



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Larissa Lopes da Cruz

**Avaliação da regulação autofágica hepática de ratas
adultas expostas à hiperglicemia intraútero e submetidas
à dieta hiperlipídica após o desmame**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título
de Doutora em Tocoginecologia.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno

Coorientadora: Profa. Dra. Yuri Karen Sinzato

Botucatu

2023

Larissa Lopes da Cruz

**Avaliação da regulação autofágica hepática de ratas
adultas expostas à hiperglicemia intraútero e submetidas
à dieta hiperlipídica após o desmame**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutora em
Tocoginecologia.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno
Coorientadora: Profa. Dra. Yuri Karen Sinzato

**Botucatu
2023**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Cruz, Larissa Lopes da.

Avaliação da regulação autofágica hepática de ratas adultas expostas à hiperglicemia intraútero e submetidas à dieta hiperlipídica após o desmame / Larissa Lopes da Cruz. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Débora Cristina Damasceno

Coorientador: Yuri Karen Sinzato

Capes: 20804008

1. Autofagia. 2. Dieta Hiperlipídica. 3. Diabetes. 4. Fígado. 5. Hepatopatia Gordurosa não Alcoólica.

Palavras-chave: Autofagia; DOHaD; Diabete; Fígado; MAFLD.

IMPACTO ESPERADO DA TESE

Filhas de ratas com diabetes e que consomem dieta rica em gordura, desde o desmame até a vida adulta, apresentam um quadro de resistência à insulina, estresse oxidativo, inflamação e hiperlipidemia exacerbada, que contribui para disfunção autofágica e esteatose no fígado. Isso ressalta a importância da mudança do mau hábito de vida ocidentalizado pelas mulheres, especialmente em idade reprodutiva.

EXPECTED IMPACT OF THESIS

Female pups of rats with diabetes who consume a high-fat diet, from weaning until adulthood, present insulin resistance, oxidative stress, inflammation and exacerbated hyperlipidemia, which contribute to autophagic dysfunction and steatosis in the liver. This highlights the importance of changing the bad Western lifestyle habits of women, especially in the reproductive age.

*“Estou entre aqueles que
acham que a ciência tem
uma grande beleza.”*

Marie Curie

Dedicatória

*Aos meus pais, Leonildo e Ernestina,
por todo amor e incentivo.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo dom da vida e proteção.

Aos meus pais, Ernestina Francisca Lopes da Cruz e Leonildo Ferreira da Cruz, pelo amor incondicional e, ao meu irmão Leonildo Ferreira da Cruz Júnior, muito obrigada pelo incentivo. As dificuldades e a saudade foram grandes em muitos momentos, mas todo carinho foram fundamentais para o meu aprendizado. Ao meu companheiro, Edmar Gonçalves Nogueira, agradeço por transmitir todo amor, cuidado, paciência e cumplicidade. Ao Kachorro, por estar sempre comigo em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora, Professora Débora Cristina Damasceno, por ter me acolhido em seu laboratório e por ser essa pesquisadora admirável e dedicada à ciência. Agradeço por ter contribuído para a minha formação durante o doutorado e pelos valiosos conselhos que foram importantes para meu amadurecimento intelectual e pessoal. Sou imensamente grata pela confiança depositada para a realização deste trabalho.

À minha coorientadora, Dra. Yuri Karen Sinzato, agradeço seus importantes ensinamentos. Sou muito grata por ter aprendido tanto com você.

Ao Professor Gustavo Tadeu Volpato, pela confiança depositada durante todos esses anos, desde o período de iniciação científica. Agradeço pelos ensinamentos, oportunidades e pela amizade ao longo desses anos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO), Verônyca G. Paula, Franciane Q. Gallego, Maysa R. Souza, Vinícius S. Barco, Eduardo Klöppel e Danilo Chaguri, agradeço por tantos momentos que compartilhamos juntos e pela oportunidade de aprender um pouquinho com cada um nos últimos anos. Agradeço também à Giovana Vesentini por toda ajuda e conversas durante a realização da revisão sistemática e meta-análise. Levarei todos vocês no coração!

Aos senhores Danilo Chaguri e Jurandir Antônio, pelo cuidado com os animais. Agradeço especialmente ao Danilo pela ajuda laboratorial.

Agradeço também Matheus Naia Fioretto, Ana Carolina Lima Camargo, Professor Luís Antonio Justulin e todos os membros do DBMOL pela ajuda nas

análises de *Western blotting*, parceria e conhecimentos compartilhados ao longo desta pesquisa.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. Tiago Rodrigues e Profa. Dra. Camila Renata Correa Camacho, por analisarem este estudo e pelas grandes colaborações que fizeram. Agradeço aos membros da banca de defesa, Profa. Dra. Camila Renata Correa Camacho, Profa. Dra. Graziela Scialanti Ceravolo, Prof. Dr. Tiago Rodrigues e Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes, pela disponibilidade em avaliar esse trabalho e pelos pertinentes apontamentos que fizeram.

As minhas amigas e vizinhas, Verônyca G. Paula e Maysa Rocha Souza, agradeço pela companhia durante os anos em Botucatu. Sou muito grata por ter vocês na minha vida. À Ariana Musa de Aquino, agradeço a amizade que construímos dentro e fora da ciência. Obrigada por me apoiar, incentivar e compartilhar comigo tantos momentos bons. Ao Romero Caló, Nilvanei Neves, Viviane Behenck, Beatriz Magalhães, Kellen, Thaís Leal, Patrícia Itaibele, Janaína Sales, Jane Varjão, Poliana Oliveira, Lucas Bernardino e Gisely Marques, agradeço por sempre torcerem por mim. Torço muito pelo sucesso e felicidade de vocês.

Agradeço a Pastoral da Juventude por cada reunião, debate e construção. Vocês me fizeram uma pessoa feliz, sonhadora e consciente, que acredita que um mundo melhor ainda é possível.

Agradeço ao DOHaD Jovem pela acolhida na equipe, espero contribuir muito com vocês.

Agradeço também aos membros do laboratório de Fisiologia de Sistemas e Toxicologia Reprodutiva (FISIOTOX), em especial o Prof. Kleber, Profa. Madeleine, Rafaianne, Thaígra, Loyane, Tainara, Samuel, Mariana e Wellington. Foi um prazer trabalhar com vocês e compartilhar muitos momentos de aprendizado.

Agradeço todos os professores e professoras por terem contribuído para o meu aprendizado e conhecimento no decorrer do doutorado. Aos meus colegas de pós-graduação em Tocoginecologia, desejo a todos muitos sucessos e vitórias.

À secretaria do Programa de Pós-graduação em Tocoginecologia da

Faculdade de Medicina de Botucatu e a todos os funcionários da UNESP.

Ao Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu, em especial ao Prof. Dr. José Eduardo Corrente, pelo delineamento experimental e análises estatísticas realizadas no trabalho.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, coloco os meus sinceros agradecimentos.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro (Processo Número: 2016/25207-5) concedido para desenvolvimento do estudo sobre a associação entre diabetes materno e exposição à dieta hiperlipídica após o desmame.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pela bolsa de Doutorado concedida (Código de Financiamento 001).

Aos animais utilizados no experimento pois, sem eles, esse trabalho não seria possível.

Biografia da aluna

Licenciada em Ciências Biológicas (2009) pela Universidade de Cuiabá. Recebeu honra ao mérito da universidade pelo 1º lugar no curso como melhor aluna da Graduação. Após a graduação, atuou como professora de Biologia para alunos do ensino médio na Escola Estadual Senador Filinto Müller, em Arenópolis-MT. Especializou-se em Gestão e Educação Ambiental (2010) pela Faculdade Afirmativo e trabalhou como coordenadora do Meio Ambiente no período de 2009 a 2012 na Prefeitura Municipal de Arenópolis. Posteriormente, atuou no Consórcio Intermunicipal de Desenvolvimento Econômico, Social e Ambiental do Alto do Rio Paraguai (CIDES-ARP), no qual elaborou projetos e atividades de educação ambiental, prestou assistência técnica e desenvolveu cursos aos pequenos e médios produtores rurais do município e da região.

Graduada em Biomedicina pela Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Campus Universitário do Araguaia no ano de 2016. Durante o período de graduação, foi bolsista PIBIC de Iniciação Científica, com a realização do projeto intitulado “*Efeitos abortivos e teratogênicos do tratamento com Phyllanthus niruri (quebra-pedra) na prenhez de ratas*”, sob a orientação do Prof. Dr. Gustavo Tadeu Volpato. Este trabalho foi publicado em 2020 na revista *Journal of Ethnopharmacology* (fator de impacto = 5,4).

Recebeu o título de Mestra em Imunologia e Parasitologia (2018) pelo programa de Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas (PPGIP) da UFMT, tendo desenvolvido o projeto de pesquisa intitulado “*Efeitos materno-fetais do tratamento com Curatella americana durante a prenhez de ratas diabéticas*”, sob orientação do Prof. Dr. Gustavo Tadeu Volpato e coorientação da Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno. Este estudo foi publicado na revista *Journal of Ethnopharmacology* (fator de impacto = 5,4) no ano de 2022.

No ano de 2018, foi aprovada em processo seletivo para docente pela Universidade Federal de Mato Grosso/Campus Universitário do Araguaia para ministrar diversas disciplinas (Biologia Celular, Bioquímica, Química Geral, Biofísica, Genética Básica e Imunologia) nos cursos de Agronomia, Ciências Biológicas, Biomedicina, Farmácia e Engenharia de Alimentos durante o período

de dois anos. Especializou-se em Ensino à Distância pela Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT (2019) e foi professora bolsista CAPES do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Aberta do Brasil – UAB - UNEMAT, Polo Cáceres – MT no primeiro semestre de 2019.

Neste mesmo ano de 2019, ingressou no Programa de Pós-graduação em Tocoginecologia (Nível: Doutorado) pela Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP para desenvolver o projeto intitulado “*Avaliação da regulação autofágica hepática de ratas adultas expostas à hiperglicemia intraútero e submetidas à dieta hiperlipídica após desmame*”, sob a orientação da Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno. Durante o desenvolvimento de seu doutorado, realizou projetos de pesquisa voltados para o entendimento dos mecanismos envolvidos na disfunção diabética e malnutrição em fêmeas com idade reprodutiva, com o objetivo de prevenir doenças relacionadas ao binômio diabetes e gestação. Nesta etapa, auxiliou outros alunos de mestrado e de iniciação científica dos grupos de pesquisas LAPGO/Unesp e FISIOTOX/UFMT na redação de seus projetos de pesquisa e no desenvolvimento técnico. Auxiliou e redigiu manuscritos para publicação, sendo que estes artigos foram publicados em importantes revistas internacionais de grande relevância para a área e também estão indexados no PUBMED.

SUMÁRIO

Considerações iniciais	16
Referências bibliográficas.....	23
Capítulo I	28
Resumo.....	29
Introdução.....	29
Material e métodos	30
Resultados	31
Discussão.....	37
Conclusão	39
Referências bibliográficas	39
Capítulo II	42
Resumo.....	44
Introdução.....	45
Material e métodos	48
Resultados	60
Discussão.....	76
Conclusão	84
Referências bibliográficas	85
Anexo I	94
Anexo II	95
Apêndice	96

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Ao longo da história da Medicina, evidências experimentais mostram que diversos fatores ambientais podem atuar no início da vida e influenciar a saúde na fase adulta (Rosenfeld, 2015). Esses indicativos tornam-se mais conhecidos pela teoria das doenças adultas de origem fetal (FOAD - *fetal origins of adult disease*), proposta por Barker, que se baseia na premissa da plasticidade do desenvolvimento. As modificações ambientais no início da vida podem produzir diferentes fenótipos e moldar/alterar a predisposição a doenças tardiamente (Barker, 2007; Calkins e Devaskar, 2011). O conceito da teoria de Barker foi expandido para *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD), pois não se restringe apenas ao período fetal e ao aparecimento de doenças, mas compreende também o estado da saúde e abrange outros períodos vulneráveis, como a concepção, período embriofetal, período de amamentação e primeira infância do indivíduo (Uauy *et al.*, 2011; Fleming *et al.*, 2018; Penkler *et al.*, 2019). Estudos epidemiológicos (Gluckman *et al.*, 2007; Tam *et al.*, 2017) e experimentais (Tsoulis *et al.*, 2016; Paula *et al.*, 2022; Sinzato *et al.*, 2022) demonstram que o diabetes materno pode causar um ambiente intrauterino desfavorável e alterar a programação dos descendentes, aumentando o risco para o desenvolvimento de diabetes, obesidade e resistência à insulina em outras gerações.

Diabetes mellitus (DM) descreve um grupo de distúrbios metabólicos caracterizados e identificados pela presença de hiperglicemia (*World Health Organization* - WHO, 2019). Em 2021, 537 milhões de pessoas tinham diabetes e esse número deve chegar a 783 milhões até 2045. Os gastos diretos com a saúde já estão perto de um trilhão de dólares e serão superiores até 2030 (*American Diabetes Association* - ADA, 2023). O aumento da prevalência do diabetes pode ser uma consequência do frequente consumo de dietas ricas em lipídios e à diminuição da atividade física, que são muito comuns atualmente (GBD 2015 *Obesity Collaborators et al.*, 2017; *International Diabetes Federation* - IDF, 2019). O diabetes pode ser classificado em três classes principais: Tipo 1 (DM1), quando há

destruição autoimune das células beta (β)-pancreáticas, levando geralmente à deficiência de insulina; Tipo 2 (DM2) relacionado à perda progressiva da capacidade adequada de secreção de insulina pelas células β e está, associado à resistência à insulina e síndrome metabólica; DM gestacional (DMG), definido como diabetes diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre da gravidez e não foi claramente evidente antes da gestação (ADA, 2023).

Diabete é frequentemente acompanhado por uma variedade de complicações graves, incluindo danos ao fígado (Zhang *et al.*, 2019). O estado hiperglicêmico favorece a auto oxidação da glicose, a glicação não enzimática de proteínas e a ativação da via do poliol, que estão ligadas a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) pelo citocromo P450 2E1 (CYP2E1), além da disfunção mitocondrial e presença de estresse oxidativo (Saravanan *et al.*, 2013). EROS elevados podem ativar vias inflamatórias através da regulação positiva de genes pró-inflamatórios, contribuindo para a resistência à insulina, dano nas moléculas de DNA e consequente morte celular (Shaaban *et al.*, 2022; González *et al.*, 2023). Assim, todos esses fatores em conjunto estão implicados no desenvolvimento da doença hepática gordurosa associada à disfunção metabólica (*Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease* - MAFLD), também conhecida como doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (Eslam *et al.*, 2020; Shaaban *et al.*, 2022). A MAFLD afeta cerca de um quarto da população adulta mundial e representa um grande ônus econômico e de saúde para todas as sociedades. Os critérios propostos para um diagnóstico positivo de MAFLD baseiam-se na evidência histológica, imagem ou biomarcador sanguíneo de acúmulo de gordura no fígado (esteatose hepática), além de um dos três critérios a seguir: sobrepeso/obesidade, presença de DM ou evidência de desregulação metabólica (Eslam *et al.*, 2020). O espectro de lesão hepática da MAFLD varia desde simples esteatose até esteato-hepatite não alcoólica (NASH), cirrose e carcinoma hepatocelular (Oh *et al.*, 2016). Cabe ressaltar que esta doença ainda não tem farmacoterapia aprovada (Eslam *et al.*, 2020). O mecanismo por trás da lesão hepática proveniente do diabete não é claro. No entanto, estudos sugerem uma

conexão com o comprometimento da autofagia (Yu *et al.*, 2019; Joo *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2021).

Em condições normais, a autofagia é um importante mecanismo de degradação de organelas senescentes, proteínas agregadas ou mal dobradas e macromoléculas pela formação de vesículas pelos lisossomos (Mizushima e Komatsu, 2011; Klionsky *et al.*, 2021). Existem três formas principais de autofagia: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas (CMA) e macroautofagia (Mizushima e Komatsu, 2011; Madrigal-Matute e Cuervo, 2016), que diferem quanto às funções fisiológicas e forma de transporte do material a ser degradado para o interior do lisossomo (Mizushima e Komatsu, 2011). A microautofagia ocorre diretamente pela captação de pequenas moléculas do citoplasma para o lisossomo através de invaginações da membrana lisossomal (Madrigal-Matute e Cuervo, 2016). A CMA requer uma chaperona citosólica para transportar proteínas contendo a sequência de aminoácidos KFERQ, para a *lysosome-associated membrane glycoprotein type 2* (LAMP-2), que transloca o material para o interior do lisossomo (Cuervo e Wong, 2014; Ravanan *et al.*, 2017). A macroautofagia é responsável por mais de 90% da autofagia celular e está mais associada ao diabetes (Yao *et al.*, 2020). É caracterizada pela formação de uma vesícula de dupla membrana que circunda o conteúdo a ser degradado, dando origem à estrutura conhecida por autofagossomo, o qual se fundirá posteriormente ao lisossomo que, por sua vez, será denominado autolisossomo (ou autofagolisossomo). Após a fusão, as enzimas lisossomais serão ativadas, resultando na degradação do conteúdo e gerando componentes essenciais (aminoácidos, lipídios e carboidratos) que poderão ser usados para atender às necessidades energéticas da célula e promover a sobrevivência celular (Arden, 2018; Klionsky *et al.*, 2021). Nosso estudo investigou, particularmente, o processo de macroautofagia, a qual passará a ser citada a partir daqui como autofagia.

O processo de autofagia é complexo e envolve a participação ordenada de diversas proteínas (Klionsky *et al.*, 2021), e é dividido em quatro etapas principais: Iniciação, Alongamento, Maturação e Fusão (Gracia-Sancho *et al.*, 2014) (Figura

1). A autofagia é inibida pelo *Mechanistic target of rapamycin* (mTOR), enquanto que a *AMP-activated protein kinase* (AMPK) estimula a autofagia em resposta a níveis baixos de ATP ou ao estresse celular. A proteína AMPK regula a atividade da *Unc-51-like autophagy-activating kinase* (complexo ULK1/2), que ativa a proteína *Interaction myosin/moesin like coiled-coil protein 1* (Beclin-1) para o início da formação do fagóforo (Tain e Hsu, 2017). Uma vez formado, o fagóforo é alongado para gerar o autofagossomo que captura a carga alvo para degradação. A cascata de sinalização das *Autophagy-related genes* (ATGs), sendo ATG-7 um efetor essencial, direciona o complexo ATG12-ATG5-ATG16 para a expansão da membrana do fagóforo. A proteína LC3 (cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos - *microtubule-associated protein light chain 3*), que é um homólogo da ATG-8 de leveduras, sofre uma clivagem C-terminal quando um sinal pró-autofágico é percebido pela célula, assim, ocorre a conversão da forma citosólica I (LC3-I) para a forma II (LC3-II), que sofre modificações e passa a se localizar especificamente na membrana de autofagossomos. A quantidade de LC3-II se correlaciona com o número de autofagossomos formados (Kabeya *et al.*, 2004). Na fase de maturação, a proteína *Sequestosome 1* (SQSTM1), conhecida como p62, se associa às proteínas ubiquitinadas nas membranas autofagossômicas e engloba o conteúdo citoplasmático a ser degradado (Cho *et al.*, 2017). A etapa de fusão do autofagossomo com o lisossomo forma o autolisossomo e depende da glicoproteína LAMP-2 e do complexo *Soluble NSF attachment receptor* (SNARE). Após a fusão, as enzimas lisossômicas são ativadas resultando na degradação do conteúdo englobado (Cho *et al.*, 2017; Arden, 2018).

Com relação a órgãos específicos, a autofagia desempenha um importante papel nas funções básicas, incluindo glicogenólise, gliconeogênese e β -oxidação de ácidos graxos no fígado (Madrigal-Matute e Cuervo, 2016; Cho *et al.*, 2017). O processo autofágico também contribui na degradação de lipídios intracelulares (Signh *et al.*, 2009), mas sua ativação persistente pode resultar em morte celular (Klionsky *et al.*, 2021). Qian *et al.* (2018) demonstraram que a supressão de reguladores autofágicos e a diminuição das atividades enzimáticas lisossomais em

hepatócitos compromete a capacidade do fígado de se adaptar ao estresse metabólico e prejudica a ação da insulina, confirmando que a autofagia tem importantes implicações para a síndrome metabólica. Além disso, a ausência de degradação de p62/SQSTM1 em ratos diabéticos foi correlacionada com danos no fígado, menor formação de autofagolisossomo e inibição de *B-cell lymphoma protein 2* (BCL-2), promovendo a apoptose (Petrović *et al.*, 2017).

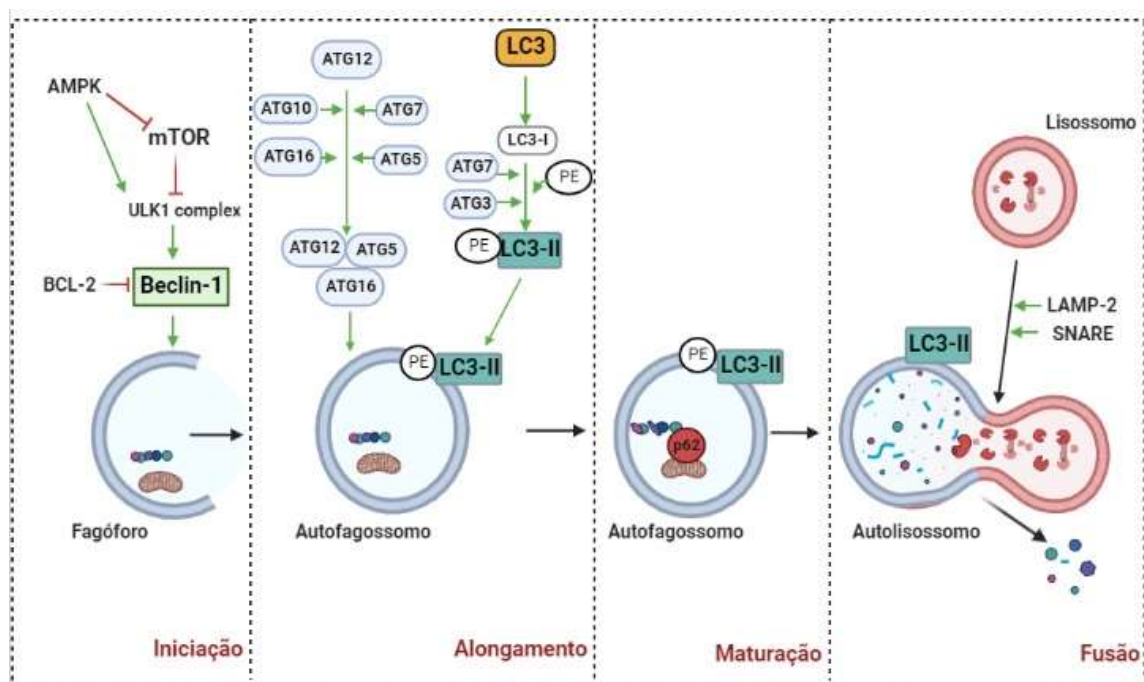


Figura 1. Etapas do processo autofágico (Fonte: do Autor).

A fim de avaliar a disfunção autofágica associada a doenças metabólicas, estudos têm testado o uso de dieta hiperlipídica (DHL) em modelos animais. A indução de obesidade por DHL em camundongos resultou no comprometimento da autofagia após 16 semanas de exposição, acompanhado do aumento de degradação das proteínas ATG-5, ATG-7 e Beclin-1, estresse hepático e resistência à insulina (Yousefi *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2010). Outros estudos mostraram que ratos Wistar tratados com DHL apresentaram aumento na resistência à insulina, que interferiu na fusão de autofagossomos com os lisossomos (Koga *et al.*, 2010; Papáčková *et al.*, 2012). Liu *et al.* (2009) estudaram um modelo de camundongo com DM2, induzido por DHL, e concluíram que a atividade da autofagia no fígado e a expressão de

alguns genes importantes no processo autofágico foram suprimidos na presença de resistência à insulina.

