high speed supernatant system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism**, v. 424, n. 3, p. 386–395, 1976.

PROKESCH, A. *et al.* Liver p53 is stabilized upon starvation and required for amino acid catabolism and gluconeogenesis. **FASEB Journal**, v. 31, n. 2, p. 732–742, 2017.

QU, X. *et al.* Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene Find the latest version : Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. **Journal of clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1809–1820, 2003.

RAVELLI, A. C.; OSMOND, C. Obesity at the age of 50 years in men and women exposed to famine prenatally. **Am J Clin Nutr**, v. 70, p. 811–816, 1999.

RAVELLI, G. P. *et al.* The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at UC SHARED JOURNAL COLLECTION on March 8, 2015. For personal use only. No other uses without permission. From the NEJM Archive. Copyright © 2009 Massachusetts Medical Society. All rights reser. **The New England Journal of Medicine**, v. 295, 1976.

RAVELLI, G. P.; D.M; M.S; STEIN, Z. A.; M.A; M.B; SUSSER, M.; F.R.C.P. The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at **UC SHARED JOURNAL COLLECTION** on March 8, 2015.

RAVELLI, G. P.; D.M; M.S; STEIN, Z. A.; M.A; M.B; SUSSER, M.; F.R.C.P. The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at **UC SHARED JOURNAL COLLECTION** on March 8, 2015.

REBOLLO, A.; ROGLANS, N.; ALEGRET, M.; LAGUNA, J. C. Way back for fructose and liver metabolism: Bench side to molecular insights. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 45, p. 6552–6559, 2012.

RINAUDO, P.; WANG, E. Fetal Programming and Metabolic Syndrome. **Annual Review of Physiology**, v. 74, n. 1, p. 107–130, 2012.

RIPPE, J. M.; ANGELOPOULOS, T. J. Relationship between added sugars consumption and chronic disease risk factors: **Current understanding. Nutrients**, v. 8, n. 11, 2016.

RODRIGUES, S. C. *et al.* Selective regulation of hepatic lipid metabolism by the AMP-activated protein kinase pathway in late-pregnant rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 307, n. 9, p. R1146-56, 2014.

RONINSON, I. B. Oncogenic functions of tumour suppressor p21Waf1/Cip1/Sdi1: Association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. **Cancer Letters**, v. 179, n. 1, p. 1–14, 2002.

SALWAY J.G. *Metabolismo passo a passo*. **Artmed**. 3 ed, 2009

SANDEVA. Et al. Effect of high-fructose solution on body weight, body fat, blood glucose and triglyceride levels in rats. **J Biomed Clin**, v.8, n.1, 2015.

SANTISTA, C. B.; BOTUCATU, R. Oller donascimento dieta rica lipidios Oller.pdf. v. 81, p. 453–466, 2009.

SANTOS J, FARAH V.M. Alterações bioquímicas na síndrome metabólica induzida pela administração de frutose em ratos. **VII Jornada de Iniciação Científica- Universidade Presbiteriana Mackenzie**. 2011

SIEVENPIPER, J. L. *et al.* Effect of fructose on body weight in controlled feeding trials: A systematic review and meta-analysis. **Annals of Internal Medicine**, v. 156, n. 4, p. 291–304, 2012.

SINGH, R.; KAUSHIK, S.; WANG, Y.; XIANG, Y.; NOVAK, I.; KOMATSU, M.; TANAKA, K.; CUERVO, A. M.; CZAJA, M. J. Autophagy regulates lipid metabolism. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1131–1135, 2009.

SLOBODA, D. M.; LI, M.; PATEL, R.; CLAYTON, Z. E.; YAP, C.; VICKERS, M. H. Early Life Exposure to Fructose and Offspring Phenotype: Implications for Long Term Metabolic Homeostasis. **Journal of Obesity**, v. 2014, p. 1–10, 2014.

SØNDERGAARD, E.; JENSEN, M. D. Quantification of adipose tissue insulin sensitivity. *Journal of Investigative Medicine*, v. 64, n. 5, p. 989–991, 2016.