Embora as etapas da autofagia estejam estabelecidas de forma geral, ainda não estão bem elucidadas na patogênese do diabetes, o que causa grande interesse para os pesquisadores (Yasuda-Yamahara *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2017). O diabetes na gestação ainda é uma importante questão a ser explorada quanto à interferência ou não da hiperglicemia na modulação da autofagia no tecido hepático dos descendentes. Estudos em humanos são limitados em função de variáveis incontrolláveis, como fatores socioeconômicos, nutricionais e genéticos (López-Soldado e Herrera, 2003). Além disso, os estudos prospectivos e de intervenção em humanos levam décadas para determinar os resultados e a base mecanicista apenas para a primeira geração (F1), apoiando ainda mais a necessidade de modelos animais com cronogramas reprodutivos relativamente curtos (Morrison *et al.*, 2018). Além disso, as restrições éticas em humanos também devem ser consideradas devido à necessidade de biópsias hepáticas consecutivas para realização de análises mais abrangentes (Kwanten *et al.*, 2014). Os órgãos de roedores, entre eles a microarquitetura do fígado, é muito semelhante aos dos seres humanos (Shi *et al.*, 2015; Kruepunga *et al.*, 2019). Com isso, as repercussões frente aos insultos também podem ser similares e nos ajudam a compreender os mecanismos envolvidos na programação metabólica fetal (Williamns *et al.*, 2014; Wojcikowski e Gobe, 2014).

Dentre os modelos de indução do diabetes em roedores, destaca-se o uso das drogas β -citotóxicas, dentre elas o *streptozotocin* (STZ) (Kleinert *et al.*, 2018; Sinzato *et al.*, 2021). STZ é um composto estável e com margem de segurança ampla, capaz de produzir um modelo de diabetes experimental com glicemia de intensidade severa ou moderada de acordo com a dose, peso corpóreo do animal, a via de administração, espécie e idade do animal utilizado (Eleazu *et al.*, 2013). Para mimetizar a glicemia do DM2 e do DMG humano, o modelo utilizado em roedores é o diabetes moderado e sua indução pode ser feita no período neonatal (Kiss *et al.*, 2009; Damasceno *et al.*, 2013; Sinzato *et al.*, 2021; Cruz *et al.*, 2022), durante a

prenhez (Luo *et al.*, 2020) ou em ambos períodos (Saito *et al.*, 2010).

Tendo em vista a alta incidência de diabetes, o consumo excessivo de alimentos hipercalóricos e a falta de estudos sobre a associação do insulto causado pelo diabetes materno e pela exposição à DHL pós-desmame, nosso grupo de pesquisa mostrou que filhas de ratas com diabetes moderado apresentaram intolerância à glicose, hiperlipidemia e disfunção das células β -pancreáticas na idade adulta (Paula *et al.*, 2022). Também verificamos que a adaptação ao ambiente hiperglicêmico diminuiu a resposta à sinalização de insulina e causou disfunção nas mitocôndrias das fibras do músculo esquelético (Kloppel *et al.*, 2023 – *dados submetidos à publicação*). Quando esses animais foram expostos a uma DHL desde o desmame até a idade adulta, além da presença de hiperglicemia, hiperlipidemia e processo inflamatório (Paula *et al.*, 2022), maior índice de adiposidade e área de adipócitos foram observados, que contribuiu para hipertrofia do tecido adiposo (Saullo *et al.*, 2022).

Sendo assim, ao considerar a perspectiva metabólica global, torna-se necessário o estudo do fígado como importante órgão envolvido na regulação da homeostase energética e metabólica de todo o corpo (Trefts *et al.*, 2017; Baiges-Gaya *et al.*, 2021). Desta forma, modelos com animais de laboratório (ratos), submetidos a estes dois insultos (diabetes materno e DHL após o nascimento) também permitirão melhor entendimento sobre os processos de autofagia hepática. Assim, com o intuito de melhorar o entendimento sobre as repercussões e os mecanismos do diabetes e DHL no processo de autofagia no fígado das fêmeas descendentes na idade adulta, esta tese foi desenvolvida e dividida em dois capítulos: Capítulo I - apresentação de uma revisão sistemática e meta-análise para entendermos como o diabetes interfere nas vias de sinalização da autofagia hepática, bem como, as lacunas de conhecimento que ainda precisam ser elucidadas; Capítulo II – investigação dos mecanismos pelos quais o diabetes materno, associado ou não ao consumo de DHL na vida pós-natal, pode prejudicar o processo de autofagia hepática das filhas de mães diabéticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Diabetes Association, ADA. Classification and diagnosis of diabetes: standards of cares in diabetes—2023. *Diabetes Care* 2023; v.46, p.S19–S40. doi: 10.2337/dc23-S002.
- Arden C. A role for glucagon-like peptide-1 in the regulation of β -cell autophagy. *Peptides* 2018; v.100, p.85–93. doi: 10.1016/j.peptides.2017.12.002.
- Baiges-Gaya G, Fernández-Arroyo S, Luciano-Mateo F, Cabré N, Rodríguez-Tomás E, Hernández-Aguilera A, Castañé H, Romeu M, Nogués MR, Camps J, Joven J. Hepatic metabolic adaptation and adipose tissue expansion are altered in mice with steatohepatitis induced by high-fat high sucrose diet. *J Nutr Biochem* 2021; v.89, p.108559. doi: 10.1016/j.jnutbio.2020.108559.
- Barker DJ. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 2007; v.261, p.412–417. doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x.
- Calkins K, Devaskar SU. Fetal origins of adult disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2011; v.41, p.158–176. doi: 10.1016/j.cppeds.2011.01.001.
- Cho DK, Choi DH, Cho JY. Effect of treadmill exercise on skeletal muscle autophagy in rats with obesity induced by a high-fat diet. *J Exerc Nutrition Biochem* 2017; v.21, p.26–34. doi: 10.20463/jenb.2017.0013.
- Cruz LL, Ferreira Silva BS, Araujo GG, Leal-Silva T, Paula VG, Souza MR, Soares TS, Moraes-Souza RQ, Monteiro GC, Lima GPP, Damasceno DC, Volpato GT. Phytochemical and antidiabetic analysis of *Curatella americana* L. aqueous extract on the rat pregnancy. *J Ethnopharmacol* 2022; v.293, p.115287. doi: 10.1016/j.jep.2022.115287.
- Cuervo AM, Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res* 2014; v.24, p.92–104. doi: 10.1038/cr.2013.153.
- Dai C, Hang Y, Shostak A, Poffenberger G, Hart N, Prasad N, Phillips N, Levy SE, Greiner DL, Shultz LD, Bottino R, Kim SK, Powers AC. Age-dependent human β cell proliferation induced by glucagon-like peptide 1 and calcineurin signaling. *J Clin Invest* 2017; v.127, p.3835–3844. doi: 10.1172/JCI91761.
- Damasceno DC, Sinzato YK, Bueno A, Netto AO, Dallaqua B, Gallego FQ, Iessi IL, Corvino SB, Serrano RG, Marini G, Piculo F, Calderon IM, Rudge MV. Mild diabetes models and their maternal-fetal repercussions. *J Diabetes Res* 2013; v.2013, p.473575. doi: 10.1155/2013/473575.
- Eleazu CO, Eleazu KC, Chukwuma S, Essien UN. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *J Diabetes Metab Disord* 2013; v.12, p.60. doi: 10.1186/2251-6581-12-60.
- Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, Zelber-Sagi S, Wai-Sun Wong V, Dufour JF, Schattenberg JM, *et al.* A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol* 2020; v.73, p.202–209. doi: 10.1016/j.jhep.2020.03.039.
- Fleming TP, Watkins AJ, Velazquez MA, Mathers JC, Prentice AM, Stephenson J, Barker M, Yajnik CS, Forrester T, Gluckman PD, Godfrey KM. Origins of

- lifetime health around the time of conception: causes and consequences. *Lancet* 2018; v.391, p.1842-1852. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30312-X.
- GBD 2015 Obesity Collaborators, Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, Lee A, Marczak L, Mokdad AH, Moradi-Lakeh M, Naghavi M, *et al.* Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. *N Engl J Med* 2017; v.377, p.13-27. doi: 10.1056/NEJMoa1614362.
- Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS. Early life events and their consequences for later disease: A life history and evolutionary perspective. *Am J Hum Biol* 2007; v.19, p.1–19. doi: 10.1002/ajhb.20590.
- González P, Lozano P, Ros G, Solano F. Hyperglycemia and oxidative stress: An integral, updated and critical overview of their metabolic interconnections. *Int J Mol Sci* 2023; v.24, p.9352. doi: 10.3390/ijms24119352.
- Gracia-Sancho J, Guixé-Muntet S, Hide D, Bosch J. Modulation of autophagy for the treatment of liver diseases. *Expert Opin Investig Drugs* 2014; v.23, p.965-977. doi: 10.1517/13543784.2014.912274.
- International Diabetes Federation - IDF. *Diabetes Atlas*. 10th edition, 2021.
- Jiang Y, Chen D, Gong Q, Xu Q, Pan D, Lu F, Tang Q. Elucidation of SIRT-1/PGC-1 α -associated mitochondrial dysfunction and autophagy in nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis* 2021; v.20, p.40. doi: 10.1186/s12944-021-01461-5.
- Joo HW, Song YS, Park IH, Shen GY, Seong JH, Shin NK, Lee AH, Kim H, Kim KS. Granulocyte colony stimulating factor ameliorates hepatic steatosis associated with improvement of autophagy in diabetic rats. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2020; v.2020, p.2156829. doi: 10.1155/2020/2156829.
- Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci*. 2004; v.117, p.2805-2812. doi: 10.1242/jcs.01131.
- Kiss AC, Lima PH, Sinzato YK, Takaku M, Takeno MA, Rudge MV, Damasceno DC. Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes. *Diabetol Metab Syndr* 2009; v.1, p.21. doi: 10.1186/1758-5996-1-21.
- Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, Moore MC, Renner S, Woods SC, Huypens P, Beckers J, de Angelis MH, Schürmann A, *et al.* Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 2018; v.14, p.140-162. doi: 10.1038/nrendo.2017.161.
- Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, Abdellatif M, Abdoli A, Abel S, Abeliovich H, Abildgaard MH, Abudu YP, Acevedo A, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy* 2021; v.17, p.1-382. doi: 10.1080/15548627.2020.1797280.
- Klöppel E, Cruz LL, Gallego FQ, Iessi IL, Gelaleti RB, Moraes-Souza RQ, Corrente JE, dos Santos DC, Justulin L, Rodrigues T, Volpato GT, Damasceno DC. Insulin signaling and mitochondrial phenotype of skeletal muscle is programmed in utero by maternal hyperglycemia. 2023.
- Kruepunga N, Hakvoort TBM, Hikspoors JPJM, Köhler SE, Lamers WH. Anatomy of rodent and human livers: What are the differences? *Biochim Biophys Acta*

- Mol Basis Dis 2019; v.1865, p.869-878. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.05.019.
- Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. Inhibitory effect of intracellular lipid load on macroautophagy. *Autophagy* 2010; v.6, p.825-827. doi: 10.1096/fj.09-144519.
- Kwanten WJ, Martinet W, Michielsens PP, Francque SM. Role of autophagy in the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease: a controversial issue. *World J Gastroenterol* 2014; v.20, p.7325-7338. doi: 10.3748/wjg.v20.i23.7325.
- Liu HY, Han J, Cao SY, Hong T, Zhuo D, Shi J, Liu Z, Cao W. Hepatic autophagy is suppressed in the presence of insulin resistance and hyperinsulinemia: inhibition of FoxO1-dependent expression of key autophagy genes by insulin. *J Biol Chem* 2009; v.284, p.31484-31492. doi: 10.1074/jbc.M109.033936.
- López-Soldado I, Herrera E. Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring. *Exp Diabetes Res* 2003; v.4, p.107-118. doi: 10.1155/EDR.2003.107.
- Luo Y, Tian Y, Zhao C. Taurine attenuates liver autophagy and injury of offspring in gestational diabetic mellitus rats. *Life Sci* 2020; v.257, p.117889. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117889.
- Madrigal-Matute J, Cuervo AM. Regulation of liver metabolism by autophagy. *Gastroenterology* 2016; v.150, p.328-39. doi: 10.1053/j.gastro.2015.09.042.
- Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 2011; v.147, p.728-741. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.026.
- Morrison JL, Botting KJ, Darby JRT, David AL, Dyson RM, Gatford KL, Gray C, Herrera EA, Hirst JJ, Kim B, *et al.* Guinea pig models for translation of the developmental origins of health and disease hypothesis into the clinic. *J Physiol* 2018; v.596, p.5535-5569. doi: 10.1113/JP274948.
- Oh H, Jun DW, Saeed WK, Nguyen MH. Non-alcoholic fatty liver diseases: update on the challenge of diagnosis and treatment. *Clin Mol Hepatol* 2016; v.22, p.327-335. doi: 10.3350/cmh.2016.0049.
- Papáčková Z, Daňková H, Páleníčková E, Kazdová L, Cahová M. Effect of short- and long-term high-fat feeding on autophagy flux and lysosomal activity in rat liver. *Physiol Res* 2012; v.61, p.S67-76. doi: 10.33549/physiolres.932394.
- Paula VG, Sinzato YK, de Moraes-Souza RQ, Soares TS, Souza FQG, Karki B, de Andrade Paes AM, Corrente JE, Damasceno DC, Volpato GT. Metabolic changes in female rats exposed to intrauterine hyperglycemia and postweaning consumption of high-fat diet†. *Biol Reprod* 2022; v.106, p.200-212. doi: 10.1093/biolre/ioab195.
- Penkler M, Hanson M, Biesma R, Müller R. DOHaD in science and society: emergent opportunities and novel responsibilities. *J Dev Orig Health Dis* 2019; v.10, p.268-273. doi: 10.1017/S2040174418000892.
- Petrović A, Bogojević D, Korać A, Golić I, Jovanović-Stojanov S, Martinović V, Ivanović-Matić S, Stevanović J, Poznanović G, Grigorov I. Oxidative stress-dependent contribution of HMGB1 to the interplay between apoptosis and autophagy in diabetic rat liver. *J Physiol Biochem* 2017; v.73, p.511-521. doi: 10.1007/s13105-017-0574-0.
- Qian Q, Zhang Z, Orwig A, Chen S, Ding WX, Xu Y, Kunz RC, Lind NRL, Stamler JS, Yang L. S-Nitrosoglutathione reductase dysfunction contributes to obesity-

- associated hepatic insulin resistance via regulating autophagy. *Diabetes* 2018; v.67, p.193-207. doi: 10.2337/db17-0223.
- Ravanan P, Srikumar IF, Talwar P. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life Sci* 2017; v.188; p.53-67. doi: 10.1016/j.lfs.2017.08.029.
- Rosenfeld C. *The epigenome and Developmental Origins of Health and Disease*. 1st Edition, Elsevier, 2015. doi: 10.1016/B978-0-12-801383-0.00001-3.
- Saito FH, Damasceno DC, Kempinas WG, Morceli G, Sinzato YK, Taylor KN, Rudge MV. Repercussions of mild diabetes on pregnancy in Wistar rats and on the fetal development. *Diabetol Metab Syndr* 2010; v.2, p.26. doi: 10.1186/1758-5996-2-26.
- Saravanan G, Ponmurugan P. S-allylcysteine Improves streptozotocin-induced alterations of blood glucose, liver cytochrome P450 2E1, plasma antioxidant system, and adipocytes hormones in diabetic rats. *Int J Endocrinol Metab*. 2013; v.11, p.e10927. doi: 10.5812/ijem.10927.
- Saullo CM, Sinzato YK, Paula VG, Gallego FQ, Corrente JE, Iessi IL, Volpato GT, Damasceno DC. Exposure to maternal hyperglycemia and high-fat diet consumption after weaning in rats: repercussions on periovarian adipose tissue. *J Dev Orig Health Dis* 2022; v.13, p.634-641. doi: 10.1017/S2040174421000672.
- Shaaban HH, Alzaim I, El-Mallah A, Aly RG, El-Yazbi AF, Wahid A. Metformin, pioglitazone, dapagliflozin and their combinations ameliorate manifestations associated with NAFLD in rats via anti-inflammatory, anti-fibrotic, anti-oxidant and anti-apoptotic mechanisms. *Life Sci*. 2022; v.308, p.120956. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120956.
- Shi H, Yang G, Zheng T, Wang J, Li L, Liang Y, Xie C, Yin D, Sun B, Sun J, *et al*. A preliminary study of ALPPS procedure in a rat model. *Sci Rep* 2015; v.5, p. 17567. doi: 10.1038/srep17567.
- Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 2009; v.458, p.1131-1135. doi: 10.1038/nature07976.
- Sinzato YK, Klöppel E, Miranda CA, Paula VG, Alves LF, Nascimento LL, Campos AP, Karki B, Hampl V, Volpato GT, Damasceno DC. Comparison of streptozotocin-induced diabetes at different moments of the life of female rats for translational studies. *Lab Anim* 2021; v.55, p.329-340. doi: 10.1177/00236772211001895.
- Sinzato YK, Paula VG, Gallego FQ, Moraes-Souza RQ, Corrente JE, Volpato GT, Damasceno DC. Maternal diabetes and postnatal high-fat diet on pregnant offspring. *Front Cell Dev Biol* 2022; v.10, p.818621. doi: 10.3389/fcell.2022.818621.
- Tain YL, Hsu CN. Interplay between oxidative stress and nutrient sensing signaling in the developmental origins of cardiovascular disease. *Int J Mol Sci* 2017; v.18, p.841. doi: 10.3390/ijms18040841.
- Tam WH, Ma RCW, Ozaki R, Li AM, Chan MHM, Yuen LY, Lao TTH, Yang X, Ho CS, Tutino GE, Chan JCN. In utero exposure to maternal hyperglycemia increases childhood cardiometabolic risk in offspring. *Diabetes Care* 2017; v.40,

- p.679-686. doi: 10.2337/dc16-2397.
- Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol* 2017; v.27, p.1147-1151. doi: 10.1016/j.cub.2017.09.019.
- Tsoulis MW, Chang PE, Moore CJ, Chan KA, Gohir W, Petrik JJ, Vickers MH, Connor KL, Sloboda DM. Maternal high-fat diet-induced loss of fetal oocytes is associated with compromised follicle growth in adult rat offspring. *Biol Reprod* 2016; v.94, p.94. doi: 10.1095/biolreprod.115.135004.
- Uauy R, Kain J, Corvalan C. How can the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothesis contribute to improving health in developing countries? *Am J Clin Nutr* 2011; v.94, p.1759S-1764S. doi: 10.3945/ajcn.110.000562.
- Williams L, Seki Y, Vuguin PM, Charron MJ. Animal models of in utero exposure to a high fat diet: a review. *Biochim Biophys Acta* 2014; v.1842, p.507-519. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.07.006.
- Wojcikowski K, Gobe G. Animal studies on medicinal herbs: predictability, dose conversion and potential value. *Phytother Res* 2014; v.28, p.22-27. doi: 10.1002/ptr.4966.
- World Health Organization. Classification of Diabetes mellitus. Geneva: 2019.
- Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab* 2010; v.11, p.467-478. doi: 10.1016/j.cmet.2010.04.005.
- Yao D, Gang Yi Y, QiNan W. Autophagic dysfunction of β cell dysfunction in type 2 diabetes, a double-edged sword. *Genes Dis* 2020; v.8, p.438-447. doi: 10.1016/j.gendis.2020.03.003.
- Yasuda-Yamahara M, Kume S, Yamahara K, Nakazawa J, Chin-Kanasaki M, Araki H, Araki S, Koya D, Haneda M, Ugi S, Maegawa H, Uzu T. Lamp-2 deficiency prevents high-fat diet-induced obese diabetes via enhancing energy expenditure. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; v.465, p.249-255. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.08.010.
- Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T, Simon HU. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* 2006; v.8, p.1124-1132. doi: 10.1038/ncb1482.
- Yu X, Zhang L, Lu H, Chen H, Yu L, Cao X, Shen D. Rapamycin protects against hepatic injury in streptozotocin-induced diabetic rats by enhancing autophagy. *Int J Clin Exp Med* 2019; v.12, p.11383-11393.
- Zhang Y, Cao Y, Chen J, Qin H, Yang L. A new possible mechanism by which punicalagin protects against liver injury induced by type 2 Diabetes mellitus: Upregulation of autophagy via the Akt/FoxO3a signaling pathway. *J Agric Food Chem* 2019; v.67, p.13948-13959. doi: 10.1021/acs.jafc.9b05910.

CAPÍTULO I

Este capítulo da tese de Doutorado (revisão sistemática e meta-análise) foi redigido, submetido e publicado na revista *Life Sciences* (Fator de Impacto = 6,78) no ano de 2022.



Effects of high-fat diet-induced diabetes on autophagy in the murine liver: A systematic review and meta-analysis

Larissa Lopes da Cruz^{a,b}, Giovana Vesentini^{a,*}, Yuri Karen Sinzato^a, Ana Izabel Silva Balbin Villaverde^a, Gustavo Tadeu Volpato^b, Débora Cristina Damasceno^a

^a Laboratory of Experimental Research on Gynecology and Obstetrics, Postgraduate Course on Tocogynecology, Botucatu Medical School, São Paulo State University (Unesp), Botucatu, São Paulo State, Brazil

^b Laboratory of System Physiology and Reproductive Toxicology, Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Mato Grosso (UFMT), Barra do Garças, Mato Grosso State, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Animal models
Hepatocyte
High-fat diet
Hyperglycemia
Macroautophagy

ABSTRACT

Aims: We conducted a meta-analysis to investigate whether diabetes induced by a high-fat diet (HFD) has the potential to alter the process of autophagy in the murine liver.

Methods: A systematic literature search was performed with electronic databases (PubMed, EMBASE, Web of Science). Study design, population, intervention, outcome, and risk of bias were analyzed. Given the availability of studies, a quantitative meta-analysis including 23 studies was performed.

Key findings: The search found 5754 articles, with 48 matching the eligibility criteria, comprising of 1033 animals. The meta-analysis showed that diabetic murines fed with HFD presented an absence of p62 degradation (SMD 4.63, 95 % CI 2.02 to 7.24, $p = 0.0005$; $I^2 = 77\%$), higher expression of p-mTOR/mTOR (SMD 5.20, 95 % CI 1.00 to 9.39, $p = 0.01$; $I^2 = 78\%$), and a decreased p-AMPK/AMPK ratio (SMD -2.02, 95 % CI -3.96 to -0.09, $p = 0.04$; $I^2 = 85\%$) when compared to nondiabetic murines. When associated with streptozotocin, the animals presented decreased ATG-7 and LC3-II. The meta-regression results showed a decrease in autophagy responses due to increased glycemic levels, fat content, and long-term exposure to HFD, and advanced animal age. The common and species-specific protein responses were also consistent with the inhibition of autophagy.

Significance: The normal process of autophagy mechanisms in the liver is less competent after HFD consumption. The destabilization of (auto)phagolysosomes contributes to the perpetuation of diabetes, metabolic dysfunction-associated fatty liver disease, and cell death.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is accompanied by a variety of serious complications, such as liver damage, which has attracted attention in recent years [1–3]. The hyperglycemic status favors the formation of advanced glycation end products, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction, which contributes to insulin resistance, hepatocyte inflammation, and cell death [4,5]. These alterations lead to Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD), also known as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [6,7]. MAFLD affects about 1 billion people globally, posing a major health and economic burden to society [6]. The high prevalence of disease is associated with the rise of sedentary behavior, excessive calorie consumption, and nutritionally imbalanced

and unhealthy diets [7].

One plausible hypothesis states that autophagy is related to the onset and development of liver injury, and consequently to MAFLD [5]. Under normal conditions, autophagy consists of a digestion process promoted by lysosomes, which is responsible for mobilizing intracellular nutrients, generating energy, and recycling damaged organelles to maintain cellular homeostasis [5,8,9]. During the initial steps, autophagy-related proteins are expressed and/or activated by the phosphorylation of the AMP-activated protein kinase (AMPK) and by the inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) [8]. Next, parts of the cytoplasm containing degraded material are encompassed by a membrane, forming a phagophore composed of a protein complex with Beclin-1 [8,10]. This complex modifies the membrane and entraps the

* Corresponding author at: Laboratório de Pesquisa experimental em Ginecologia e Obstetrícia, Unidade de Pesquisa Experimental – UNIPEX, Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, Estado de São Paulo CEP: 13618-970, Brazil.

E-mail address: g.vesentini@hotmail.com (G. Vesentini).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121012>

Received 19 April 2022; Received in revised form 19 September 2022; Accepted 25 September 2022

Available online 28 September 2022

0024-3205/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

components destined for recycling in a double membrane structure called the autophagosome [10]. During this step, a protein named microtubule-associated protein light chain 3 (LC3-II) is inserted into the autophagosomal membrane and serves as a convenient marker for this structure [8,11–13]. The protein p62/SQSTM1, an autophagy receptor that links ubiquitinated proteins to LC3, is incorporated into autophagosomes and degraded [5,8,11]. After its formation, the autophagosome fuses with lysosomes, and the sequestered contents are subsequently digested by lysosomal hydrolases [8–10,14]. In hepatocytes, autophagy plays an important role in glycogenolysis and gluconeogenesis, and regulates lipid metabolism [14]. In contrast, the inhibition of autophagy compromises the ability of the liver to adapt to a state of metabolic stress and impairs insulin action [14]. However, whether and how diabetes affects the mechanism of hepatic autophagy is not as clear as expected.

Discrepancies between studies are commonly attributed to limitations when using human models [15]. The limitations for human liver studies come not only from uncontrolled variables (e.g., diet and exercise) but also from ethical constraints due to the necessity of consecutive liver biopsies to perform a comprehensive analysis [15]. In this scenario, animal experiments can improve our understanding of the DM consequences on liver autophagy. It is important to note that, in addition to carefully controlled dietary and activity conditions, rodents also share strong similarities with humans in DM modeling, such as common genetic background and physiology [16,17]. Normally, rodent diabetic models are classified as either genetic/spontaneously induced or non-genetic/experimentally induced. Non-genetic models are more popular due to their lower cost and widespread availability [16]. Several non-genetic models for DM research in mice and rats have been developed in the last decades, including alloxan/streptozotocin (STZ)-induced diabetic models and high-fat diet (HFD) models [16,17]. The HFD models reflect human conditions in modern societies, with high fat intake leading to metabolic diseases [18]. However, the influence of HFD on the levels of autophagy in the liver and its effects on diabetes remains unclear.

To reduce the limitations commonly seen in human trials, we focused our analysis on reports that used rat and mouse models to study diabetes interference on the signaling pathways of hepatic autophagy. Thus, the objective of this study is to systematically review and appraise the evidence provided by preclinical studies to investigate autophagy-related protein alterations in the liver promoted by HFD-induced diabetes.

2. Materials and methods

2.1. Search strategy

This systematic review is reported according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) statement (for PRISMA checklist see Supplementary Table 1). The protocol was specified in advance and registered on the International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO - CRD42019156689).

Studies assessing the effects of DM on liver autophagy of murines were searched using electronic databases: PUBMED (Public/Publisher MEDLINE), EMBASE (Excerpta Medica Database), and Web of Science, from inception to January 10th, 2022. For a comprehensive search, we used controlled terms, text words, and their combinations. For instance, we searched terms describing (mouse OR rats) AND (*Diabetes mellitus* OR glucose metabolism disorders) AND (hepatic autophagy OR LC3 OR p62 OR Beclin-1). The complete search strategies are listed in Supplementary Table 2. Other sources such as hand searching, screening of reference lists, review articles, and author-based searches were also used to ensure that no relevant article had been missed.

After the removal of duplicates, all unique records were imported to the free Rayyan web application [19]. The screening process was performed independently by two reviewers (LLC and GV). First, the title and abstract screening were processed. If no sufficient information was

provided to make a valid decision, then the full text was evaluated. Subsequently, eligible articles were screened for final inclusion based on their full text. Contradictory decisions were resolved in consensual conversation with a third reviewer (DCD).

2.2. Selection criteria

The studies were included if they met the following criteria: (i) Male and female rats (*Rattus norvegicus*) or mice (*Mus musculus*) with no age limit. Rabbits, non-rodents, spontaneous diabetic animals, genetically modified animals, ex vivo, in vitro, in silico models, and studies involving human subjects were excluded; (ii) Rats/mice with diabetes induced in the neonatal period and/or adulthood by STZ, alloxan, or HFD, regardless of dose and route of administration. The reported glucose levels from fasting glucose, Oral Glucose Tolerance Test (OGTT), and HbA1c tests were used for diabetes diagnosis. Rodents with DM associated with comorbidities (except obesity because several DM2 animal models are obese), or animals that received treatment for diabetes (e.g., insulin, metformin, and plant) were excluded. (iii) For comparison, studies that included untreated/vehicle-treated controls were evaluated. When animals were subjected to any type of treatment intervention (e.g., surgery, drugs, stress, and exercise), the studies were not considered. (iv) Studies which address autophagy in the liver using procedures (here named outcomes) for protein identification and quantification, gene expression, enzymatic activity, and analysis of relevant molecular markers, including LC3, Beclin-1, p62/SQSTM1, ATGs, AMPK, mTOR, Lamp-2, turnover of LC3-II/Atg8 - PE; autophagic hepatic flux. The irrelevant outcomes related to autophagy and the investigations of autophagy in organs other than the liver were excluded. No limits based on language and publication date were established.

2.3. Data extraction

From the studies that passed all criteria, two reviewers (LLC and GV) independently extracted and inputted data into a structured database. The extracted data included: publication year; first author's name; characteristics of animals (species, strain, and sex); method and age of diabetes induction; glucose levels; and the autophagy markers analyzed. For studies providing glucose levels in mmol/L, the levels were converted into mg/dL. For each comparison, we extracted the mean value and the value for standard deviation (SD) or standard error (SE), along with the number of animals (n) from each experimental and control group. Results data were directly extracted from tables and/or text. If data were only graphically reported, we extracted the numerical results using a web-based tool (WebPlotDigitizer 4.2, <https://apps.automeria.io/wpd/>). Authors were contacted by email in the event of missing data.

2.4. Risk of bias assessment

The risk of bias for animal studies was assessed using the Systematic Review Centre for Laboratory Animal Experimentation (SYRCLE's tool). The SYRCLE risk of bias tool is composed of a 10-item checklist related to selection, performance, detection, attrition, reporting, and other biases [20]. The items were classified as having a "low", "high", or "unclear" risk of bias based on the information reported in each study. Afterward, a score for the risk of bias, considering all studies included, was calculated for each category, and expressed as a percentage from 0 to 100 %.

2.5. Data analysis

All quantitative analyses were implemented by statistical programming language using R version 1.3.1093 (The R Foundation, Vienna, Austria). Meta-analysis was conducted if more than two comparisons of each outcome were available. Studies were stratified into subgroups based on the method of DM induction (i.e., HFD, HFD, and STZ). Studies

in which outcome data were not available or could not be obtained (i.e., mean, SD, SE, and animal number) were excluded from quantitative analysis. Thus, it was not possible to quantify studies that used only STZ-induced diabetes due to insufficient data for mean and standard deviation values. The individual and combined effects of DM on continuous variables of autophagy were calculated using the standardized mean difference (SMD), along with a 95 % confidence interval (CI). SMD was used because different studies may quantify the same outcome in different ways. If a study had more than one experimental group of animals with a similar method of intervention and minimal differences in the tissue collection procedure (e.g., fasted and fed animals), these groups were combined and compared with the control group. The experimental groups were joined using the *Cochrane Handbook* recommendations [21]. The random-effect models in the meta-analysis were performed to estimate the effects of the different studies considering the expected high heterogeneity. Statistical heterogeneity was quantified by the I^2 test, with results expressed as percentages and values of <40 %, 30–60 %, 50–90 %, and > 75 % respectively classified as low, moderate, substantial, and considerable heterogeneity [21]. Statistically significant p -values were set to ≤ 0.05 . Subgroup analyses were performed based on animal species (mice vs. rats) to examine their influence on outcomes.

Meta-regression was conducted if more than five comparisons of

each outcome were available. Given the limited number of available comparisons, random-effects meta-regression was used for continuous data in the HFD subgroup to assess the relationship between glycemic level, age, fat content percentage and days of HFD exposure, and primary outcomes. Univariable meta-regression was considered significant when the p -value was ≤ 0.05 . All analysis was performed using R version 1.3.1093 (The R Foundation, Vienna, Austria) with the Meta package.

3. Results

3.1. Study selection

The results of our literature search and screening are presented in Fig. 1. The search strategy identified a total of 5754 references. After removing duplicates, the 4716 unique papers were screened. Based on a title and abstract analysis, 4444 of the articles did not meet the eligibility criteria proposed by our group (for more details see the material and methods section), and were excluded. The remaining 272 publications were retrieved for full-text evaluation. After analysis of criteria eligibility, the final dataset was comprised of 48 studies [3,5,10,12,13,18,22–63], with 23 being eligible for a meta-analysis [5,12,13,23,26–28,30–37,43–45,47,48,50,57,63] and 25 excluded from the quantitative analysis due to insufficient data.

PRISMA 2009 Flow Diagram

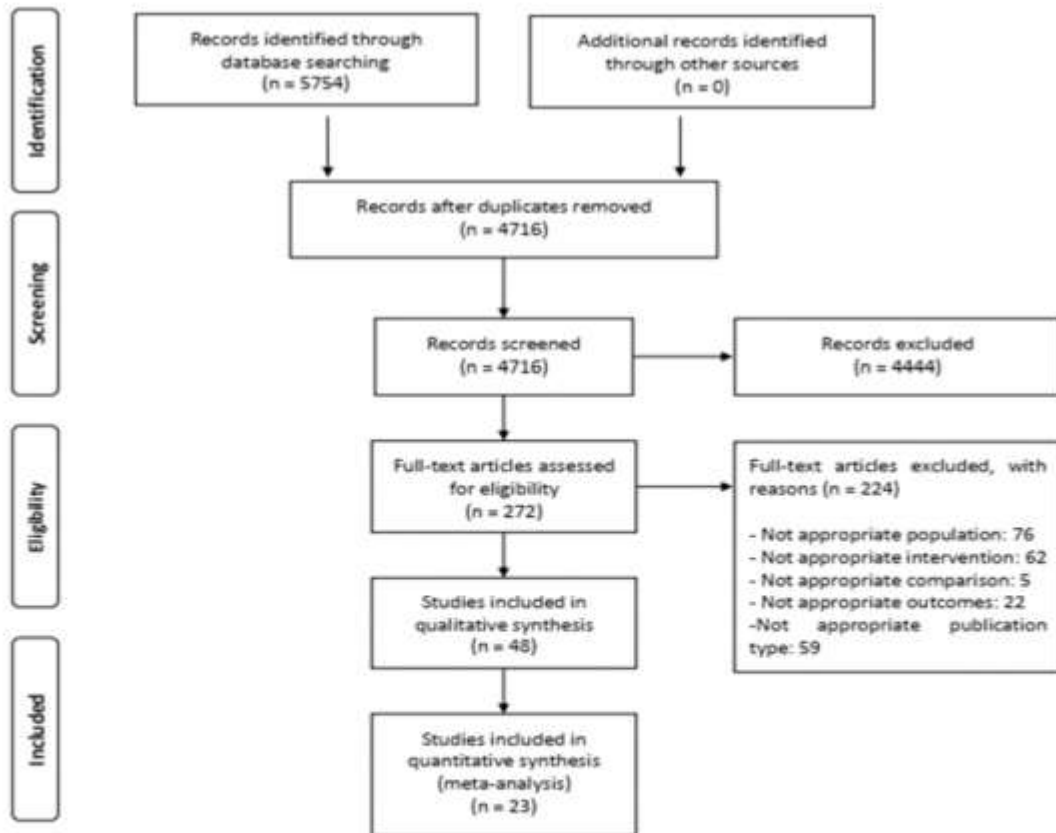


Fig. 1. Flowchart of paper selection process based on PRISMA recommendations.

Table 1
Design characteristics of included studies.

Author, year (reference)	Species (strain)	Sex	Sample size	Diabetes induction method	% of kcal from fat/ source and/or Dose (route of administration)	Starting age of diabetes induction (wk-old)	Diabetes diagnosis method (compared with controls)			Period of intervention (wk)	Age of tissue collection (wk-old)
							Fasting blood glucose concentration (mg/dL) ^a	OGTT 2-h 0', 30', 60', 120' (mg/dL)	HbA1C (%)		
Baiges-Gaya, 2021[22]	Mice (C57BL/6)	M	C: 8 D: 8	HFD	35 % fat	5	392.7 ± 65.5	NR	NR	20	25
Cahova, 2010 [12]	Rats (Wistar)	M	C: 14 D: 14	HFD	70 % fat	12	97.2 ± 2.4	NR	NR	2	14
Fang, 2020 [23]	Mice (C57BL/6)	NR	C: 10 D: 10	HFD	NR	9	167.7 ± 0.0	3.P ≥ 200	NR	22	31
Guo, 2015 [24]	Mice (C57BL/6)	NR	C: 15 D: 15	HFD	60 % fat	4	280.0 ± 21.0	4.P ≥ 200	NR	16	20
Hagihara, 2010[25]	Rats (Wistar)	M	C: 15 D: 15	STZ	60 mg/kg (i.v.)	NR	406.7 ± 77.1	NR	NR	NA	NR
He, 2014[26]	Rats (SD)	M	C: 12 D: 12	HFD + STZ	40 % fat (6wk) + 30 mg/kg (NR)	NR	324.3 ± 27.6	NR	NR	11	NR
Hsu, 2015 [27]	Mice (C57BL/6)	M	C: 6 D: 6	HFD	45 % fat	7–8	2 wk. = 123.5 ± 14.6 4 wk. = 144.5 ± 20.4 8 wk. = 235.0 ± 42.3 16 wk. = 222.6 ± 50.4	NR	NR	2 to 16	9 to 24
Jiang, 2020 [28]	Mice (C57BL/6)	M	C: 10 D: 10	HFD	60 % fat	5	185.6 ± 45.0	4.P ≥ 200	NR	10	15
Jiang, 2021 [29]	Mice (C57BL/6)	NR	C: 8 D: 8	HFD	62 % fat	6	174.8 ± 19.3	NR	NR	8	14
Joo, 2020[5]	Rats (SD)	M	C: 8 D: 16	HFD + STZ	60 % fat (6 wk) + 30 mg/kg (i.p)	7	323.2 ± 43.4	NR	NR	10	17
Kim, 2018 [30]	Mice (C57BL/6)	NR	C: 10 D: 10	HFD	60 % fat	8	447.3 ± 41.0	3.P ≥ 200	NR	10	18
Kim, 2021 [31]	Mice (C57BL/6)	M	C: 6 D: 6	HFD	60 % fat	10	190.8 ± 7.7	NR	NR	16	26
Lai, 2020[32]	Rats (SD)	M	C: 8 D: 32	HFD + STZ	NR (5 wk) + 35 mg/kg (i.p)	5	278.6 ± 21.4	NR	8.08	14	19
Li, 2017[13]	Mice (C57BL/6)	NR	C: 8 D: 8	HFD	60 % fat	NR	200.0	4.P ≥ 200	NR	12	NR
Li, 2020[33]	Mice (C57BL/6)	F	C: 19 D: 19	HFD	NR	15	173.5 ± 1.83	NR	NR	16	31
Li, 2021[34]	Mice (C57BL/6)	M	C: 7 D: 7	HFD	45 % fat	9	198.2 ± 10.3	NR	NR	16	25
Liu, 2015[35]	Mice (C57BL/6)	M	C: 10 D: 10	HFD	45 % fat	6	172.9 ± 20.2	3.P ≥ 200	NR	10	16
Liu, 2020[36]	Mice (C57BL/6)	M	C: 15 D: 15	HFD	60 % fat	5	256.4 ± 10.5	4.P ≥ 200	NR	12	17
Martinelli, 2020[18]	Rats (Wistar)	M	C: 24 D: 36	HFD	NR	7	127.1 ± 13.7	NR	NR	17	24
Meng, 2021 [37]	Mice (C57BL/6)	M	C: 7–8 D: 7–8	HFD + STZ	NR (12 wk) + 30 mg/kg (5 days) (i.p)	7–9	350.1 ± 0.0	NR	NR	20	27–29
Obydah, 2021 [38]	Rats (SD)	M	C: 8 D: 8	HFD	60 % fat	7–9	151.4 ± 8.4	NR	NR	8	15–17
Papackova, 2012 [10]	Rats (Wistar)	M	C: 6 D: 6	HFD	33 % fat	12	2 wk.: 133.2 ± 3.6 10 wk.: 133.2 ± 1.8 82.9 ± 5.4	NR	NR	2 and 10	14 or 22
Papackova, 2012 [39]	Rats (Wistar)	M	C: 5–7 D: 5–7	HFD	60 % fat	12	NR	1.P ≥ 160	NR	4	16
Petrović, 2017[40]	Rats (Wistar)	M	C: 9 D: 9	STZ	65 mg/kg (i.p.)	8	NR	NR	NR	NA	12
Piao, 2016 [41]	Rats (Wistar)	M	C: 9 D: 7	STZ + HFD	40 mg/kg (i.p.) + NR (35 days)	NR	454.0 ± 76.3	NR	NR	22	NR

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Author, year (reference)	Species (strain)	Sex	Sample size	Diabetes induction method	% of kcal from fat/ source and/or Dose (route of administration)	Starting age of diabetes induction (wk- old)	Diabetes diagnosis method (compared with controls)			Period of Intervention (wk)	Age of tissue collection (wk-old)
							Fasting blood glucose concentration (mg/ dL) ^a	OGTT 2-h 0', 30', 60', 120' (mg/dL)	HbA1C (%)		
Shao, 2018 [42]	Mice (C57BL/ 6)	M	C: 10 D: 8	HFD + STZ	10 % lard (10 wk) + 30 mg/kg (i.p.)	6 to 8	281.4 ± 65.9	NR	NR	15	21 to 23
Sharma, 2018 [43]	Mice (C57BL/ 6)	M	C: 6 D: 6	HFD	12 % fat	5–7	354.7 ± 115.9	NR	NR	16	21 to 23
Sharma, 2021 [44]	Rats (Wistar)	M	C: 6 D: 6	HFD	40 % lard	NR	87.3 ± 6.0	NR	NR	16	NR
Son, 2021 [45]	Mice (C57BL/ 6)	M	C: 12 D: 10	HFD + STZ	60 % fat (4 wk) + 60 mg/kg (i.p.)	5	328.7 ± 43.6	4.P ≥ 200	6	18	23
Su, 2021[46]	Rats (SD)	M	C: 6 D: 6	HFD	61 % fat	NR	202.7 ± 29.7	4.P ≥ 200	NR	12	NR
Sun, 2019 [47]	Mice (C57BL/ 6)	M	C: 10 D: 10	HFD	60 % fat	6	150.2 ± 14.9	3.P ≥ 200	NR	20	26
Tian, 2020 [48]	Mice (C57BL/ 6)	M	C: 10 D: 8	HFD + STZ	NR (6 wk) + 85 mg/kg (i.p)	10	454.5 ± 99.1	NR	NR	13	23
Wang B, 2017 [49]	Mice (C57BL/ 6)	M	C: 9 D: 9	HFD	58 % fat	8	139.6 ± 26.9	3.P ≥ 200	NR	24	32
Wang M, 2017[50]	Mice (C57BL/ 6)	M	C: 6 D: 6	HFD	60 % fat	8	235.0 ± 22.1	3.P ≥ 200	NR	16	24
Wang, 2018 [51]	Rats (SD)	M	C: 6 D: 20	HFD + STZ	10 % lard (6wk) + 45 mg/kg (i.p.)	NR	>126.0	NR	NR	18	NR
Yan, 2016 [52]	Rats (SD)	M	C: 10 D: 10	HFD	45 % fat	8	110.3 ± 5.4	2.P ≥ 200	NR	20	28
Yan, 2018 [53]	Rats (SD)	F	C: 6 D: 6	HFD	NR	9–10	116.5 ± 7.6	2.P ≥ 200	NR	20	29–30
Yang, 2016 [54]	Mice (C57BL/ 6)	M	C: 8 D: 8	HFD	40 % fat	5	190.0	3.P ≥ 200	NR	9	14
Yang, 2019 [55]	Rats (SD)	M	C: 10 D: 10	HFD	10 % lard	7	153.3 ± 26.9	NR	NR	16	23
Yousry, 2019 [56]	Rats (Wistar)	M	C: 10 D: 10	HFD	40 % fat	9	161.8 ± 6.1	NR	NR	12	21
Yu, 2019[57]	Rats (SD)	M	C: 6 D: 6	HFD + STZ	20 % lard (4wk) + 40 mg/kg (NR)	NR	304.5 ± 35.8	NR	NR	12	NR
Zeng, 2015 [58]	Mice (C57BL/ 6)	M	C: 5–7 D: 5–7	HFD	44.8 % fat	7	77.5	2.P ≥ 200	NR	12	19
Zeng, 2016[59]	Mice (C57BL/ 6)	M	C: 10 D: 10	HFD	60 % fat	10	147.0	2.P ≥ 200	NR	8	18
Zeng, 2021 [60]	Rats (SD)	M	C: 6 D: 6	STZ	65 mg/kg (i.v.)	7–8	531.5 ± 66.1	NR	NR	4	11–12
Zhang, 2019 [3]	Mice (C57BL/ 6)	M	C: 5 D: 5	HFD + STZ	NR (4wk) + 60 mg/kg (i.p.)	8–10	294.6 ± 53.9	NR	NR	8	16–18
Zhao, 2019 [61]	Mice (C57BL/ 6)	M	NR	HFD	60 % fat	7	4 wk.:198.5 ± 28.5 8 wk.:189.7 ± 16.1 12 wk.: 219.4 ± 35.7 16 wk.: 232.4 ± 26.9	NR	NR	16	23
Zhou, 2018 [62]	Rats (SD)	M	C: 10 D: 75	HFD + STZ	45 % fat (8 wk) + 30 mg/kg (i.p.)	7	367.0 ± 31.0	4.P ≥ 200	NR	12	19
Zhu, 2020 [63]	Mice (C57BL/ 6)	M	C: 30 D: 30	HFD	60 % fat	72	127.9 ± 34.2	3.P ≥ 200	NR	12	84

Abbreviations: SD: Sprague Dawley; M: male; F: Female; C: control group; D: diabetic group; HFD: High-fat diet; STZ: streptozotocin; NR: not reported; NA: not applicable; i.v.: intravenous; i.p.: intraperitoneal; wk.: weeks; P: point.

^a Data are shown as mean ± SD.