STOCKER, C.; O'DOWD, J.; MORTON, N. M.; WARGENT, E.; SENNITT, M. V.; HISLOP, D.; GLUND, S.; SECKL, J. R.; ARCH, J. R. S.; CAWTHORNE, M. A. Modulation of susceptibility to weight gain and insulin resistance in low birthweight rats by treatment of their mothers with leptin during pregnancy and lactation. *International Journal of Obesity*, v. 28, n. 1, p. 129–136, 2004.

SUN, S. Z.; EMPIE, M. W. Fructose metabolism in humans--what isotopic tracer studies tell us.: University at Albany Libraries eDiscover Service. **Nutrition and Metabolism**, v. 9, n. 89, p. 1–15, 2012.

TAPPY, L.; LÊ, K.-A. Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 1, p. 23–46, 2010.

TAPPY, L.; RANDIN, J. P.; FELBER, J. P.; CHIOLERO, R.; SIMONSON, D. C.; JEQUIER, E.; DEFRONZO, R. A. Comparison of thermogenic effect of fructose and glucose in normal humans. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 250, n. 6, p. E718–E724, 2017.

TARRY-ADKINS, J. L.; OZANNE, S. E. Nutrition in early life and age-associated diseases. **Ageing Research Reviews**, v. 39, p. 96–105, 2017.

VR&AACUTE; NA, A.; F&AACUTE; BRY, P.; SLABOCHOV&AACUTE;, Z.; KAZDOV&AACUTE;, L. Effect of Dietary Fructose on Free Fatty Acid Release from Adipose Tissue and Serum Free Fatty Acid Concentration in the Rat. *Annals of Nutrition and Metabolism*, v. 17, n. 2, p. 74–83, 2008.

WANG, Z.; DONG, C. Gluconeogenesis in Cancer: Function and Regulation of PEPCCK, FBPase, and G6Pase. *Trends in Cancer*, v. 5, n. 1, p. 30–45, 2019.

WATANABE, Y.; TANAKA, M. Regulation of Autophagy by the Heat Shock Factor 1-Mediated Stress Response Pathway. p. 167–178, 2018.

WATANABE, Y.; TSUJIMURA, A.; TAGUCHI, K.; TANAKA, M. HSF1 stress response pathway regulates autophagy receptor. [s.l: s.n.]. v. 13 WELSH, J. A.; SHARMA, A. J.; GRELLINGER, L.; VOS, M. B. Consumption of added sugars is decreasing in the United States. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 94, n. 3, p. 726–734, 2011.

WELSH, J. A.; SHARMA, A. J.; GRELLINGER, L.; VOS, M. B. Consumption of added sugars is decreasing in the United States. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 94, n. 3, p. 726–734, 2011.

WHITE, E. the role for autophagy in cancer (White, 2015).pdf. *Journal of Clinical Investigation*, v. 125, n. 1, p. 42–46, 2015. KOO, S.-H. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clinical and Molecular Hepatology*, v. 19, n. 3, p. 210, 2013.

WU, H.; NG, R.; CHEN, X.; STEER, C. J.; SONG, G. MicroRNA-21 is a potential link between non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma via modulation of the HBP1-p53-Srebp1c pathway. *Gut*, v. 65, n. 11, p. 1850–1860, 2016.

WYRWOLL, C. S.; HOLMES, M. C. Prenatal excess glucocorticoid exposure and adult affective disorders: A role for serotonergic and catecholamine pathways. *Neuroendocrinology*, v. 95, n. 1, p. 47–55, 2012.

WYRWOLL, C. S.; MARK, P. J.; MORI, T. A.; WADDELL, B. J. Developmental programming of adult hyperinsulinemia, increased proinflammatory cytokine production, and altered skeletal muscle expression of SLC2A4 (GLUT4) and uncoupling protein 3. *Journal of Endocrinology*, v. 198, n. 3, p. 571–579, 2008.

YADAV, H.; JAIN, S.; PRASAD, G.; YADAV, M. Preventive Effect of Diabegon, a Polyherbal Preparation, During Progression of Diabetes Induced by High-Fructose Feeding in Rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 105, n. 1, p. 12–21, 2007.