3.2. Study characteristics

Table 1 describes the main features for the 48 studies included. The publication years ranged from 2010 to 2021, with 39.5 % ($n = 19$) published in 2020 and 2021 [5,18,22,23,28,29,31–34,36–38,44–46,48,60,63]. In this systematic review, 459 nondiabetic and 574 diabetic animals were used to assess the effects of DM on liver autophagy. A total of 27 studies (56.2 %) were performed on mice (C57BL/6/J strain) [3,13,22–24,27–31,33–37,42,43,45,47–50,54,58,59,61,63], whereas Wistar [10,12,18,25,39–41,44,56], and Sprague Dawley rats were included in 21 articles (43.7 %) [5,26,32,38,46,51–53,55,57,60,62]. The vast majority of the reports (40/48, 83.3 %) utilized only males as their study model. Five studies (10.4 %) did not report the animal gender [13,23,24,29,30], two declared the use of females only (4.1 %) [33,53], and one used both sexes (2.08 %) [32].

On average, the animal age for DM induction ranged from four to 72 weeks, with 33.3 % being between seven to eight weeks [5,18,27,30,37,38,40,42,49,50,52,55,58,60–62]. However, eight papers (16.6 %) failed to report the animal age at the time of induction [13,25,26,41,44,46,51,57]. Furthermore, three different animal models for DM induction were identified: (1) STZ injection (6.3 %) [25,40,60], (2) HFD (68.7 %) [10,12,13,18,22–24,27–31,33–36,38,39,43,44,46,47,49,50,52–56,58,59,61,63], and (3) combination of HFD and STZ (25 %) [3,5,26,32,37,41,42,45,48,51,57,62]. The intraperitoneal

administration route for DM induction was used in 11 papers [3,5,32,37,40–42,45,48,51,62], and the STZ doses ranged from 30 to 85 mg/kg. Alloxan-induced diabetes was not found in the selected papers.

Interestingly, when HFD was used to induce DM, the fat content varied greatly, with the lowest using 10 % kcal from fat [42,51,55] and the highest using 70 % kcal from fat [12]. Nevertheless, a large number of studies (18/48; 37.5 %) employed 58–62 % kcal of fat [5,13,24,28–31,36,38,39,45–47,49,50,59,61,63]. Nine articles (18.8 %) did not discriminate the type and content of the fat used in their HFD trial [3,18,23,32,33,37,41,48,53]. The maximum exposure period for HFD varied between 2 and 24 weeks, with half of the studies being between 12 and 16 weeks.

With one exception [40], all articles (47/48; 97.9 %) presented fasting blood glucose concentrations at the end of the intervention. Values for fasting blood glucose level in diabetic group was lower than 200 mg/dL in 26 (54.1 %) reports [10,12,13,18,23,27–29,31,33–35,38,39,44,47,49,51–55,58,59,61,63], between 201 and 300 mg/dL in nine reports (18.7 %) [3,24,27,32,36,42,46,50,61], and above 301 mg/dL in 13 studies (27.0 %) [5,22,25,26,30,37,41,43,45,48,57,60,62]. Twenty studies (41.6 %) also included the OGTT [13,23,24,28,30,35,36,39,45–47,49,50,52–54,58,59,62,63], whereas HbA1C was performed in two studies (4.1 %) [32,45].

The animal age in which outcome was assessed ranged from nine to 84 weeks, with 18 (37.5 %) reports varying from 12 to 19 weeks

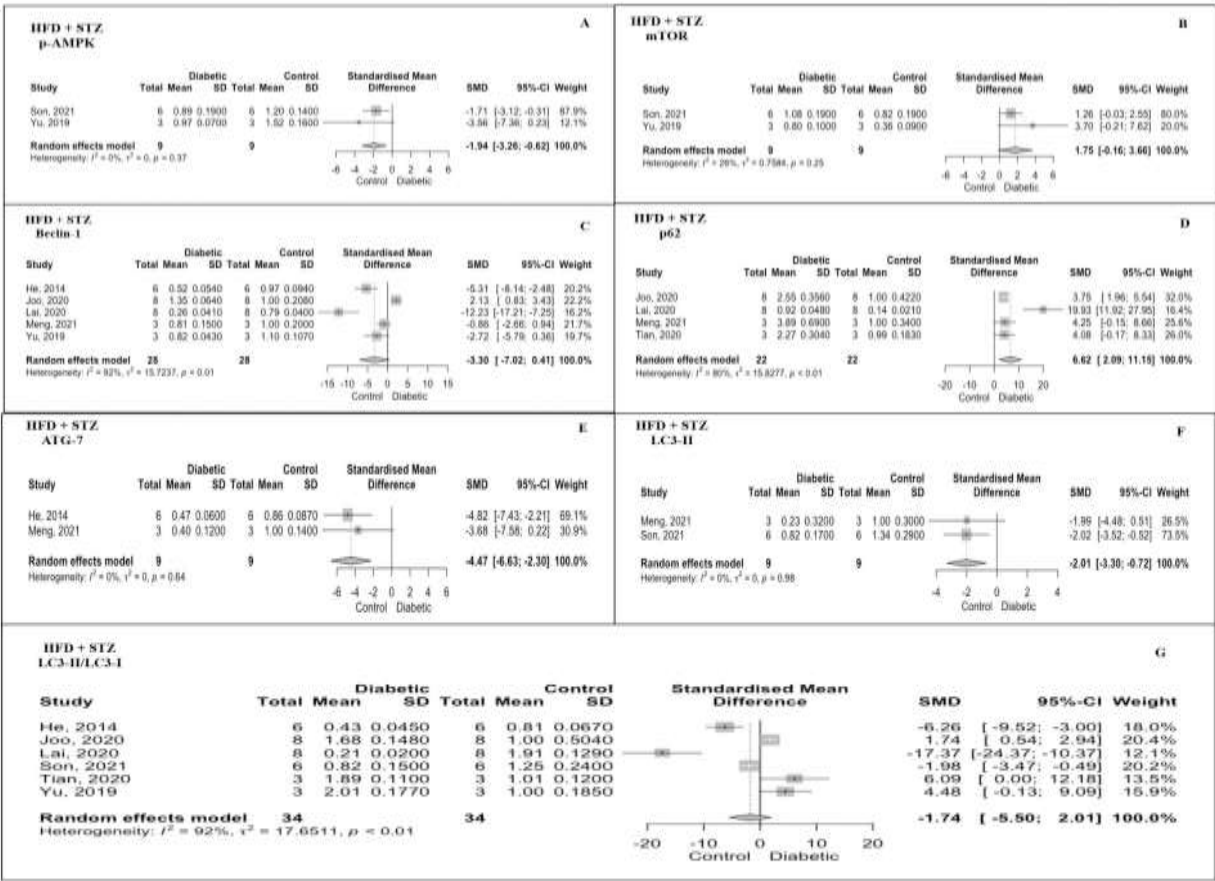


Fig. 2. Forest plots of the effect of diabetes on the protein expression of autophagy markers in the liver of rats and mice induced by HFD + STZ: p-AMPK (A), mTOR (B), Beclin-1 (C), p62 (D), ATG-7 (E), LC3-II (F), and LC3-II/LC3-I (G). Comparisons were made using standard mean differences and random effect models. Abbreviations: HFD: high-fat diet; STZ: Streptozotocin; 95 % CI: 95 % confidence interval; SMD: Standardized mean difference; SD: standard deviation.

[3,5,10,12,27–29,32,35,36,38–40,54,58–60,62], 14 reports (29.1 %) from 20 to 25 weeks [10,18,22,24,27,34,42,43,45,48,50,55,56,61], eight reports (16.6 %) from 26 to 32 weeks [23,31,33,37,47,49,52,53], and one study (2.1 %) reporting 84-week-old animals [63]. Eight articles (16.6 %) provided no information regarding animal age during outcome assessment [13,25,26,41,44,46,51,57].

3.3. Proteins involved in liver autophagy

In regards to methods of protein assessment, except for two reports [38,56], all other articles (46/48 = 95.8 %) used the western blotting (WB) technique [3,5,10,12,13,18,22–37,39–55,57–63]. Among these studies, 13 articles (27.0 %) performed more than one method to assess outcome (Supplementary Table 3) [5,10,25,26,28,34,36,41,44,47,50,59,62]; 10 of the studies (20.8 %) also used gene expression [5,10,26,36,44,47,50,56,59,62]; four used (8.3 %) immunohistochemistry (IHC) [25,38,41,62]; and three studies used (6.2 %) immunofluorescence (IF) [28,34,44].

Looking closely at the proteins reported, we have 26 papers (54.1 %) showing the outcomes related to LC3-II/LC3-I ratio [5,10,12,13,18,22,26,27,31–34,39,42,44–49,52–54,57,60,62], 24 studies (50.0 %) reporting the protein p62 [3,5,12,22–24,28,31–33,36–38,40,43,44,46,48–50,55,60,62,63], 21 papers (43.7 %) with Beclin-1 [5,10,23,26,29,32,35,37,40,42–44,47,50–53,57,59,61,62], and 20 studies (41.6 %) with LC3-II [3,23–25,27,31,35–38,40,41,45,50,51,55,56,58,62,63]. Additionally, other proteins analyzed were p-mTOR/mTOR (14 studies = 29.2 %) [13,22,31,35,37,44–47,50,57,59,62,63], mTOR (one paper = 2.0 %) [45], p-AMPK/AMPK (13 papers = 27.0 %) [13,22,27,31,34,37,43,44,46,54,58,59,63], p-AMPK (6 papers = 12.5 %) [27,34,44,45,50,57], AMPK (5 studies = 10.4 %) [5,27,32,44,45], ATG-3 (4 papers = 8.3 %) [47,52,53,61], ATG-5 (10 studies = 20.8 %) [23,30,32,35,37,46,50,52,53,61], ATG-7 (9 papers = 18.7 %) [22–24,26,30,36,46,59,61], ATG-12 (3 studies = 6.2 %) [31,46,47], ATG-16 (one paper = 2.0 %) [10], LAMP-2 (5 papers = 10.4 %) [3,23,28,29,34], and LC3-I (3 studies = 6.2 %) [27,38,45] (Supplementary Table 3).

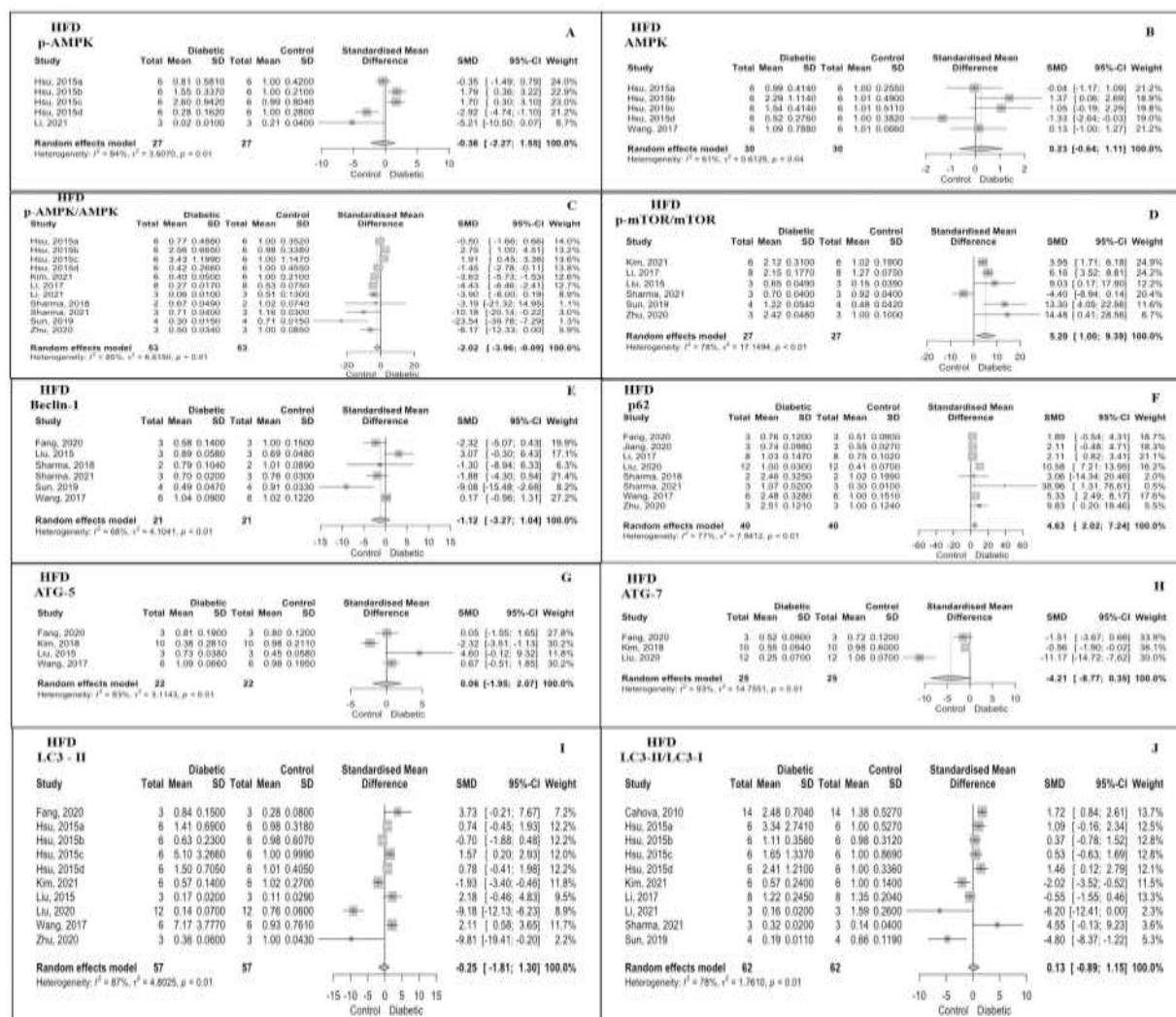


Fig. 3. Forest plots of the effect of diabetes on the protein expression of autophagy markers in the liver of rats and mice induced by HFD: p-AMPK (A), AMPK (B), p-AMPK/AMPK (C), p-mTOR/mTOR (D), Beclin-1 (E), p62 (F), ATG-5 (G), ATG-7 (H), LC3-II (I), and LC3-II/LC3-I (J). Comparisons were made using standard mean differences and random effect models. Abbreviations: HFD: high-fat diet; 95 % CI: 95 % confidence interval; SMD: Standardized mean difference; SD: standard deviation.

Table 2
Summary of findings of subgroup meta-analysis according to animal strain.

Outcome	Animal (strain)	Standardized mean difference (95 % CI)	P	I ²
HFD				
LC3-II	C57BL/6	−0.25 (−1.81 to 1.3)	0.749	87.1 %
LC3-II/LC3-I	C57BL/6	−0.02 (−1.04 to 0.99)	0.9605	78.9 %
	Wistar	2.16 (0.14 to 4.18)	0.035	26.4 %
Beclin-1	C57BL/6	−1.04 (−3.78 to 1.70)	0.456	71 %
	Wistar	−1.88 (−4.3 to 0.53)	0.127	NA
p62	C57BL/6	4.43 (1.93 to 6.93)	0.0005	77.7 %
	Wistar	38.95 (1.30 to 76.61)	0.04	NA
ATG-5	C57BL/6	0.05 (−1.95 to 2.06)	0.954	83.1 %
ATG-7	C57BL/6	−4.21 (−8.76 to 0.34)	0.07	93.3 %
AMPK	C57BL/6	0.23 (−0.64 to 1.11)	0.60	61 %
p-AMPK	C57BL/6	−0.35 (−2.26 to 0.55)	0.71	84.2 %
p-AMPK/AMPK	C57BL/6	−1.75 (−3.68 to 0.18)	0.07	85.5 %
	Wistar	−10.18 (−20.14 to −0.22)	0.04	NA
p-mTOR/mTOR	C57BL/6	6.37 (3.54 to 9.21)	0.0001	42.7 %
	Wistar	−4.40 (−8.94 to 0.14)	0.057	NA
HFD + STZ				
LC3-II	C57BL/6	−2.01 (−3.29 to −0.72)	0.002	0 %
LC3-II/LC3-I	C57BL/6	1.48 (−6.34 to 9.32)	0.709	84.3 %
	Sprague Dawley	−3.78 (−10.52 to 2.96)	0.27	93.8 %
Beclin-1	C57BL/6	−0.85 (−2.66 to 0.94)	0.34	NA
	Sprague Dawley	−4.20 (−9.70 to 1.30)	0.13	93.8 %
p62	C57BL/6	4.16 (1.10 to 7.22)	0.007	0 %
	Sprague Dawley	11.35 (−4.47 to 27.18)	0.16	93.0 %
ATG-5	Sprague Dawley	−17.38 (−24.38 to −10.37)	0.0001	NA
ATG-7	C57BL/6	−3.68 (−7.57 to 0.21)	0.064	NA
	Sprague Dawley	−4.81 (−7.42 to −2.20)	0.0003	NA
p-AMPK	C57BL/6	−1.71 (−3.12 to −0.30)	0.017	NA
	Sprague Dawley	−3.56 (−7.35 to 0.23)	0.06	NA
mTOR	C57BL/6	1.26 (−0.02 to 2.55)	0.054	NA
	Sprague Dawley	3.70 (−0.21 to 7.61)	0.06	NA

Abbreviations: CI: Confidence interval; HFD: High-fat diet; STZ: streptozotocin; NA: not applicable. Bold values denote statistical significance at the $p < 0.05$ level.

Table 3
Meta-regression analysis of factors affecting heterogeneity.

		Number of studies	Coefficient	95 % CI	SE	z	p-value	R ²	I ²
LC3-II	Glycemia	7	−0.0133	−0.0525	0.0259	0.02	−0.6667	0.505	88.5 %
	Death age	7	−0.0071	−0.0268	0.0126	0.0101	−0.7054	0.4806	88.6 %
	HFD %	6	−0.2529	−0.4761	−0.0296	0.1139	−2.22	0.0264	88.0 %
	HFD days	7	−0.0091	−0.0488	0.0305	0.0202	−0.4515	0.6516	88.5 %
LC3-II/LC3-I	Glycemia	7	−0.0166	−0.0375	0.0044	0.0107	−1.5521	0.1206	75.6 %
	Death age	5	0.0027	−0.008	0.0133	0.0054	0.4893	0.6246	0 %
	HFD %	7	−0.05	−0.1665	0.0665	0.0594	−0.8413	0.4002	80.5 %
	HFD days	7	−0.0226	−0.0437	0.0016	0.0107	−2.1051	0.0353⁺	28.0 %
Beclin-1	Glycemia	6	0.0088	−0.0262	0.0438	0.0179	0.4915	0.6231	0 %
	Death age	5	−0.0582	−0.12	0.0035	0.0315	−1.8481	0.0646	47.2 %
	HFD days	6	−0.0772	−0.1408	−0.0136	0.0324	−2.3799	0.0173⁺	63.0 %
p62	Glycemia	8	0.0355	−0.0183	0.0892	0.0274	1.294	0.1957	65.7 %
	Death age	6	0.0047	−0.0216	0.031	0.0134	0.3506	0.7259	0 %
	HFD %	8	−0.0192	−0.4062	0.3677	0.1974	−0.0975	0.9223	0 %
	HFD days	7	0.0125	−0.0913	0.1164	0.053	0.2364	0.8131	0 %
p-AMPK/AMPK	Glycemia	8	0.0126	−0.0348	0.0601	0.0242	0.5212	0.6022	0 %
	Death age	6	−0.0169	−0.0296	−0.0043	0.0064	−2.6314	0.0085⁺	39.3 %
	HFD %	8	−0.2284	−0.4321	−0.0248	0.1039	−2.1983	0.0279⁺	40.7 %
	HFD days	8	−0.0622	−0.1116	−0.0127	0.0252	−2.4644	0.0137⁺	5.9 %
p-mTOR/mTOR	Glycemia	6	0.0882	0.0136	0.1627	0.038	2.3187	0.0204⁺	57.1 %
	HFD %	6	0.4236	0.0265	0.8207	0.2026	2.0906	0.0366⁺	45.6 %
	HFD days	6	−0.0196	−0.2461	0.2069	0.1156	−0.1695	0.8654	0.0 %

⁺ Statistically significant at $p < 0.05$. Bold values denote statistical significance at the $p < 0.05$ level.

3.4. Effects of HFD-induced diabetes on autophagy-related proteins

In the studies selected for analysis, we identified three methods for DM induction: STZ, HFD, and a combination of STZ and HFD. The papers that used STZ as their sole induction method, however, failed to report sufficient data (i.e., mean and standard deviation), thus not allowing the performance of a more comprehensive meta-analysis. For this reason, the changes in autophagy-related proteins described herein are related

to HFD or STZ + HFD induction methods.

Results from seven studies [5,26,32,37,45,48,57] using HFD + STZ for diabetes induction showed that diabetic murines presented elevated p62 in liver compared to the nondiabetic murines (SMD 6.62, 95 % CI 2.09 to 11.15, $p = 0.004$; $I^2 = 80$ %), and decreased p-AMPK (SMD −1.94, 95 % CI −3.26 to −0.62, $p = 0.004$; $I^2 = 0$ %), ATG-7 (SMD −4.47, 95 % CI −6.63 to −2.30, $p < 0.0001$; $I^2 = 0$ %) and LC3-II protein (SMD −2.01, 95 % CI −3.30 to −0.72, $p = 0.002$; $I^2 = 0$ %). Diabetes did not affect the

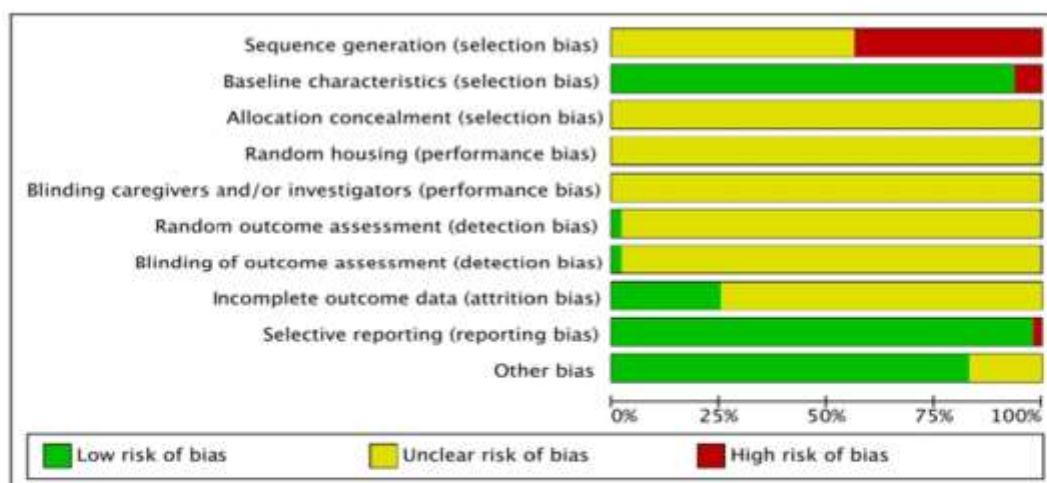


Fig. 4. Risk of bias per item within animal studies assessed using the SYRCLE Risk of Bias tool.

liver expression of mTOR (SMD 1.75, 95 % CI -0.16 to 3.66, $p = 0.072$; $I^2 = 26$ %), Beclin-1 protein (SMD -3.30, 95 % CI -7.02 to 0.41, $p = 0.08$; $I^2 = 92$ %), or hepatic ratio of LC3-II/LC3-I (SMD -1.74, 95 % CI -5.50 to 2.01, $p = 0.363$; $I^2 = 92$ %) (Fig. 2).

The meta-analysis from 16 studies [12,13,23,27,28,30,31,33–36,43,44,47,50,63] showed that HFD-induced diabetic murines presented higher p-mTOR/mTOR ratio (SMD 5.20, 95 % CI 1.00 to 9.39, $p = 0.015$; $I^2 = 78$ %), higher expression of p62 in the liver (SMD 4.63, 95 % CI 2.02 to 7.24, $p = 0.0005$; $I^2 = 77$ %), and decreased p-AMPK/AMPK ratio (SMD -2.02, 95 % CI -3.96 to -0.09, $p = 0.040$; $I^2 = 85$ %) (Fig. 3) compared to the nondiabetic murines. In addition, diabetes caused no alteration on the liver expression of p-AMPK (SMD -0.36, 95 % CI -2.27 to 1.55, $p = 0.713$; $I^2 = 84$ %), AMPK (SMD 0.23, 95 % CI -0.64 to 1.11, $p = 0.602$; $I^2 = 61$ %), Beclin-1 (SMD -1.12, 95 % CI -3.27 to 1.04, $p = 0.309$; $I^2 = 68$ %), ATG-5 (SMD 0.06, 95 % CI -1.95 to 2.07, $p = 0.954$; $I^2 = 83$ %), ATG-7 (SMD -4.21, 95 % CI -8.77 to 0.35, $p = 0.070$; $I^2 = 93$ %), LC3-II protein (SMD -0.25, 95 % CI -1.81 to 1.30, $p = 0.749$; $I^2 = 87$ %) and LC3-II/LC3-I ratio (SMD 0.13, 95 % CI -0.89 to 1.15, $p = 0.806$; $I^2 = 78$ %) (Fig. 3).

In the subgroup analysis, there was stratification according to the type of animal strain. The C57BL/6 mice that consumed the HFD presented higher p62 expression (SMD 4.43, 95 % CI 1.93 to 6.93, $p = 0.0005$; $I^2 = 77.7$ %) and higher p-mTOR/mTOR ratio (SMD 6.37, 95 % CI 3.54 to 9.21, $p = 0.0001$; $I^2 = 42.7$ %). Wistar rats that consumed the HFD presented decreased p-AMPK/AMPK ratio (SMD -10.18, 95 % CI -20.14 to -0.22, $p = 0.04$; $I^2 = NA$), while p62 expression (SMD 38.95, 95 % CI 1.30 to 76.61, $p = 0.04$; $I^2 = NA$) and LC3-II/LC3-I ratio (SMD 2.16, 95 % CI 0.14 to 4.18, $p = 0.035$; $I^2 = 26.4$ %) remained elevated. C57BL/6 mice who received HFD + STZ also showed an increase in p62 (SMD 4.16, 95 % CI 1.10 to 7.22, $p = 0.007$; $I^2 = 0$ %), but presented that decrease LC3-II (SMD -2.01, 95 % CI -3.29 to -0.72, $p = 0.002$; $I^2 = 0$ %) and p-AMPK (SMD -1.71, 95 % CI -3.12 to -0.30, $p = 0.017$; $I^2 = NA$). Sprague Dawley rats who received HFD + STZ showed a decrease in ATG-5 (SMD -17.38, 95 % CI -24.38 to 10.37, $p = 0.0001$; $I^2 = NA$) and ATG-7 (SMD -4.81, 95 % CI -7.42 to -2.20, $p = 0.0003$; $I^2 = NA$) (Table 2).

We also conducted a meta-regression to assess the variables for glycemic level, animal age, the fat percentage in the HFD, days of HFD exposure, and primary outcomes in the HFD subgroup. Based on the meta-regression analysis, the results show that with increasing time of exposure to HFD, the LC3-II/LC3-I ratio ($p = 0.0353$), p-AMPK/AMPK ($p = 0.0137$), and Beclin-1 ($p = 0.0173$) expression significantly

decreased. The increased fat percentage of HFD was significantly associated with a decrease in the protein expression of LC3-II ($p = 0.0264$) and p-AMPK/AMPK ratio ($p = 0.0279$). The reduction of the p-AMPK/AMPK ratio is also associated with the increase in the animal's age ($p = 0.0085$). However, as glycemic levels ($p = 0.0204$) and fat percentage of HFD ($p = 0.0366$) increase, the p-mTOR/mTOR ratio also increases. When other primary outcomes were combined with the variables, no significant association was found (Table 3).

3.5. Analysis of bias

Fig. 4 shows the assessment of bias risk for each item in animal studies. Information about the sequence allocation was absent in 21 studies (43.7 % high risk, 56.2 % clear risk) [3,10,12,13,18,24,30–32,36,37,39–41,43,47,49–51,59,63]. Baseline characteristics were reported in 45 articles (93.7 % low risk) [3,5,10,12,18,22–28,31–63]. In all studies (100 % unclear risk), the information on the methods used for animal allocation concealment sequence, evidence of animals housed randomly, and evidence of blinded caregivers and/or researchers was lacking. Only one study (98 % unclear risk) [24] reported information about the random evaluation of results. One study selected (98 % unclear risk) [38] provided evidence on blinded assessors for outcomes. In most studies (75 % unclear risk vs 25 % low risk), information on incomplete outcomes was unclear. There was a low risk of selective outcome (97.9 % low risk vs 2.1 % high risk). Other sources of bias were considered at unclear risk level in eight studies (16.6 % unclear risk vs 83.3 % low risk) [12,25,30,38,48,52,53,62]. An additional file shows the risk of bias in more detail (Supplementary Fig. 1).

4. Discussion

4.1. Main findings

Animal models of human diseases are an integral part of preclinical research, allowing researchers to facilitate mechanistic studies that are not possible in humans [64]. We developed the first systematic review and meta-analysis of the effects of diabetes on the mechanisms of hepatic autophagy. The results show that the autophagy process can be used as a significant diagnostic option approach by combining genetic and protein levels for diabetes and its hepatic complications. Through this review, we collected information from diabetic models in murines, as well as we identified the methods for induction of diabetes, their

pathways of determination, and their relationships with the autophagy proteins/genes.

Our results indicate that diabetic animals fed HFD present defective liver autophagy, thus contributing to MAFLD and insulin resistance, which compromises this important organ. The combination of HFD and STZ (at a single intraperitoneal injection or multiple low dose injections of 30–40 mg/kg intraperitoneally) is a widely used method for the induction of DM2 [16,32]. In turn, when treating with a single injection of STZ at a high dose (>60 mg/kg), a massive pancreatic beta-cell destruction is seen, resulting in the induction of DM1 [16]. These models are well-established and adopted according to the normative functions used for humans [1]. Regarding the murine strains used in the selected studies, only the conventional ones (e.g., Wistar or Sprague-Dawley rats and C57BL/6 mice) were used. Although these strains have proven advantages [65], we found no standardization for animal age. This inconsistency in choosing animals for experimental or laboratory models has the potential to impact data quality, lower scientific validation, and increase experimental variability [66].

Concerning autophagy process, there is no “gold standard” for determining autophagy status, and that can be applied in all biological or experimental contexts [11]. Autophagy is a highly dynamic process, that can be modulated both positively and negatively in a tissue-dependent manner [11,67]. However, it is useful to establish references for experimental assays that can be used to monitor the autophagy process in different models, including diabetes. The quality of autophagy assessment depends on the technique employed [3,68]. Ultrastructural analysis using electron microscopy is considered the classical method to detect autophagosomes [11]. However, since electron microscopy is time-consuming and costly, this technique has been replaced by the detection of autophagic proteins using antibodies [69]. In this scenario, the use of the WB technique has gained great attention as a simple but powerful procedure to evaluate protein expression in the autophagic pathway [11]. In the selected studies, we also observed the use of IHC, which shows advantages such as fast response time, low cost, and easy performance [70]. Nevertheless, most IHC staining protocols for proteins associated with autophagy have not been validated for multiple proteins, including unspecified labeling of cellular structures [11,70].

Among the proteins used to assess autophagy, LC3 stands out [11]. The amount of LC3-II correlates with the number of autophagosomes formed [8,11], and the LC3-II/LC3-I ratio is considered an indicator of autophagy intensity [11,12]. In our review, four studies evaluated LC3 by IHC [25,38,41,62]. The IHC technique for LC3 might be challenging because, in tissues such as the liver, this protein may be located in structures other than the autophagosome (e.g., lipid droplets). Moreover, information related to autophagy can be provided by techniques such as qRT-PCR for LC3 mRNA levels assessment [11]. Despite the existence of two articles reporting mRNA levels for LC3, they could not be pooled in the quantitative analysis due to insufficient data [56,62].

Although LC3 has been widely used to investigate autophagy, other proteins can also be applied for this purpose. Beclin-1 is a key protein for initiating autophagy [11], and has been extensively used by many researchers [5,10,23,26,29,32,35,37,40,42–44,47,50–53,57,59,61,62], as well the protein p62 [3,5,13,22–24,28,31–33,36–38,40,43,44,46,48–50,55,60,62,63]. Additionally, ATG proteins mediate the expansion of the phagophore and autophagosome formation [8]. Most ATG genes show no relevant changes in mRNA levels when autophagy is induced [11]. Thus, other parameters should be used in conjunction.

4.2. Implications

Because autophagy is an essential process for cellular homeostasis, any change in activity within this pathway should be explored. This study shows consistent evidence that nutrient and energy surplus associated with diabetes inhibits the mechanism of autophagy in the liver tissue of murines. This finding might be explained by the high-energy

substrates and/or high plasma insulin conditions, which lead to metabolic unbalance [71]. As a consequence, the mTOR, an important nutrient sensor and regulator of insulin action on metabolism, is over-activated through the class PI3K/AKT pathway [8]. Corroborating with this fact, our meta-analysis demonstrated that p-mTOR/mTOR activity increased in the liver of diabetic murine, while the p-AMPK/AMPK ratio was diminished, thus, affecting the full cycle of autophagy. When autophagy is inhibited by mTOR, several problems related to the retention of poorly folded molecules and aged/dysfunctional cellular organelles can be observed [8]. Furthermore, the lower AMPK activity contributes to the intracellular lipid accumulation and stocks, reduces autophagy capacity, and contributes to a vicious cycle resulting in metabolic deterioration, insulin resistance, and the perpetuation of DM2 [14,72].

Our findings also showed that diabetic murine, induced by HFD or HFD + STZ, present a greater expression of p62 in the liver. When autophagy is weakened and defective, the p62 protein accumulates in the cytoplasm, resulting in autophagosome buildup [40,73]. Studies suggest excessive p62 might activate caspase-8 [72], reinforcing the relationship between impaired autophagy, cell death, and liver damage [27,53]. In addition, under nutrient-rich conditions, the expression of p62 in hepatocytes promotes constitutive activation of mTOR through p62/TRAF6 interaction. This activation might anticipate fibrosis and liver damage, linking the accumulation of p62 to MAFLD [73]. Finally, deficiency in the function of p62 increases the activity of the adipogenic regulator PPAR γ . PPAR γ inhibits autophagy and imparts the characteristics of the metabolic syndrome with glucose intolerance and insulin resistance [74,75].

When observing the animals induced with the association HFD + STZ, our data showed that chronic high fat and glucose load decreased expression of ATG-7 and affected the lower conversion of LC3-I to LC3-II. In mammals, ATG-7 is essential for ATG-12 conjugation, LC3 modification systems, and autophagosome formation [14,26]. Singh et al. [14] demonstrate that mice knocked the ATG-7 gene, which displayed a massive accumulation of triglycerides and cholesterol, and impaired liver.

The present study used subgroup analysis in rats and mice to assess the autophagic hepatic protein expression species-specific responses. The results indicate that decreased p-AMPK and increase p62 are common responses between species and independent of the induced-diabetes method. However, one major aspect shown by this review is that the LC3-II/LC3-I ratio remained elevated in rats fed HFD while it remained unchanged in mice. Meanwhile, mouse-specific responses were phenotypically anchored to mTOR accumulation. This species-specific response is most likely related to differences in the genes involved with lipid metabolism [76]. Another noteworthy finding is that only Sprague Dawley rats induced with HFD + STZ had decreased expression of ATGs. Therefore, our review emphasizes that differences between mice and rats exist and they should always be considered when extrapolating results across species.

Based on meta-regression results, we bring evidence that decreased proteins of the macroautophagic pathway are correlated with the increase in the p-mTOR/mTOR ratio (due increase glycemic levels and/or exposure to abnormally high lipid concentrations). When nutrients are available, mTOR is activated. From a clinical perspective, chronic mTOR activation contributes to obesity by mediating excess fat deposition and insulin desensitization, which translates into reduced glucose uptake and glycogen synthesis in the liver and muscle, along with increased gluconeogenesis and glucose released by the liver. Collectively, these effects lead to a worsening of hyperglycemia and hyperinsulinemia that are generated by excess nutrients [77]. Our meta-regression also demonstrates that the duration of an HFD affects the autophagy response in the liver. Rodents receiving an HFD for short time have a marked increase in autophagy, whereas there is a decrease in autophagy in rodents receiving an HFD for the long-term [10,27]. There is speculation that this transitional increase of autophagy in the acute phase may represent

an adaptive mechanism to get rid of the fat overload [10], but chronic HFD suppressed autophagic responses in the liver. Finally, our results showed that aging is related to a lower ability to activate AMPK. Since aged mice are more prone to develop insulin resistance than younger mice [78], these results reinforce the importance of an animal's age when evaluating autophagy. Furthermore, it is well known that the chances of developing diabetes increase in middle-aged humans and may accelerate the aging processes [79], thereby making aging, autophagy, and diabetes tightly interconnected. However, the experimental results must be analyzed together with other parameters (glucose levels, insulin, mitochondrial parameters, oxidative stress, inflammatory outcomes, and cell death). For, when responding to perturbations in the extracellular environment, cells tune autophagic flux to meet intracellular metabolic demands and support possible repair mechanisms [67].

4.3. Limitations and strengths

This study presents unique and relevant strengths. First, it connects and improves our view of the relationship between diabetes and autophagy. Second, a comprehensive search in three databases was performed, giving us an astonishing amount of 1033 animals. Analysis of the selected literature indicates that HFD-related diabetes can negatively influence liver autophagy in murines. Additionally, the results presented in this study can be used to plan, develop, and modify future studies and protocols. Furthermore, new approaches can be established using 3D organoids liver [80,81]. The development of new technologies permits to decrease the limitations existing in animal models and to study of the role of autophagy in maintenance and tissue self-organization. Although this review was conducted on murines, protocols using HFD are known to be suitable preclinical models, mimicking the full spectrum of the metabolic and histological features of human MAFLD including obesity, diabetes, insulin resistance, and, most importantly, liver inflammation [82].

In contrast, there are some limitations to be pointed out. No paper reported how the sample size or power of studies was calculated. Moreover, the studies included in this review employed different intervention periods, a great disparity in fat content, and significant heterogeneity among them. According to literature, humans obtain about 30 % of their daily calories from fat, which is less than the 60 % calories from fat used in many murine studies [17]. However, for greater translational effect, it is imperative to adequately choose the fat percentage and composition of diets when using HFD-models. Although we included the study from Cahova et al. [12], which did not consider the glycemic level for DM diagnosis, they presented favorable diabetic induction criteria with higher glycemic and insulin levels for the DM group compared to the control. It is important to highlight that studies evaluating autophagy in STZ-induced diabetic murine are scarce, thus opening a field for future investigations. In addition, only three studies used females [32,33,53]. Evidence suggests differences in glucose and lipid metabolism between men and women are due to sex hormones [83]. Women are generally less likely to suffer from the consequences of diet-induced DM than men [84]. The disparity between genders for phenotypes of diet-induced insulin resistance and glucose intolerance is even more prevalent in mice and rats, with males being the most affected [17]. Therefore, the scarcity of female studies makes it difficult to confirm a probable sex influence on the autophagy process, leaving this question open for future research. Lastly, although several guidelines have been published and used for the interpretation of autophagy measurements [11], the autophagy flux stands out since it provides details about the sequestered and degraded amount. Despite that, Papáková et al. [10] were the only ones to measure the *in vivo* autophagy flux. Our quality assessment shows that key methodological aspects were often not reported in sufficient detail or were not reported at all. We recommend researchers do adequate animal experiments and manuscript confection according to the *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments* (ARRIVE) guidelines, which improve the quality of

studies and enable its reproduction [85].

5. Conclusions

This study shows that diabetic rats and mice, which have been induced by HFD or HFD + STZ administration, present defective hepatic autophagy related to higher mTOR expression, p62 accumulation, and decreased AMPK expression. Rat and/or mouse-specific protein changes were associated with the inhibition and impairment of cellular autophagy. Furthermore, the meta-regression results showed a decrease in HFD-induced autophagy responses as increased glycemic levels, fat percentage, long-term exposure, or the animal age advanced. The imbalance of (auto)phagolysosomes contributes to metabolic dysfunction-associated fatty liver disease and cell death. These findings are of the utmost importance since HFD consumption, as well as diabetes incidence, are growing exponentially due to current lifestyle choices. The understanding of these autophagy pathways will provide new opportunities for treatment of damaged liver caused by excess calorie intake and metabolic diseases. This systematic review, however, emphasizes the need for well-designed methodological studies to reduce potential bias from animal-based research.

CRedit authorship contribution statement

Larissa Lopes da Cruz: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing; **Giovana Vesentini:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - Review & Editing; **Yuri Karen Sinzato:** Conceptualization, Methodology, Writing - Review & Editing; **Ana Izabel Silva Balbin Villaverde:** Writing - Review & Editing; **Gustavo Tadeu Volpato:** Conceptualization, Methodology, Writing - Review & Editing; **Débora Cristina Damasceno:** Conceptualization, Methodology, Validation, Writing - Review & Editing, Supervision, Funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) [Grant number 2016/25207-5]; and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [Finance Code 001].

Declaration of competing interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors thank the staff of the Research Support Center (EAP) from the Botucatu Medical School (Unesp), Dr. Vânia dos Santos Nunes Nogueira and Dr. José Eduardo Corrente for technical support, and Barshana Karki from Boston, Massachusetts (USA) and Helena Hanson from Springfield, Virginia (USA) for improving English writing.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121012>.

References

- [1] American Diabetes Associationcollab <collab>ADA, Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes—2022, *Diabetes Care* 45 (2022) 17–38, <https://doi.org/10.2337/dc22-5002>.