YAHAGI, N. *et al.* Metabolism and Bioenergetics : p53 Involvement in the Pathogenesis of Fatty Liver Disease p53 Involvement in the Pathogenesis of Fatty Liver Disease \*. v. 279, n. 20, p. 20571–20575, 2004.

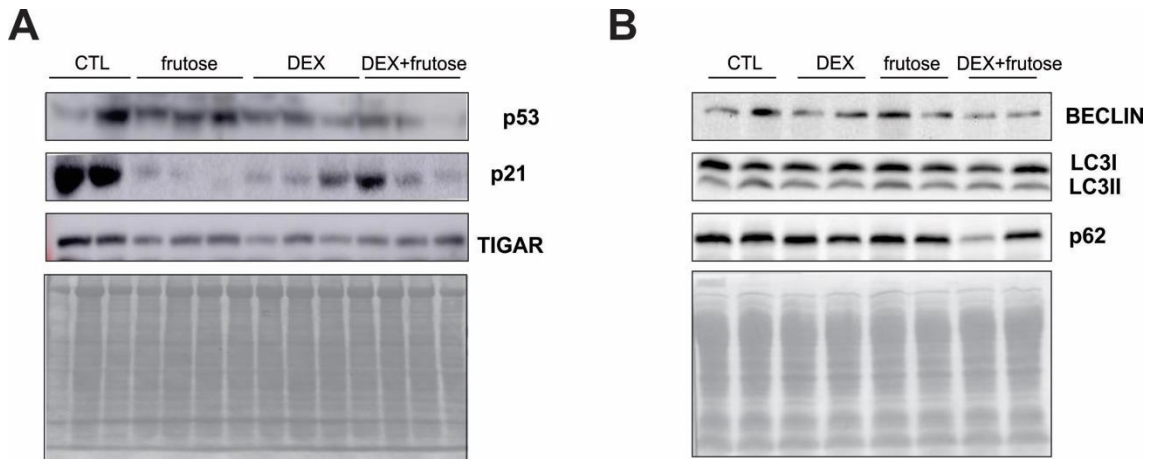
YANG, L.; LI, P.; FU, S.; CALAY, E. S.; HOTAMISLIGIL, G. S. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metabolism*, v. 11, n. 6, p. 467–478, 2010.

ZAMMIT, V. A.; BEIS, I.; NEWSHOLME, E. A. Maximum activities and effects of fructose bisphosphate on pyruvate kinase from muscles of vertebrates and invertebrates in relation to the control of glycolysis. **Biochem J**, v. 174, n. 3, p. 989–998, 1978.

ZHAO, Y.-J.; JU, Q.; LI, G.-C. Tumor markers for hepatocellular carcinoma. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 1, n. 4, p. 593–598, 2013.

ZHENG, J.; FENG, Q.; ZHANG, Q.; WANG, T.; XIAO, X. Early life fructose exposure and its implications for long-term cardiometabolic health in offspring. **Nutrients**, v. 8, n. 11, 2016.

## ANEXOS



**FIGURA 16: IMAGENS REPRESENTATIVAS DE WESTEM BLOTING E RESPECTIVOS PONCEOUS.** Os ratos CTL, DEX,frutose e DEX+frutose foram submetidos a jejum durante 12 horas e a eutanásia com 16 semanas de idade. O fígado foi processado para **(A)** westem blotting de TP53, P21 E TIGAR **(B)** westem blotting de BECLIN,LC3 e P62. CTL(controle), DEX (Tratado com Dexametasona na gestação, 200µg/kg de peso corpóreo/dia ), frutose (Tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida), DEX+frutose (Tratado com Dexametasona na gestação, 200µg/kg de peso corpóreo/dia e posteriormente tratados com frutose 10% após 8 semanas de vida). Os resultados são apresentados como a média ± SE. \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p<0,01 vs. CC; & p <0,05, && p > 0,01, &&& p < 0,001 versus grupo DX; \$\$ p <0,01 vs. grupo CF (N = 5-13).