- [2] S. Softic, K.L. Stanhope, J. Boucher, S. Divanovic, M.A. Lanasa, R.J. Johnson, C. R. Kahn, Fructose and hepatic insulin resistance, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 57 (2020) 308–322, <https://doi.org/10.1080/10408363.2019.1711360>.
- [3] Y. Zhang, Y. Cao, J. Chen, H. Qin, L. Yang, A new possible mechanism by which punicagin protects against liver injury induced by type 2 diabetes mellitus: upregulation of autophagy via the Akt/FoxO3a signaling pathway, *J. Agric. Food Chem.* 67 (2019) 13948–13959, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05910>.
- [4] L.P. Bechmann, R.A. Hannivoort, G. Gerken, G.S. Hotamisligil, M. Trauner, A. Canbay, The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases, *J. Hepatol.* 56 (2012) 952–964, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.08.025>.
- [5] H.W. Joo, Y.S. Song, I.H. Park, G.Y. Shen, J.H. Seong, N.K. Shin, A.H. Lee, H. Kim, K.S. Kim, Granulocyte colony stimulating factor ameliorates hepatic steatosis associated with improvement of autophagy in diabetic rats, *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2020 (2020) 1–9, <https://doi.org/10.1155/2020/2156829>.
- [6] M. Eslam, A.J. Sanyal, J. George, MAFLD: a consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease, *Gastroenterology* 158 (2020) 1999–2014, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.11.312>.
- [7] M. Eslam, P.N. Newsome, S.K. Sarin, Q.M. Anstee, G. Targher, M. Romero-Gomez, S. Zelber-Sagi, W. Vei-Sun Wong, J.F. Dufour, J.M. Schattenberg, T. Kawaguchi, M. Arrese, L. Valenti, G. Shiha, C. Tiribelli, H. Yki-Järvinen, F. Jian-Gao, H. Grenbek, Y. Yilmaz, H.C. Pinto, C.P. Oliveira, P. Bedossa, L.A. Adams, M. H. Zheng, Y. Foud, W. Kheong-ghan, N. Mendez-Sánchez, S.H. Ah, L. Castera, E. Bugianesi, V. Ratzl, J. George, A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: an international expert consensus statement, *J. Hepatol.* 73 (2020) 202–209, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.03.039>.
- [8] C. Ardem, A role for glucagon-like peptide-1 in the regulation of β -cell autophagy, *Peptides* 100 (2018) 85–93, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.12.002>.
- [9] A.R. Herrenbrück, L.M. Bollinger, Role of skeletal muscle autophagy in high-fat-diet-induced obesity and exercise, *Nutr. Rev.* 78 (2020) 56–64, <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuz044>.
- [10] Z. Papáková, H. Danková, E. Páleníková, L. Kazdová, M. Cahová, Effect of short- and long-term high-fat feeding on autophagy flux and lysosomal activity in rat liver, *Physiol. Res.* 61 (2012) 67–76, <https://doi.org/10.33549/physiolres.932394>.
- [11] D.J. Klionsky, A.K.A. Aziz, S. Abdelfatah, M. Abdellatif, A. Abdoli, S. Abel, H. Abolovich, M.H. Abildgaard, A.P. Yakubu, A. Acevedo-Arozana, et al., Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy, in: *Autophagy*, 4th edition 17, 2021, pp. 1–382, <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280>.
- [12] M. Cahová, H. Danková, E. Páleníková, Z. Papáková, L. Kazdová, The autophagy-lysosomal pathway is involved in TAG degradation in the liver: the effect of high-sucrose and high-fat diet, *Folia Biol. (Praha)* 56 (2010) 173–182.
- [13] X. Li, H. Gong, S. Yang, L. Yang, Y. Pan, Y. Zhou, Pectin bee pollen polysaccharide from *Rosa rugosa* alleviates diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance via induction of AMPK/mTOR-mediated autophagy, *Molecules* 22 (2017) 699, <https://doi.org/10.3390/molecules22050699>.
- [14] R. Singh, S. Kaushik, Y. Wang, Y. Xiang, I. Novak, M. Komatsu, K. Tanaka, A. Maria Cuervo, M.J. Czaja, Autophagy regulates lipid metabolism, *Nature* 458 (2009) 1131–1135, <https://doi.org/10.1038/nature07976>.
- [15] W.J. Kwanten, W. Martinet, P.P. Michielien, S.M. Franque, Role of autophagy in the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease: a controversial issue, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 7325–7338, <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7325>.
- [16] M.S. Islam, R.D. Wilson, Experimentally induced rodent models of Type 2 diabetes, in: H.G. Joost, H. Al-Hasani, A. Schürmann (Eds.), *Animal Models in Diabetes Research, Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, 2012, pp. 161–173.
- [17] M. Kleinert, C. Clemmensen, S.M. Hofmann, M.C. Moore, S. Renner, S.C. Woods, P. Huypens, J. Beckers, M.H. de Angelis, A. Schürmann, M. Bakhti, M. Klingenspor, M. Heiman, A.D. Cherrington, M. Ristow, H. Lickert, E. Wolf, P.J. Havel, T. D. Müller, M.H. Tschöp, Animal models of obesity and diabetes mellitus, *Nat. Rev. Endocrinol.* 14 (2018) 140–162, <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.161>.
- [18] I. Martinelli, M.V. Micioni Di Bonaventura, M. Moruzzi, C. Amantini, F. Maggi, M. G. Gabrielli, A. Fruganti, A. Marchegiani, F. Dini, C. Marini, C. Polidori, G. Lupidi, F. Amenta, S.K. Tayebati, C. Cifani, D. Tomassoni, Effects of *Prunus cerasus* L. seeds and juice on liver steatosis in an animal model of diet-induced obesity, *Nutrients* 12 (2020) 1308, <https://doi.org/10.3390/nut12051308>.
- [19] M. Ouzzani, H. Hammady, Z. Fedorowicz, A. Elmagarmid, Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews, *Syst. Rev.* 5 (2016) 210, <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4>.
- [20] C.R. Hooijmans, M.M. Roovers, R.B. de Vries, M. Leenaars, M. Ritskes-Hoitinga, M. W. Langendam, SYRCL's risk of bias tool for animal studies, *BMC Med. Res. Methodol.* 14 (2014) 43, <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-43>.
- [21] J.P.T.T.J. Higgins, J. Chandler, M. Cumpston, T. Li, M.J. Page, V.A. Welch (Eds.), *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*, second ed, John Wiley & Sons, Chichester, 2019.
- [22] G. Baiges-Gaya, S. Fernández-Arroyo, F. Luciano-Mateo, N. Cabré, E. Rodríguez-Tomás, A. Hernández-Aguilera, H. Castañé, M. Romeu, M.R. Nogués, J. Camps, J. Joven, Hepatic metabolic adaptation and adipose tissue expansion are altered in mice with steatohepatitis induced by high-fat high sucrose diet, *J. Nutr. Biochem.* 89 (2021), 108559, <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108559>.
- [23] Y. Fang, L. Ji, C. Zhu, Y. Xiao, J. Zhang, J. Lu, J. Yin, L. Wei, Liraglutide alleviates hepatic steatosis by activating the TFE β -regulated autophagy-lysosomal pathway, *Front. Cell Dev. Biol.* 8 (2020), 602574, <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.602574>.
- [24] Q. Guo, Q. Shi, H. Li, J. Liu, S. Wu, H. Sun, B. Zhou, Glycolipid metabolism disorder in the liver of obese mice is improved by TUDCA via the restoration of defective hepatic autophagy, *Int. J. Endocrinol.* 2015 (2015), 687938, <https://doi.org/10.1155/2015/687938>.
- [25] S. Hagiwara, H. Iwasaka, H. Koga, A. Hasegawa, K. Kudo, J. Kusaka, Y. Oyama, T. Noguichi, Stimulation of autophagy in the liver by lipopolysaccharide-induced systemic inflammation in a rat model of diabetes mellitus, *Biomed. Res.* 31 (2010) 263–271, <https://doi.org/10.2220/biomedres.31.263>.
- [26] B. He, L. Liu, C. Yu, Y. Wang, P. Han, Roux-en-Y gastric bypass reduces lipid overaccumulation in liver by upregulating hepatic autophagy in obese diabetic rats, *Obes. Surg.* 25 (2014) 109–118, <https://doi.org/10.1007/s11695-014-1342-7>.
- [27] H.C. Hsu, C.H. Liu, Y.C. Tsai, S.J. Li, C.Y. Chen, C.H. Chu, M.F. Chen, Time-dependent cellular response in the liver and heart in a dietary-induced obese mouse model: the potential role of ER stress and autophagy, *Eur. J. Nutr.* 55 (2015) 2031–2043, <https://doi.org/10.1007/s00394-015-1017-8>.
- [28] C. Jiang, S. Zhang, D. Li, L. Chen, Y. Zhao, G. Mei, J. Liu, Y. Tang, C. Gao, P. Yao, Impaired ferritinophagy flux induced by high fat diet mediates hepatic insulin resistance via endoplasmic reticulum stress, *Food Chem. Toxicol.* 140 (2014), 111329, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111329>.
- [29] Y. Jiang, D. Chen, Q. Gong, Q. Xu, D. Pan, F. Lu, Q. Tang, Elucidation of SIRT1/PGC-1 α -associated mitochondrial dysfunction and autophagy in nonalcoholic fatty liver disease, *Lipids Health Dis.* 20 (2021) 40, <https://doi.org/10.1186/s12944-021-01461-5>.
- [30] H.M. Kim, Y. Kim, E.S. Lee, J.H. Huh, C.H. Chung, Caffeic acid ameliorates hepatic steatosis and decreased endoplasmic reticulum stress in high-fat diet-induced obese mice by regulating autophagy, *Nutrition* 55–56 (2018) 63–70, <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.03.010>.
- [31] B.M. Kim, D.H. Kim, Y.J. Park, S. Ha, Y.J. Choi, H.S. Yu, K.W. Chung, H.J. Chung, PAR2 promotes high-fat diet-induced hepatic steatosis by inhibiting AMPK-mediated autophagy, *J. Nutr. Biochem.* 95 (2021), 108769, <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108769>.
- [32] L.L. Lai, H.Q. Lu, W.N. Li, H.P. Huang, H.Y. Zhou, E.N. Leng, Y.Y. Zhang, Protective effects of quercetin and crocin in the kidneys and liver of obese Sprague-dawley rats with type 2 diabetes: effects of quercetin and crocin on T2DM rats, *Hum. Exp. Toxicol.* 096032712095452 (2020) 1–12, <https://doi.org/10.1177/0960327120954521>.
- [33] H. Li, Y. Duan, W. Zhang, B. You, Y. Liu, S. Fu, L. Qiu, J. Cheng, J.W. Ripley-Gonzalez, S. Liu, Exercise improves lipid droplet metabolism disorder through activation of AMPK-mediated lipophagy in NAFLD, *Life Sci.* 273 (2021), 119314, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119314>.
- [34] J. Li, X. Li, D. Liu, S. Zhang, N. Tan, H. Yokota, P. Zhang, Phosphorylation of eIF2 α signaling pathway attenuates obesity-induced non-alcoholic fatty liver disease in an ER stress and autophagy-dependent manner, *Cell Death Dis.* 11 (2020) 1069, <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03264-5>.
- [35] M. Liu, L. Xu, L. Yin, Y. Qi, Y. Xu, X. Han, Y. Zhao, H. Sun, J. Yao, Y. Lin, K. Liu, J. Peng, Potent effects of dioscin against obesity in mice, *Sci. Rep.* 2015 (5) (2015) 7973, <https://doi.org/10.1038/srep07973>.
- [36] J. Liu, Y. Li, X. Zhou, X. Zhang, H. Meng, S. Liu, L. Zhang, J. He, Q. He, Y. Geng, CaMKIV limits metabolic damage through induction of hepatic autophagy by CREB in obese mice, *J. Endocrinol.* 244 (2020) 353–367, <https://doi.org/10.1530/JOE-19-0251>.
- [37] Z. Meng, X. Liu, T. Li, T. Fang, Y. Cheng, L. Han, B. Sun, L. Chen, The SGLT2 inhibitor empagliflozin negatively regulates IL-17/IL-23 axis-mediated inflammatory responses in T2DM with NAFLD via the AMPK/mTOR/autophagy pathway, *Int. Immunopharmacol.* 94 (2021), 107492, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107492>.
- [38] W.O. Obydah, G.A. Shaker, S.M. Samir, S.F. El Bassiony, H.A. Abd El Moneim, Effect of vanillic acid and exercise training on fatty liver and insulin resistance in rats: possible role of fibroblast growth factor 21 and autophagy, *Physiol. Int.* (2021), <https://doi.org/10.1556/2066.2021.00188>.
- [39] Z. Papáková, E. Páleníková, H. Danková, J. Zdychova, V. Skop, L. Kazdová, L. M. Cahová, Kupffer cells ameliorate hepatic insulin resistance induced by high-fat diet rich in monounsaturated fatty acids: the evidence for the involvement of alternatively activated macrophages, *Nutr. Metab.* 9 (2012) 22, <https://doi.org/10.1186/1743-7075-9-22>.
- [40] A. Petrović, D. Bogojević, A. Korać, I. Golić, S. Jovanović-Stojanov, V. Martinović, S. Ivanović-Matić, J. Stevanović, G. Poznanović, I. Grigorov, Oxidative stress-dependent contribution of HMGB1 to the interplay between apoptosis and autophagy in diabetic rat liver, *J. Physiol. Biochem.* 73 (2017) 511–521, <https://doi.org/10.1007/s13105-017-0574-0>.
- [41] M. Piao, Y. Liu, T. Yu, Y. Lu, Zinc supplementation ameliorates ER stress and autophagy in liver in a rat model of type 2 diabetes mellitus, *Biomed. Res.* 27 (2016) 1075–1081.
- [42] N. Shao, X.Y. Yu, X.F. Ma, W.J. Lin, M. Hao, H.Y. Kuang, Exenatide delays the progression of nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 mice, which may involve inhibition of the NLRP3 inflammasome through the mitophagy pathway, *Gastroenterol. Res. Pract.* 2018 (2018) 1–9, <https://doi.org/10.1155/2018/1864307>.
- [43] L. Sharma, N.A. Lone, R.M. Knott, A. Hassan, T. Abdullah, Trigonelline prevents high cholesterol and high fat diet induced hepatic lipid accumulation and lipotoxicity in C57BL/6J mice, via restoration of hepatic autophagy, *Food Chem. Toxicol.* 121 (2018) 283–296, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.011>.
- [44] A. Sharma, S.K. Anand, N. Singh, A. Dwarkanath, U.N. Dwivedi, P. Kakkar, Berberine induced activation of the SIRT1/LKB1/AMPK signaling axis attenuates

- the development of hepatic steatosis in high-fat diet-induced NAFLD rats, *Food Funct.* 12 (2021) 892–909, <https://doi.org/10.1039/d0fo02501a>.
- [45] Y. Son, H. Lee, S.Y. Son, C.H. Lee, S.Y. Kim, Y. Lim, Ameliorative effect of *Annona muricata* (Graviola) extract on hyperglycemia induced hepatic damage in type 2 diabetic mice, *Antioxidants* (Basel) 10 (2021) 1546, <https://doi.org/10.3390/antiox10101546>.
- [46] Z. Su, K. Zeng, B. Feng, L. Tang, C. Sun, X. Wang, C. Li, G. Zheng, Y. Zhu, Kun-dan deconvolution ameliorates insulin resistance by activating AMPK/mTOR-mediated autophagy in high-fat diet-fed rats, *Front. Pharmacol.* 12 (2021), 670151, <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.670151>.
- [47] J. Sun, Y. Liu, J. Yu, J. Wu, W. Gao, L. Ran, R. Jiang, M. Guo, D. Han, B. Liu, N. Wang, Y. Li, H. Huang, L. Zeng, Y. Gao, X. Li, Y. Wu, APS could potentially activate hepatic insulin signaling in HPD-induced IR mice, *J. Mol. Endocrinol.* 63 (2019) 77–91, <https://doi.org/10.1530/JME-19-0035>.
- [48] Y. Tian, Y. Zhang, G. Halemahabai, B. Tohetarbaike, Y. Fan, Y.Z. Zhang, Urolithin A activates autophagy to improve liver insulin resistance in diabetic mice, *Zhong Cao Yao* 51 (2020) 710–717, <https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2020.03.022>.
- [49] B. Wang, J. Zeng, Q. Gu, Exercise restores bioavailability of hydrogen sulfide and promotes autophagy influx in livers of mice fed with high-fat diet, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 95 (2017) 667–674, <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0611>.
- [50] M.E. Wang, B.K. Singh, M.C. Hsu, C. Huang, P.M. Yen, L.S. Wu, M.E.D.S. Jong, C. H. Chiu, Increasing dietary medium-chain fatty acid mitigates high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis by regulating autophagy, *Sci. Rep.* 7 (2017) 13999, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14376-y>.
- [51] Y. Wang, Y. Sun, L. Zuo, Y. Wang, Y. Huang, ASIC1a promotes high glucose and PDGF-induced hepatic stellate cell activation by inducing autophagy through CAMKK/ERK signaling pathway, *Toxicology* 300 (2018) 1–9, <https://doi.org/10.1016/j.toxiclet.2018.10.003>.
- [52] H. Yan, Y. Gao, Y. Zhang, Inhibition of JNK suppresses autophagy and attenuates insulin resistance in a rat model of nonalcoholic fatty liver disease, *Mol. Med. Rep.* 15 (2016) 180–186, <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5966>.
- [53] H. Yan, Y.Q. Gao, Y. Zhang, H. Wang, G.S. Liu, J.Y. Lei, Chlorogenic acid alleviates autophagy and insulin resistance by suppressing JNK pathway in a rat model of nonalcoholic fatty liver disease, *J. Biosci.* 43 (2018) 287–294, <https://doi.org/10.1007/s12038-018-9746-5>.
- [54] G. Yang, H.E. Lee, J.Y. Lee, A pharmacological inhibitor of NLRP3 inflammasome prevents non-alcoholic fatty liver disease in a mouse model induced by high fat diet, *Sci. Rep.* 6 (2016) 24399, <https://doi.org/10.1038/srep24399>.
- [55] R.X. Yang, Q. Pan, X.L. Liu, D. Zhou, F.Z. Xin, Z.H. Zhao, R.N. Zhang, J. Zen, L. Qiao, C.X. Hu, G.W. Xu, F. Jian-Gao, Therapeutic effect and autophagy regulation of myricetin in nonalcoholic steatohepatitis, *Lipids Health Dis.* 18 (2019) 179, <https://doi.org/10.1186/s12944-019-1118-0>.
- [56] S. Youssry, M.A. Kamel, Effect of folate supplementation on immunological and autophagy markers in experimental nonalcoholic fatty liver disease, *Eur. Cytokine Netw.* 30 (2019) 135–143, <https://doi.org/10.1684/ecn.2019.0437>.
- [57] X. Yu, L. Zhang, H. Lu, H. Chen, L. Yu, X. Cao, D. Shen, Rapamycin protects against hepatic injury in streptozotocin-induced diabetic rats by enhancing autophagy, *Int. J. Clin. Exp. Med.* 12 (2019) 11363–11393.
- [58] T. Zeng, F. Liu, J. Zhou, S. Pan, W. Xia, L. Chen, Depletion of kupffer cells attenuates systemic insulin resistance, inflammation and improves liver autophagy in high-fat diet fed mice, *Endocr.* J. 62 (2015) 615–626, <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ15-0046>.
- [59] T. Zeng, J. Zhou, L. He, J. Zheng, L. Chen, C. Wu, W. Xia, Blocking nuclear factor-kappa B protects against diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance in mice, *Plos One* 11 (2016), e0149677, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149677>.
- [60] F. Zeng, J. Luo, H. Han, W. Xie, L. Wang, R. Han, H. Chen, Y. Cai, H. Huang, Z. Xia, Allopurinol ameliorates liver injury in type 1 diabetic rats through activating mrf2, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 35 (2021), <https://doi.org/10.1177/20587384211031417>.
- [61] D. Zhao, S. Zhang, X. Wang, D. Gao, J. Liu, K. Cao, L. Chen, R. Liu, J. Liu, J. Long, ATG7 regulates hepatic akt phosphorylation through the c-JUN/PTEN pathway in high fat diet-induced metabolic disorder, *FASEB J.* 33 (2019) 14296–14306, <https://doi.org/10.1096/fj.201901414RR>.
- [62] W. Zhou, S. Ye, Rapamycin improves insulin resistance and hepatic steatosis in type 2 diabetes rats through activation of autophagy, *Cell Biol. Int.* 42 (2018) 1282–1291, <https://doi.org/10.1002/cbin.11015>.
- [63] B. Zhu, W. Mei, T. Jiao, S. Yang, X. Xu, H. Yu, Y. Ding, S. Guo, B. Meng, L. Zhao, M. He, K. Dong, H. Guo, X. Guo, H. Zhang, R. Dang, G. Xiang, N. Wen, Neuregulin 4 alleviates hepatic steatosis via activating AMPK/mTOR-mediated autophagy in aged mice fed a high fat diet, *Eur. J. Pharmacol.* 884 (2020), 173350, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173350>.
- [64] Y.R. Im, H. Hunter, D. de Gracia Hahn, A. Duret, Q. Cheah, J. Dong, M. Fairey, C. Hjalmarsson, A. Li, H.K. Lim, L. McKeown, C.G. Mitrofan, R. Rao, M. Utukuri, I. A. Rowe, J.P. Mann, A systematic review of animal models of NAFLD finds high-fat, high-fructose diets most closely resemble human NAFLD, *Hepatology* 74 (2021) 1884–1901, <https://doi.org/10.1002/hep.31897>.
- [65] C. Koster, K.E. Wever, P.E. Wagstaff, K. Hirk, C. Hooijmans, A. Bergen, A systematic review on transplantation studies of the retinal pigment epithelium in animal model, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 2719, <https://doi.org/10.3390/ijms21082719>.
- [66] S.J. Jackson, N. Andrews, D. Ball, I. Bellantuono, J. Gray, L. Hachoumi, A. Holmes, J. Latham, A. Petrie, P. Potter, A. Rice, A. Ritchie, M. Stewart, C. Strepka, M. Yeoman, K. Chapman, Does age matter? The impact of rodent age on study outcomes, *Lab Anim.* 51 (2017) 160–169, <https://doi.org/10.1177/0023677216653984>.
- [67] R. Stienstra, Y. Haim, Y. Riahi, M. Netea, A. Rudich, G. Leibowitz, Autophagy in adipose tissue and the beta cell: implications for obesity and diabetes, *Diabetologia* 57 (2014) 1505–1516, <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3255-3>.
- [68] S.R. Yoshii, N. Mizushima, Monitoring and measuring autophagy, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 1865, <https://doi.org/10.3390/ijms18091865>.
- [69] M.T. Rosenfeldt, C. Nixon, E. Liu, L.Y. Mah, K.M. Ryan, Analysis of macroautophagy by immunohistochemistry, *Autophagy* 8 (2012) 963–969, <https://doi.org/10.4161/auto.20186>.
- [70] W. Martinet, L. Roth, G.R.Y. De Meyer, Standard immunohistochemical assays to assess autophagy in mammalian tissue, *Cells* 6 (2017) 17, <https://doi.org/10.3390/cells6030017>.
- [71] A. Avogaro, G.P. Fadini, S. Del Prato, Reinterpreting cardiorenal protection of renal sodium–glucose cotransporter 2 inhibitors via cellular life history programming, *Diabetes Care* 43 (2020) 501–507, <https://doi.org/10.2337/dci19-1410>.
- [72] L. Yang, P. Li, S. Fu, E.S. Calay, G.S. Hotamisligil, Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance, *Cell Metab.* 11 (2010) 467–478, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.04.005>.
- [73] A. Umemura, F. He, K. Taniguchi, H. Nakagawa, S. Yamachika, J. Font-Burgada, Z. Zhong, S. Subramaniam, S. Raghunandan, A. Duran, J.F. Linares, M. Reina-Campos, S. Umemura, M.A. Valasek, E. Seki, K. Yamaguchi, K. Koike, Y. Itoh, M. T. Diaz-Meco, J. Moscat, M. Karin, p62, upregulated during preneoplasia, induces hepatocellular carcinogenesis by maintaining survival of stressed HCC-initiating cells, *Cancer Cell* 29 (2016) 935–948, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.04.006>.
- [74] A. Rodriguez, A. Durán, M. Selloum, M.F. Champy, F.J. Díez-Guerra, J.M. Flores, Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62, *Cell Metab.* 3 (2006) 211–222, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.01.011>.
- [75] Y. Luo, Y. Tian, C. Zhao, Taurine attenuates liver autophagy and injury of offspring in gestational diabetic mellitus rats, *Life Sci.* 257 (2020), 117889, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117889>.
- [76] D.R. Boverhof, L.D. Burgoon, C. Tashiro, B. Sharratt, B. Chittim, J.R. Harkema, D. L. Mendrick, T.R. Zacharewski, Comparative toxicologic analysis of the hepatotoxic effects of TCDD in Sprague dawley rats and C57BL/6 mice, *Toxicol. Sci.* 94 (2006) 398–416, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl100>.
- [77] R. Zoncu, A. Efeyan, D. Sabatini, mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing, *Nat Rev Mol Cell Biol* 12 (2011) 21–35, <https://doi.org/10.1038/nrm3025>.
- [78] F. Xu, C. Hua, H.M. Tautenhahn, O. Dirsch, U. Dahmen, The role of autophagy for the regeneration of the aging liver, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 3606, <https://doi.org/10.3390/ijms21103606>.
- [79] R.R. Kalyani, J.M. Egan, Diabetes and altered glucose metabolism with aging, *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* 42 (2013) 333–347, <https://doi.org/10.1016/j.eccl.2013.02.010>.
- [80] I. Orhón, C. Rocchi, B. Villarejo-Zori, P.S. Martinez, M. Baanstra, U. Brouwer, P. Boya, R. Coppes, F. Reggiori, Autophagy induction during stem cell activation plays a key role in salivary gland self-renewal, *Autophagy* 18 (2022) 293–308, <https://doi.org/10.1080/15488627.2021.1924036>.
- [81] Q. Liu, A. Zeng, Z. Liu, C. Wu, L. Song, Liver organoids: from fabrication to application in liver diseases, *Front. Physiol.* 13 (2022), 956244, <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.956244>.
- [82] D. Jahn, S. Kircher, H.M. Hermanns, A. Geier, Animal models of NAFLD from a hepatologist's point of view, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2019 (1865) 943–953, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.06.023>.
- [83] K.W. Ter Horst, P.W. Gilljamse, B.A. de Weijer, M. Kilicarslan, M.T. Ackermans, A. J. Nederveen, M. Nieuwdorp, J.A. Romijn, M.J. Serlie, Sexual dimorphism in hepatic, adipose tissue, and peripheral tissue insulin sensitivity in obese humans, *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 6 (2015) 182, <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00182>.
- [84] J. Logue, J.J. Walker, H.M. Colhoun, Do men develop type 2 diabetes at lower body mass indices than women? *Diabetologia* 54 (2011) 3003–3006, <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2313-3>.
- [85] N. Percie du Sert, A. Ahluwalia, S. Alam, M.T. Avey, M. Baker, W.J. Browne, A. Clark, I.C. Cuthill, U. Dirnagl, M. Emerson, P. Garner, S.T. Holgate, D. W. Howells, W. Hurst, N.A. Karp, S.E. Lazic, K. Lidster, C.J. MacCallum, M. Macleod, E.J. Pearl, O.H. Petersen, F. Rawle, P. Reynolds, K. Rooney, E.S. Sena, S.D. Silberberg, T. Steckler, H. Würbel, Reporting animal research: explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0, *PLoS Biol.* 18 (2020), e3000411, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000411>.

CAPÍTULO II

Este manuscrito será formatado posteriormente para submissão à revista *The Journal of Physiology* (Fator de Impacto = 6,2).

HIPERGLICEMIA MATERNA E DIETA HIPERLIPÍDICA PREJUDICAM A REGULAÇÃO METABÓLICA E A RESPOSTA AUTOFÁGICA NO FÍGADO DA PROLE ADULTA DE RATAS

Short Title: Modulação autofágica hepática na prole diabética

Larissa Lopes da Cruz^{1,2}, Yuri Karen Sinzato¹, Verônyca Gonçalves Paula¹,
Matheus Naia Fioretto³, Ana Carolina Lima Camargo³, Franciane Quintanilha
Gallego¹, Vinícius Soares Barco¹, José Eduardo Corrente⁴, Luís Antonio Justulin³,
Gustavo Tadeu Volpato², Débora Cristina Damasceno^{1*}

¹Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia, Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

²Laboratório de Fisiologia de Sistema e Toxicologia Reprodutiva, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Barra do Garças, Mato Grosso, Brasil.

³Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

⁴Escritório de Apoio à Pesquisa, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

***Autor correspondente:** Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno, Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia – Unidade de Pesquisa Experimental - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, São Paulo, Brasil, CEP: 18618-970. Telefone: (+55) 14 3880-1631; e-mail: debora.damasceno@unesp.br

RESUMO

A autofagia é um processo de degradação dos constituintes intracelulares nos lisossomos, contribuindo para a regulação hepática. Entretanto, as alterações existentes na autofagia durante a programação fetal da prole de mães diabéticas e expostas a um insulto dietético ainda não foram investigadas. O objetivo foi avaliar como o diabetes materno, associado ou não à uma dieta hiperlipídica (DHL) no período pós-natal, compromete parâmetros metabólicos e a autofagia hepática de descendentes adultas. Ratas *Sprague Dawley*, filhas de mães não-diabéticas (controle = FC) ou diabéticas (FD), foram alimentadas com dieta padrão (DP) ou DHL desde o desmame até a idade adulta (n=5 ratas/grupo): FC/DP, FC/DHL, FD/DP e FD/DHL. No dia 115 de vida, foi realizado o teste oral de tolerância à glicose. No dia 120 de vida, foram determinadas as concentrações séricas de colesterol total, triglicerídeos e transaminases hepáticas. A razão de Ritis e o índice TyG foram calculados para avaliação de resistência à insulina. Amostras de fígado foram utilizadas para dosagem de marcadores inflamatórios, estresse oxidativo e para análise de expressão de proteínas, por *Western blotting*, relacionadas à autofagia e apoptose. Análises histomorfométricas e a avaliação do acúmulo de lipofusina também foram realizadas para marcação indireta de senescência celular. Os grupos FC/DHL, FD/DP e FD/DHL apresentaram intolerância à glicose e aumento no número de hepatócitos na idade adulta. Além disso, ratas FD/DP e FD/DHL apresentaram hiperlipidemia e resistência à insulina. Adaptações nas vias redox hepáticas foram observadas no grupo FD/DP com aumento da atividade de marcadores de defesa antioxidante, incluindo catalase e glutathione peroxidase. O grupo FD/DP também exibiu aumento da expressão proteica de marcadores da autofagia, tais como p-AMPK, LC3-II/LC3-I e p62/SQSTM1, acúmulo de lipofusina e ativação de caspase-3. Após exposição à DHL, a prole adulta de ratas diabéticas teve fosforilação reduzida de AMPK e da razão LC3-II/LC3-I, além da presença de esteatose, estresse oxidativo e inflamação. Portanto, a redução de autofagia, estimulada por DHL, e mediada por AMPK, pode ser de vital importância para o aumento da suscetibilidade à doença hepática gordurosa associada à disfunção metabólica induzida por diabetes materno. Assim, a modulação autofágica nos redireciona para novos tratamentos das complicações hepáticas.

Palavras-chave: AMPK, Diabetes, DOHaD, Fígado, Lipofagia, MAFLD.

1. INTRODUÇÃO

Entender a programação do desenvolvimento de doenças crônicas está se tornando cada vez mais relevante devido à exposição crescente da prole à subnutrição ou supernutrição, obesidade e diabetes materno (Spradley *et al.*, 2018). *Diabetes mellitus* (DM) é caracterizado por hiperglicemia. É um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos e afeta cerca de 537 milhões de pessoas e pode chegar a 783 milhões até 2045 (American Diabetes Association - ADA, 2023). A síndrome diabética, entre mulheres em idade fértil, pode surgir antes da gravidez, sendo definida como diabetes materno pré-existente (DM tipo 1 e tipo 2), ou ocorrer apenas na gestação, denominada de DM Gestacional (ADA, 2023). A hiperglicemia na gravidez é responsável por efeitos adversos em mães e crianças no período perinatal (Hod *et al.*, 2015). Além disso, o diabetes materno pode afetar o desenvolvimento da prole a longo prazo, causando diabetes e outras doenças metabólicas na idade adulta (Tozour *et al.*, 2020). O conceito *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD) propõem que um ambiente subótimo durante um período crítico de desenvolvimento, seja no período pré-concepção, período fetal, infância e/ou primeira infância do indivíduo, pode induzir mudanças permanentes na estrutura e função de órgãos específicos e ter efeitos profundos sobre a saúde ou doença ao longo da vida (Keshavjee *et al.*, 2022).

Um dos principais órgãos suscetíveis aos efeitos do estresse oxidativo, induzido por hiperglicemia, é o fígado (Bugianesi *et al.*, 2005). O estado hiperglicêmico favorece a formação de produtos de glicação avançada, acúmulo citoplasmático de proteínas oxidadas e disfunção mitocondrial no fígado, o que contribui para a resistência à insulina, inflamação e morte celular (Yzydorczyk *et al.*, 2017; González *et al.*, 2023). Essas alterações provocam lesão hepática, incluindo a doença hepática gordurosa associada à disfunção metabólica (do inglês *Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease* - MAFLD), sendo a causa mais comum de doenças hepáticas e responsável pelo aumento da mortalidade global (Eslam *et al.*, 2020). O mecanismo envolvido na lesão hepática, causada pelo DM,

não está claro e sugere-se uma conexão entre lesão hepática induzida pelo diabetes e autofagia anormal (Yu *et al.*, 2019; Joo *et al.*, 2020).

Autofagia é um processo celular importante, mediado por lisossomos, e que envolve a degradação de organelas senescentes, proteínas danificadas e lipídios, fornecendo nutrientes necessários para atender às necessidades energéticas da célula e garantindo o controle de qualidade das organelas (Madrigal-Matute e Cuervo, 2016; Ardem, 2018). Este processo é dividido em três tipos principais: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (Mizushima e Komatsu, 2011). A macroautofagia é responsável por mais de 90% da autofagia celular (Yao *et al.*, 2020). Sendo assim, este artigo se concentrará nos mecanismos envolvidos na macroautofagia, a qual passará a ser citada a partir daqui como autofagia.

O processo autofágico inclui três estágios principais: formação do autofagossomo, fusão do autofagossomo com lisossomos com a formação do autofagolisossomo (ou autolisossomo) e degradação do substrato englobado pelas enzimas lisossomais (Ardem, 2018). A autofagia é inibida pelo *mechanistic target of rapamycin* (mTOR), enquanto que a *AMP-activated protein kinase* (AMPK) estimula a autofagia, a qual regula a ativação da proteína *Interaction myosin/moesin like coiled-coil protein 1* (Beclin-1) para o início da formação do fagóforo, uma projeção da membrana do retículo endoplasmático (Tain e Hsu, 2017). A proteína *Microtubule associated protein light chain 3* (LC3) é um marcador-chave da fase de alongamento e está envolvida na formação da vesícula de dupla membrana denominada autofagossomo, pela ligação à fosfatidiletanolamina (PE) junto com a degradação das proteínas da família das *Autophagy-related gene* (ATGs). Posteriormente, a proteína *Sequestosome 1* (SQSTM1), conhecida como p62, se associa às proteínas ubiquitinadas nas membranas autofagossômicas, reconhecendo o conteúdo citoplasmático a ser degradado (Cho *et al.*, 2017). A etapa de fusão do autofagossomo com lisossomo é dependente da glicoproteína LAMP-2 (Cho *et al.*, 2017; Arden, 2018). Em tecidos periféricos, como o fígado, a autofagia desempenha um importante papel na glicogenólise, gliconeogênese, β -oxidação de ácidos graxos

e degradação de gotículas lipídicas (Madrigal-Matute e Cuervo, 2016; Cho *et al.*, 2017). Qian *et al.* (2018) demonstraram que a supressão de reguladores autofágicos e a diminuição da atividade lisossomal em hepatócitos compromete a capacidade do fígado de se adaptar ao estresse metabólico e prejudica a ação da insulina. Isto confirma que processo autofágico tem importantes implicações na síndrome metabólica.

A fim de avaliar a disfunção da autofagia, associada a doenças metabólicas, estudos utilizam dietas hiperlipídicas (DHL) em modelos animais. Recentemente, publicamos uma revisão sistemática e meta-análise, sugerindo que murinos (camundongos e ratos) diabéticos, cuja indução foi feita pela administração de DHL, apresentaram comprometimento da autofagia celular (Da Cruz *et al.*, 2022). Além disso, houve diminuição na resposta autofágica conforme aumentava a glicemia, percentual de gordura, exposição a longo prazo a DHL ou idade avançada do animal (Da Cruz *et al.*, 2022). Entretanto, a maioria dos estudos foram desenvolvidos em machos, deixando uma questão em aberto sobre a possível alteração do processo autofágico em animais do sexo feminino.

Ademais, a presença da hiperglicemia materna também é outra importante questão a ser explorada quanto à interferência ou não na modulação da autofagia no tecido hepático na prole adulta. Estudos em humanos são limitados em função de variáveis incontrolláveis, como fatores socioeconômicos, nutricionais e genéticos (López-Soldado e Herrera, 2003), além de levarem décadas para obter a compreensão da base mecanicista na primeira geração (F₁) (Morrison *et al.*, 2018). As restrições éticas também devem ser consideradas em função da necessidade de biópsias consecutivas no fígado para realização de análises mais abrangentes (Kwanten *et al.*, 2014). A utilização de modelos animais é uma ferramenta valiosa para compreender os mecanismos envolvidos na programação metabólica e fetal e para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas (Wojcikowski e Gobe, 2014; Williamns *et al.*, 2014; Morrison *et al.*, 2018). As repercussões existentes nos órgãos de roedores são muito semelhantes às dos seres humanos (Wojcikowski e Gobe, 2014; Williamns *et al.*, 2014).

Assim, tendo em vista a alta incidência de diabetes, sedentarismo, consumo excessivo de alimentos hipercalóricos e a falta de estudos sobre a associação do diabetes materno e a exposição à DHL após o desmame, há necessidade de verificar as alterações glicêmicas, lipídicas, estresse oxidativo e inflamação, bem como as repercussões no processo de autofagia no fígado da prole adulta de ratas diabéticas, para compreender os mecanismos fisiopatológicos envolvidos. A hipótese deste estudo é que o ambiente diabetogênico durante a gestação e o consumo de dieta hiperlipídica durante o período pós-natal comprometerão parâmetros metabólicos e os biomarcadores do processo de autofagia do tecido hepático da prole adulta de ratas. Portanto, o objetivo foi avaliar os efeitos metabólicos e a modulação da autofagia hepática em descendentes adultas de ratas diabéticas, submetidas ou não à DHL, no período pós-natal.

2. MATERIAIS E MÉTODO

2.1 Animais

Todos os procedimentos experimentais aplicados neste estudo estão em conformidade com o Guia do Instituto Nacional de Saúde para cuidados e uso de animais de laboratório (*National Research Council*, 2011), as diretrizes ARRIVE (do inglês *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) (Percie du Sert *et al.*, 2020) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) de nossa Instituição, sob protocolos 1218/2017 e 1341/2019 (Anexos 1 e 2, respectivamente).

Foram utilizados ratos da linhagem *Sprague Dawley*, machos e fêmeas, com aproximadamente 120 dias de idade [250 e 220 gramas (g) de peso corpóreo, respectivamente]. Os animais foram comprados do Centro de Animais da UNICAMP (CEMIB) e mantidos em nosso biotério livres de patógenos e sob condições controladas, com temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($50\pm 10\%$) e ciclo claro/escuro (12/12h). Os animais foram alocados aleatoriamente em gaiolas de polipropileno forradas com maravalha, com capacidade para três animais por

gaiolas. Foi realizado enriquecimento ambiental com a introdução de bolas de papéis amassados em cada caixa (Simpson e Kelly, 2011) para redução do estresse. Água filtrada e ração foram oferecidas *ad libitum*.

2.2 Delineamento do Estudo

Trata-se de um estudo experimental, transversal e analítico. A sequência experimental está resumida na Figura 1.

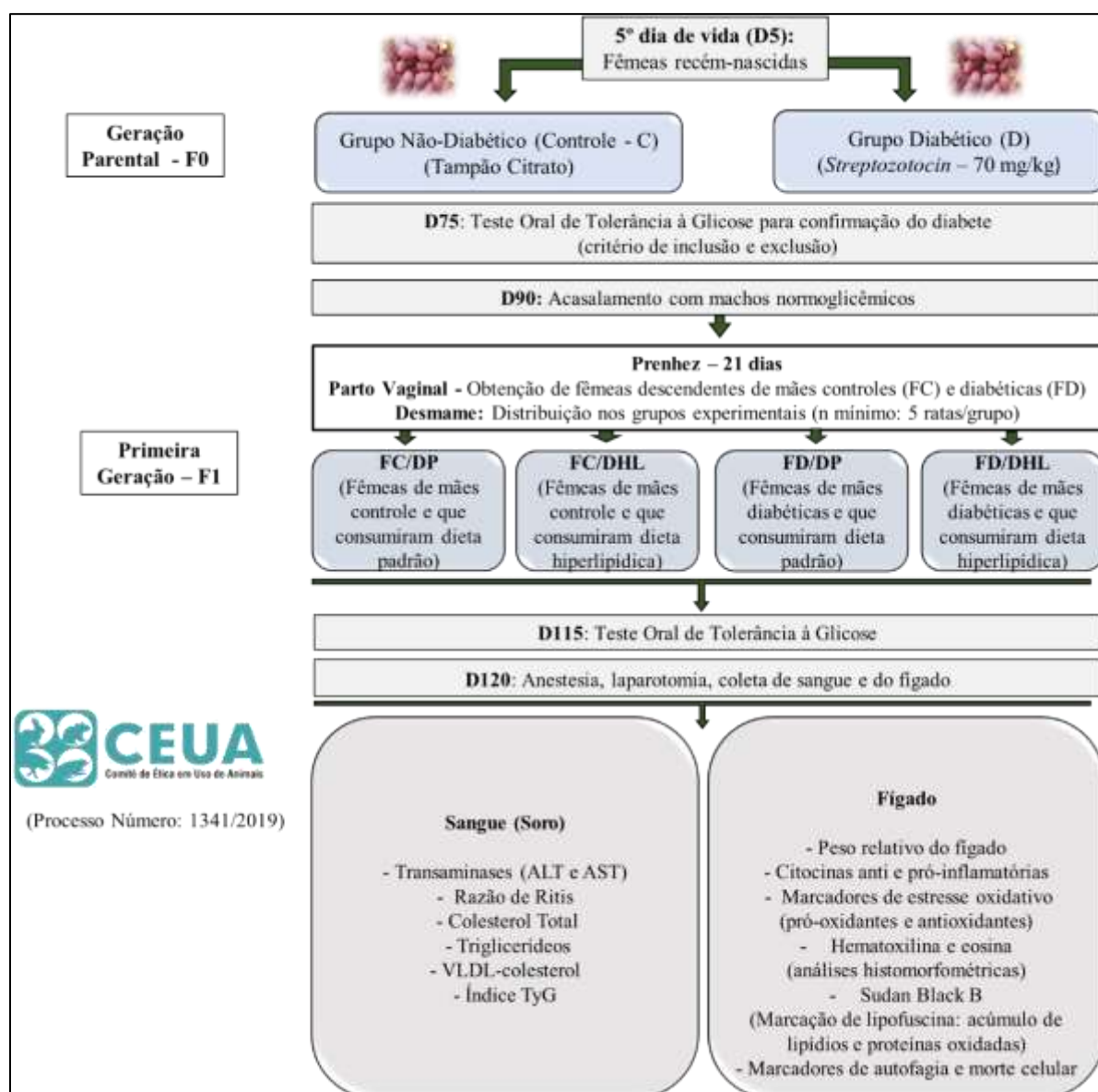


Figura 1. Desenho experimental.

2.3 Sequência Experimental da Geração Parental (F₀)

As ratas receberam a droga beta (β)-citotóxica, *Streptozotocin* (STZ, Sigma-Aldrich Chemical Company®, EUA), na dose de 70 mg/kg, via subcutânea para indução do diabetes no 5º dia de vida pós-natal (Sinzato *et al.*, 2021). Outro grupo de filhotes fêmeas compuseram o grupo não-diabético (Controle) e receberam o volume equivalente de veículo (tampão citrato - 0,01 M, pH 4,5) no mesmo dia que o grupo que recebeu STZ. Aos 75 dias de vida (vida adulta), estas ratas foram submetidas ao Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) para avaliar os valores glicêmicos para caracterização dos critérios de inclusão. Para isso, após seis horas de jejum, foi coletada uma gota de sangue da cauda das ratas para determinação glicêmica (tempo 0). Logo após, as ratas receberam solução de glicose (0,2 g/mL) via intragástrica (*gavage*) na dose de 2,0 g/kg de peso corpóreo. Decorridos 30, 60 e 120 minutos (min) após a administração da solução de glicose, as glicemias foram determinadas em glicosímetro convencional, sendo que valores ≥ 200 mg/dL em pelo menos um ponto do TOTG confirmou o diabetes (Sinzato *et al.*, 2021, ADA, 2023). Para o grupo controle, foram incluídas apenas ratas com glicemia < 140 mg/dL em pelo menos três momentos durante o TOTG. Ratas que não apresentaram as características acima, foram anestesiadas, eutanasiadas e excluídas deste estudo.

A partir dos 90 dias de vida, as fêmeas inclusas nos grupos Diabetes e Controle foram acasaladas com machos normoglicêmicos (3 fêmeas para 1 macho) ao final da tarde, com duração máxima de 15 dias, para obtenção de mães com e sem diabetes (Geração parental), com o objetivo criar um ambiente intrauterino inadequado a partir da indução do diabetes. Na manhã seguinte, quando os espermatozoides foram encontrados no esfregaço vaginal, a prenhez foi confirmada e este foi designado como dia 0 de prenhez. As ratas que não acasalaram após 15 dias consecutivos foram consideradas inférteis e excluídas deste estudo (Sinzato *et al.*, 2021). Durante a prenhez, as ratas foram mantidas em caixas individuais e as proles, obtidas através de parto vaginal, foram usadas como foco desta pesquisa.

Após o nascimento, em função do número de tetos funcionais e para garantir

acesso igualitário ao leite materno, foram mantidos não mais que oito filhotes por ninhada até o desmame (DPN 22), mantendo o mais próximo possível de uma proporção sexual de 1:1, ou seja, 4 machos e 4 fêmeas (Zambrano *et al.*, 2005). Quando a ninhada apresentasse até oito filhotes, se ambos os sexos estivessem presentes, não houve manipulação. Quando as ninhadas excederam 8 filhotes, foram selecionados machos e fêmeas de forma aleatória. Se a ninhada fosse inferior a oito filhotes por mãe, essa mãe e sua ninhada foram excluídas deste experimento, mas mantidas em nosso biotério e usadas em outros estudos.

2.4 Sequência Experimental das Descendentes de Mães Diabéticas e Controle (Primeira geração – F_1)

A partir do desmame, duas descendentes fêmeas de cada rata-mãe controle (FC) e diabética (FD) foram distribuídas em quatro grupos experimentais (n mínimo = 5 animais/grupo), seguindo um sorteio aleatório. Desde o desmame até o 120º dia de vida, período equivalente aos períodos de infância, adolescência e idade adulta humana (Lomas-Soria *et al.*, 2018), estas filhas receberam diferentes dietas (padrão ou dieta hiperlipídica) (Paula *et al.*, 2022), sendo assim distribuídas:

- ✓ FC/DP: filhas de mães controle e alimentadas com dieta padrão (DP);
- ✓ FC/DHL: filhas de mães controle e alimentadas com dieta hiperlipídica (DHL);
- ✓ FD/DP: filhas de mães diabéticas e alimentadas com dieta padrão;
- ✓ FD/DHL: filhas de mães diabéticas e alimentadas com dieta hiperlipídica.

Para calcular o tamanho da amostra (n), foi utilizado um delineamento randomizado com base nos estudos de Zhou e Ye (2018) e de Lai *et al.* (2021), considerando um poder de 80% e confiabilidade de 95%, sendo um “n” mínimo de 5 animais/grupo.

As ratas FC e FD receberam uma dieta padrão (com teor de 28,5% kcal de proteína, 62,6% kcal de carboidratos, 8,7% kcal de gordura – ração comercial de rato, Purina®, Brasil) ou hiperlipídica (DHL) (com teor de 23,4% kcal de proteína,

46,6% kcal de carboidratos, 30% kcal de gordura) (Paula *et al.*, 2022). A DHL foi preparada artesanalmente na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/UNESP), usando os seguintes ingredientes: farelo de soja, sorgo, casca de soja, amido de milho, açúcar refinado, banha de porco, minerais (ferro, biotina, vitamina B12, vitamina D, vitamina B6, vitamina E, vitamina A, selênio e potássio) e sal. Estes ingredientes foram moídos, misturados e oferecidos na forma de *pellets*. Após o preparo, a ração foi mantida sob refrigeração até o momento do consumo. A comparação bromatológica entre as dietas é apresentada no Apêndice 1. Como as dietas apresentaram características visuais que permitiam facilmente a sua distinção, não foi possível o alojamento aleatório dos animais e o cegamento dos cuidadores e/ou investigadores.

2.5 Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)

Aos 115 dias de vida, após 6 horas (h) de jejum, foi realizado o TOTG para avaliação da tolerância à glicose, conforme descrito anteriormente (Tai, 1994; Gallego *et al.*, 2019). A avaliação da glicemia em função do tempo foi estimada calculando a área sob a curva (ASC), usando o método trapezoidal (Tai, 1994).

2.6 Morte das Ratas-filhas e Coleta das Amostras de Fígado na Vida Adulta

Aos 120 dias de vida, as ratas foram anestesiadas com tiopental sódico (Thiopentax® - dose de 120 mg/kg, via intraperitoneal) e, após perda dos reflexos, foram decapitadas para coleta de sangue e submetidas à laparotomia para a coleta do fígado. O peso relativo do fígado foi calculado usando a equação: (peso do órgão/peso corpóreo de cada animal) x 100, sendo o resultado expresso em gramas/100 gramas de peso vivo (g/100g p.v.). Posteriormente, o maior lobo (esquerdo) de cada animal foi fatiado para determinação de marcadores de estresse oxidativo, dosagem de citocinas, avaliação da expressão proteica, e armazenamento em formaldeído para análises histológicas.

2.6.1 Avaliação do Perfil Bioquímico

Amostras de sangue foram coletadas em tubos livres de anticoagulante e centrifugadas a $1.575 \times g$ durante 10 min a 4°C para obtenção de amostras de soro, sendo armazenadas a -80°C e, posteriormente, utilizadas para dosagem por kits dos seguintes parâmetros bioquímicos: aspartato aminotransferase (AST) (Wiener®, Argentina, código #1751302), alanina aminotransferase (ALT) (Wiener®, Argentina, código #1761302), triglicerídeos (Wiener®, Argentina, código #1780105) e colesterol total (Wiener®, Argentina, código #1220114), conforme as especificações do fabricante. Lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL - colesterol) foi determinada por cálculo matemático proposto por Knopfholz *et al.* (2014). Todas as análises foram realizadas com o investigador cego e mensuradas utilizando espectrometria de luz através do equipamento UV1800 (Shimadzu Europe®, Alemanha). Posteriormente, o índice TyG foi calculado usando a seguinte equação: $\text{TyG} = \text{Ln} [\text{triglicerídeos em jejum (mg/dL)} \times \text{glicemia de jejum (mg/dL)} / 2]$, utilizado como ferramenta para avaliação da resistência à insulina (Guerrero-Romero *et al.*, 2010). Para avaliação de dano hepático, a razão de Ritis foi calculada ($\text{Razão de Ritis} = \text{concentração de AST} / \text{concentração de ALT}$) (De Ritis *et al.*, 1957).

2.6.2 Análise de Marcadores de Estresse Oxidativo Hepático

Para a análise do estresse oxidativo, todos os biomarcadores foram estimados em homogenatos de fígado. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e grupos tióis reduzidos (-SH), bem como as atividades antioxidantes das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) foram determinadas. Fragmentos frescos de tecido hepático foram coletados no dia da eutanásia e congelados a -80°C . Estas amostras de fígado foram homogeneizadas usando o sistema *bullet blender* com a adição de grânulos de zircônio, solução salina tamponada com fosfato (PBS-0,1M Na_2HPO_4 , 0,1M KH_2PO_4 , 0,1M EDTA, pH 7,8) e coquetel de inibidor de protease (Sigma-Aldrich Chemical Company®, EUA) para ensaios de GPx, CAT, -SH e H_2O_2 . Para TBARS, tampão RIPA Lysis Buffer 1x (Millipore®, EUA) foi usado.

Para SOD, foi utilizada uma solução com 20 mM de HEPES, 1 mM de EGTA, 210 mM de manitol, e sacarose 70 mM (pH 7,2) (Sinzato *et al.*, 2022). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a $1.600 \times g$ por 10 min a 4°C para GPx, CAT, -SH, e H₂O₂; a $240 \times g$ por 10 min a 4°C para TBARS e a $1.500 \times g$ por 5 min a 4°C para SOD, conforme descrito por Sinzato *et al.* (2022). As concentrações de proteínas totais foram determinadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Todo o ensaio dos marcadores de estresse oxidativo foram realizadas em nosso laboratório utilizando a técnica de Sinzato *et al.* (2023). A determinação de TBARS foi avaliada como índice de peroxidação lipídica. Resumidamente, homogenatos de fígado, previamente preparados, foram adicionados a um tubo de ensaio contendo hidrato de ácido 5-sulfosalicílico (Sigma-Aldrich Chemical Company®, EUA) a 3%, agitados em vórtex por 10 segundos (s), centrifugados a $18.000 \times g$ por 3 min a 4°C e deixados em repouso por 15 min a 25°C. Subsequentemente, água ultra pura (branco) ou sobrenadante (obtido das amostras) foram diluídas em solução de ácido tiobarbitúrico (Sigma-Aldrich Chemical Company®, EUA) a 0,67%. A mistura foi aquecida por 30 min a 95°C e, então, resfriada por 10 min no gelo para parar a reação (Yagi, 1976). As absorbâncias de cada amostra foram medidas em 535 nm.

A atividade enzimática da SOD foi determinada a partir de sua capacidade de inibir a auto-oxidação do ácido pirogálico (pirogálico). A reação foi iniciada pela adição de pirogalol (Synth®, Brasil) (concentração final de 0,2 mmol/L). A absorbância foi medida imediatamente nos momentos 0 (T0) e 10 (T10) min a 25°C a 420 nm (Marklund e Marklund, 1974).

Para o ensaio de H₂O₂, uma solução contendo 1,71 M NaCl, 34 mM KCl, 14 mM K₂HPO₄, 0,1 M Na₂HPO₄, 90 mM CaCl₂, 0,11 M MgCl₂, 0,1% de vermelho de fenol e solução de peroxidase (0,1 M KH₂PO₄ + 0,1 M K₂HPO₄ + água ultra pura, pH 7,0) foi diluída em água ultra pura. Subsequentemente, adicionada ao poço “branco” ou das amostras (homogenatos de fígado). A microplaca foi incubada por 10 min a 37°C. Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de solução de NaOH 1M. A absorbância foi medida em um comprimento de onda de 620 nm

(Noble e Gibson, 1970).

A atividade de CAT foi medida pela adição de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,1 M em cada poço contendo as amostras. Em seguida, H_2O_2 1M foram adicionados a uma cubeta de quartzo (concentração final de H_2O_2 20 mM) (Aebi, 1984). As medidas cinéticas foram realizadas imediatamente por 2 min a 25°C em um espectrofotômetro UV1800 (Shimadzu Europe®, Alemanha) a 240 nm. A diminuição da absorção em 240 nm em 120 s foi determinada e a atividade de CAT foi calculada.

O teor de GPx foi realizado monitorando a oxidação do NADPH. A solução de mistura foi preparada contendo solução GSH, solução de GSH-Rd e NADPH. A atividade de GPx foi medida adicionando tampão Tris/HCl (EDTA 1 mol/l; pH 8,0; 5 mmol/l) (25°C) e amostras em cada poço. Em seguida, a solução de mistura foi adicionada e homogeneizada por pelo menos 1 min para equilibrar a temperatura. Para iniciar a reação de GPx, foi adicionada solução de hidroperóxido de t-butil (7 mM) e a absorbância foi medida em intervalos de 1 min durante 5 min a 25°C em uma microplaca a 340 nm (Lawrence e Burk, 1976).

Para a quantificação de SH, homogenatos hepáticos foram avaliados pelo método descrito por Hu (1994), com base no desenvolvimento de coloração amarela quando adicionado o ácido 2-nitrobenzóico (5,5'-Dithiobis, DTNB, Sigma-Aldrich Chemical Company®, EUA). Posteriormente, a microplaca foi agitada por 10 min a 750 rpm com leitura a 412 nm.

2.6.3 Análise de Citocinas no Tecido Hepático

Para a avaliação do perfil de citocinas no tecido hepático, 100 mg de tecido hepático de cada animal foi homogeneizado em tampão de extração RIPA *Lysis Buffer* 1x (Millipore®, EUA), com adição do inibidor de protease (Sigma-Aldrich Chemical Company®, EUA). Posteriormente, centrifugados a $1.600 \times g$ durante 10 min a 4°C para obtenção dos homogenatos de fígado. Foram utilizados kits para dosagem das citocinas, como o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) (R&D Systems®, EUA, código #DY510-05), Interleucina – 6 (IL-6) (R&D Systems®, EUA, código #DY506-05), Interleucina – 10 (IL-10) (R&D Systems®, EUA, código

#DY522-05), utilizando método de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA sanduíche) de acordo com as instruções do fabricante. As absorbâncias das amostras foram determinadas usando leitor de microplacas ELISA (Biotek®, EUA) com comprimento de onda de 450 nm. Densidades ópticas (D.O.) foram obtidas e a concentração de citocinas (pg/mL) de cada amostra foi calculada a partir da interpolação dos valores de D.O. em uma curva padrão ajustada por uma equação de quatro parâmetros logísticos.

2.6.4 Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e Análises Histomorfométricas

Amostras de tecido hepático foram fixadas em formaldeído (P.A.) a 10% por 24 h. Em seguida, foram acondicionadas em etanol 70%. Os fragmentos foram processados e incluídos em parafina para corte em micrótomo. Cortes histológicos de 5 µm foram corados com hematoxilina e eosina (HE) no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu (FMVZ_Unesp). Após coloração em HE, a análise morfológica foi realizada de forma cega por meio do sistema de imagem computadorizado (Software KS-300, versão 3.0, Zeiss®, Alemanha), que recebe uma imagem de câmera digital (CCD-IRIS/RGB, Sony®, Japão), acoplada ao microscópio (DMR, Leica®, Alemanha). O *software ImageJ* (National Institutes of Health, EUA) foi usado para contagem do número de hepatócitos e para análise morfométrica de gotículas lipídicas. Para as análises morfométricas, as fotomicrografias foram convertidas em escala cinza de 8 bits e invertidas em preto-branco para que as gotículas lipídicas aparecessem em preto. Posteriormente, estruturas inter-hepatócitos (que não indicam características de gotículas lipídicas) foram removidas, seguido da análise de partículas. Todas as partículas com a circularidade entre 0,5 e 1,0 e o diâmetro entre 0,1 e 50 µm foram contadas. O limite superior do tamanho de partícula foi fixado em 50 µm, para evitar a contagem automatizada de grandes estruturas que não fossem gotículas lipídicas (por exemplo, a veia central) (Piao *et al.*, 2018). O número total e o diâmetro médio de gotículas de gordura, além da fração de área (%) ocupada pelas gotículas

lipídicas, foram considerados (Piao *et al.*, 2018).

2.6.5 Detecção Histológica do Acúmulo de Lipofuscina por Sudan Black

Para avaliação de acúmulo de lipofuscina, resíduos não digeríveis nos lisossomos, os fragmentos do tecido hepático foram fixados em formaldeído (P.A.) a 10% por 24 h, desidratado em concentrações progressivas de álcool e incluído em parafina. Cortes histológicos de 5 µm foram feitos no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu (FMVZ_Unesp) com auxílio do micrótomo. Posteriormente, as lâminas do tecido hepático passaram por processo de desparafinação (15 min em xilol I, 15 min em xilol II, 5 min em álcool absoluto I, 5 min em álcool absoluto II, 5 min em álcool absoluto III, 5 min em álcool 95% e 5 min em álcool 85%). Após desparafinação, foram lavadas quatro vezes em água destilada e coradas em câmara úmida com 500 µL de Sudan Black 0,3 % (Êxodo Científica®, Brasil) por 30 min. Em seguida, foram lavadas em água destilada para retirar o excesso de corante, secadas por 30 min em temperatura ambiente e contra coradas com hematoxilina de Harris por 3 min. Após coloração, as lâminas foram montadas usando lamínula e resina, e a análise foi feita de forma cega em microscópio óptico. As imagens foram capturadas por meio do sistema de imagem computadorizado (*Software* KS-300, versão 3.0, Zeiss®, Alemanha), que recebe uma imagem de câmera digital (CCD-IRIS/RGB, Sony®, Japão), acoplada ao microscópio (DMR, Leica®, Alemanha). As análises foram realizadas segundo a metodologia de Yzydorczyk *et al.* (2017) e a área marcada para coloração de lipofuscina foi quantificada usando o *software ImageJ* (*National Institute of Health*, EUA). Os resultados foram apresentados como a razão entre a área de lipofuscina e a área total.

2.6.6 Análise de Marcadores da Autofagia e Apoptose no Fígado por Western Blotting

Amostras do lobo esquerdo foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C até o processamento. As amostras foram

homogeneizadas para extração usando *RIPA Lysis Buffer* 1x (Millipore®, EUA) com adição de inibidor de protease e fosfatase (Sigma-Aldrich Chemical Company®, EUA). Posteriormente, foram centrifugados a $1.575 \times g$ por 20 min a 4°C para remover o material insolúvel. A determinação da concentração proteica foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e, em seguida, as amostras foram normalizadas. Alíquotas contendo 70 µg de proteínas totais de cada amostra foram separadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). O peso molecular relativo das bandas foi determinado de acordo com o padrão de peso molecular marcado com cores usando *Kaleidoscope* (Bio-Rad®, EUA), que foi colocado junto na corrida eletroforética. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Millipore®, EUA). As ligações de proteínas não-específicas foram bloqueadas pela incubação da membrana por 1 h à temperatura ambiente com 5% de leite desnatado diluído em solução salina tamponada com tris e tween 20 (TBS-T, Sigma-Aldrich Chemical Company®, EUA). Posteriormente, as membranas foram incubadas por 16 h a 4°C com anticorpos primários diluído em TBS-T: anti-mTOR Ser/Thr (*CellSignaling*®, EUA, código #2983, 1:1000), anti-AMPK alpha (α) 1 (Abcam®, Reino Unido, código #ab32047, 1:800), anti-Phospho-AMPK α -1,2 (Thermofisher®, EUA, código #PA5-17831, 1:800), anti-Becclin-1 (BD Bioscience®, EUA, código #612112, 1:800), anti-ATG-5 (*Cell Signaling*®, EUA, código #12994, 1:1000), anti-ATG-7 (*Cell Signaling*®, EUA, código #8558, 1:800), anti-LC3 A/B (*Cell Signaling*®, EUA, código #12741, 1:800), anti-p62/SQSTM1 (*Elabscience*®, EUA, código #70387, 1:800), anti-LAMP-2 (*Cell Signaling*®, EUA, código #49067, 1:500), anti-BCL-2 (*CellSignaling*®, EUA, código #15071, 1:800), anti-FAS (Bd Bioscience®, EUA, código #610197, 1:800), anti-BAX (*Elabscience*®, EUA, código #13814, 1:800), anti-caspase-3 clivada (Abcam®, Reino Unido, código #ab2302, 1:500) e β -actina (*Cell Signaling*®, EUA, código #3700, 1:1000). Após lavagem em TBS-T, as membranas foram incubadas por 90 min com um anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rábano (HRP) *Anti-rabbit IgG* (*Cell Signaling*®, EUA, código #7074, 1:10.000) ou *Anti-mouse* (*Cell Signaling*®, EUA, código #7076, 1:10.000), específico para cada anticorpo primário. Uma solução *Stripping*

(Millipore[®], EUA) foi utilizada (temperatura ambiente, 15 min de incubação) para proteínas com peso molecular próximos ao da β -actina (FAS e ATG-5) para remover os anticorpos primários e secundários e examinar novamente as membranas testadas. Todas as proteínas marcadas foram detectadas utilizando o *kit* de reagentes de quimioluminescência aprimorada (ECL) (Bio-Rad[®], EUA) e as imagens das bandas foram capturadas usando uma câmera CCD (sistema G: BOX, Syngene[®], Reino Unido). As densidades ópticas integradas (IOD) das bandas de proteína-alvo foram mensuradas usando o *software ImageJ* (National Institute of Health, EUA). Posteriormente, os níveis de expressão de proteínas foram normalizados pelos valores obtidos do controle interno (β -actina) e os resultados expressos em *fold change* como média $\pm$ desvio-padrão (DP).

2.7 Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do especialista em Bioestatística do Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp. Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Após o teste de normalidade usando Shapiro-Wilk, a comparação entre os grupos foi realizada utilizando ANOVA seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey. Caso os dados apresentassem uma distribuição assimétrica dos dados, os valores eram comparados usando a Distribuição Gama, seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Wald. Para todas as comparações, foi considerado um limite mínimo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Todas as análises foram feitas pelo programa SAS for Windows, v.9.4.

3. RESULTADOS

3.1 Características Gerais dos Grupos Experimentais

Ao realizarmos o TOTG aos 115 dias de vida, observamos que a glicemia de jejum foi elevada no grupo FD/DP em comparação ao grupo FC/DP. Os grupos FC/DHL, FD/DP e FD/DHL mostraram área sob a curva (ASC) aumentada, obtida a partir dos dados glicêmicos durante os 120 min do TOTG, em relação ao grupo FC/DP, sendo que a ASC mais exacerbada foi no grupo FD/DHL em comparação aos grupos advindos de mães não-diabéticas (controle). No dia 120 de vida pós-natal, a prole feminina de ratas não-diabéticas ou diabéticas não diferiram em seu peso corporal. As ratas FD/DP e FD/DHL apresentaram maiores concentrações séricas de colesterol total, triglicerídeos e VLDL-colesterol quando comparadas às das proles de ratas controle. Além disso, estas ratas apresentaram maiores índices TyG em relação às filhas de ratas controles (Tabela 1).

Tabela 1. Peso corporal e parâmetros bioquímicos de amostras de sangue da prole feminina de ratas-mães não-diabéticas (Controle - FC) ou Diabéticas (FD), alimentadas com dieta hiperlipídica (DHL) ou não (DP), do desmame até o dia 120 de vida pós-natal.

	<i>Grupos</i>			
	<i>FC/DP (n= 9)</i>	<i>FC/DHL (n=9)</i>	<i>FD/DP (n=9)</i>	<i>FD/DHL (n=9)</i>
Glicemia em Jejum (sangue total) (mg/dL)	108,0 ± 9,2	118,6 ± 11,7	141,2 ± 10,3*	120,6 ± 13,6
ASC (mg/dL*120 min)	13217,1 ± 618,0	16651,9 ± 1291,8*	18083,3 ± 1369,3*	19403,3 ± 1013,8*#
Colesterol Total Sérico (mg/dL)	58,1 ± 4,5	55,2 ± 4,0	94,8 ± 12,5*	78,0 ± 15,0*#
Triglicerídeos Sérico (mg/dL)	27,6 ± 13,9	32,2 ± 10,2	67,0 ± 6,6*	65,5 ± 11,0*#
VLDL-colesterol Sérico (mg/dL)	5,5 ± 2,8	6,4 ± 2,0	13,4 ± 1,3*	13,4 ± 2,2*#
TyG	7,2 ± 0,5	7,5 ± 0,3	8,5 ± 0,1*	8,2 ± 0,2*#
Peso Corporal (g)	254,3 ± 16,5	266,3 ± 11,9	258,8 ± 19,8	263,2 ± 8,5

Legenda: ASC, área sob a curva; VLDL, Lipoproteína de muito baixa densidade; TyG, produto de triglicerídeos e glicose em jejum.

Valores expressos como média ± desvio padrão.

**p<0,05 - comparado ao grupo FC/DP; #p<0,05 - comparado ao grupo FC/DHL (ANOVA seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey).*

3.2 Peso Relativo do Fígado e Concentrações de Enzimas Hepáticas

Aos 120 dias de vida, os níveis séricos de AST foram reduzidos nas filhas de ratas diabéticas (FD/DP e FD/DHL). Não houve alteração nas concentrações séricas de ALT. O índice de Ritis foi menor nos grupos FD/DP e FD/DHL em comparação ao das ratas FC. O peso relativo do fígado não diferiu entre os grupos experimentais (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação da função hepática no dia 120 de vida da prole feminina de ratas-mães não-diabéticas (Controle - FC) ou Diabéticas (FD), alimentadas com dieta hiperlipídica (DHL) ou não (DP), do desmame até o dia 120 de vida pós-natal.

	<i>Grupos</i>			
	<i>FC/DP (n= 9)</i>	<i>FC/DHL (n=9)</i>	<i>FD/DP (n=9)</i>	<i>FD/DHL (n=9)</i>
Peso Relativo Fígado (g/100g)	3,2 ± 0,4	3,0 ± 0,2	3,1 ± 0,1	3,0 ± 0,3
AST (U/L)	24,8 ± 3,9	23,2 ± 5,4	19,2 ± 2,4*	16,9 ± 2,8*#
ALT (U/L)	12,6 ± 1,8	11,9 ± 2,0	11,9 ± 0,9	12,0 ± 1,5
Índice de Ritis (AST/ALT)	2,0 ± 0,4	2,0 ± 0,6	1,6 ± 0,3*	1,4 ± 0,3*#

Legenda: AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase.

Valores expressos como média ± desvio padrão.

**p<0,05 - comparado ao grupo FC/DP; #p<0,05 - comparado ao grupo FC/DHL (ANOVA seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey).*

4.3 Análise Histomorfométrica Hepática

As análises histomorfométricas de lâminas contendo cortes de tecido hepático, que foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), mostraram que o número de hepatócitos por área capturada foi maior nos grupos FC/DHL, FD/DP e FD/DHL em relação ao grupo FC/DP e no grupo FD/DHL em comparação ao grupo FC/DHL. Os animais FD/DHL apresentaram aumento no número de gotículas de gordura e maior porcentagem de área com gotículas quando comparados aos demais grupos. Com relação ao diâmetro médio das gotículas lipídicas, não houve diferença entre os grupos experimentais (Figura 2).

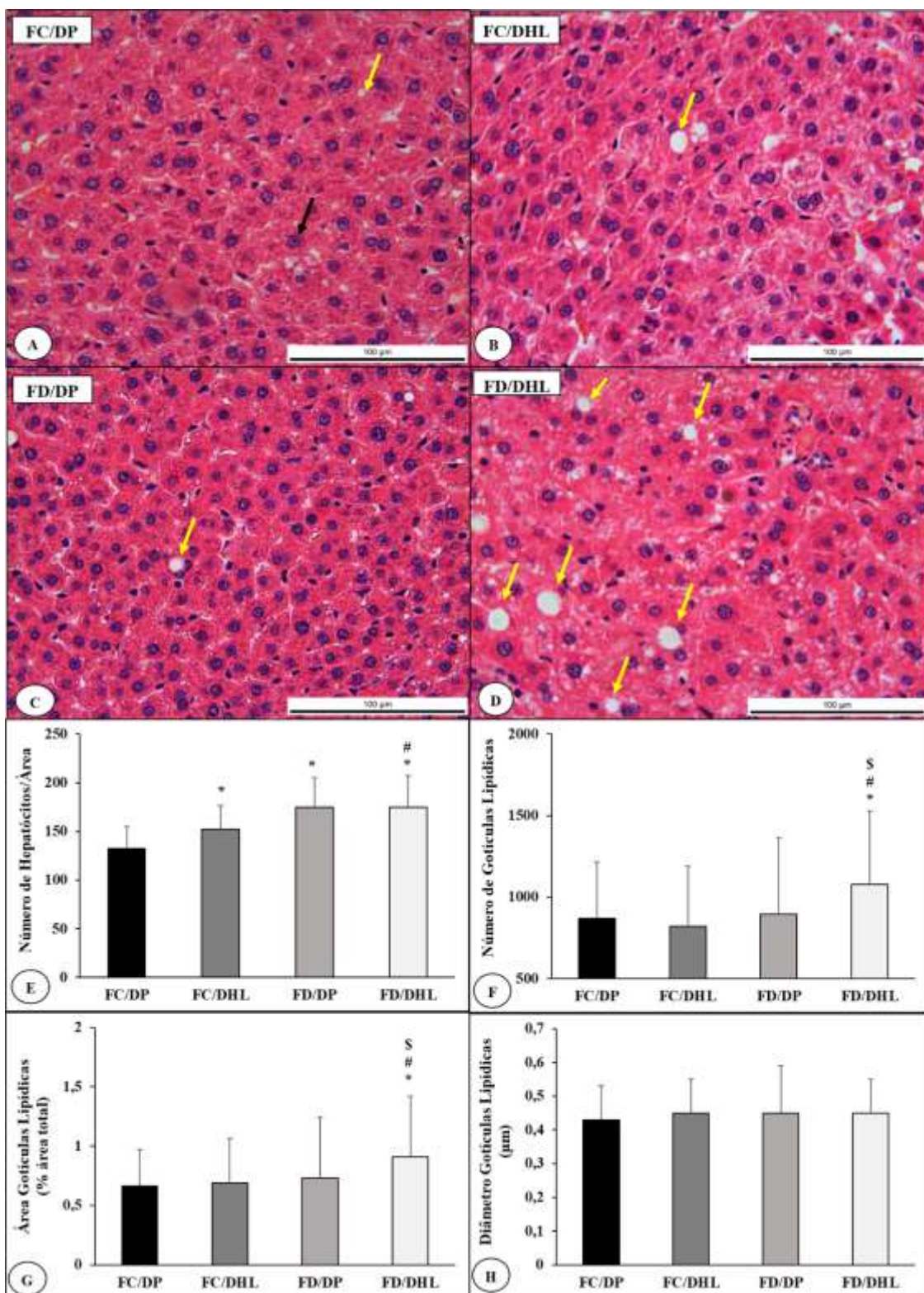


Figura 2. Fotomicrografias de tecido hepático corado com hematoxilina e eosina (HE) no dia 120 de vida da prole feminina de ratas-mães não-diabéticas (Controle-FC) ou Diabéticas (FD), alimentadas com dieta hiperlipídica (DHL) ou não (DP), do desmame até o dia 120 de vida pós-natal. A seta preta representa o hepatócito e a seta amarela representa pontos de gotículas lipídicas visualizadas como partículas circulares ou ligeiramente elípticas. (A) Grupo FC/DP; (B) Grupo FC/DHL; (C) Grupo FD/DP; (D) Grupo FD/DHL; (E) Contagem de hepatócitos por área capturada; (F) Contagem do número de gotículas lipídicas; (G) Porcentagem da área com gotículas lipídicas em relação à área total; (H) Diâmetro médio das gotículas lipídicas.

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5 ratas/50 fotos/grupo).

**p<0,05 - comparado ao grupo FC/DP; #p<0,05 - comparado ao grupo FC/DHL; §p<0,05 - comparado ao grupo FD/DP (ANOVA seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey).*

3.4 Peroxidação Lipídica e Capacidade Antioxidante Hepática

A Figura 3 mostra os marcadores de estresse oxidativo em homogenatos de tecido hepático. As ratas FD/DHL apresentaram maiores concentrações de TBARS em comparação aos demais grupos e tiveram aumentada atividade da enzima SOD em relação ao grupo FD/DP. Além disso, as ratas FD/DP e FD/DHL apresentaram menores concentrações de H_2O_2 e altas atividades de CAT comparadas aos grupos controles. A atividade de GPx foi elevada no grupo FD/DP em comparação com o grupo FC/DP e diminuída no grupo FD/DHL em relação ao grupo FD/DP. Não houve diferença nas concentrações de -SH entre os grupos experimentais.

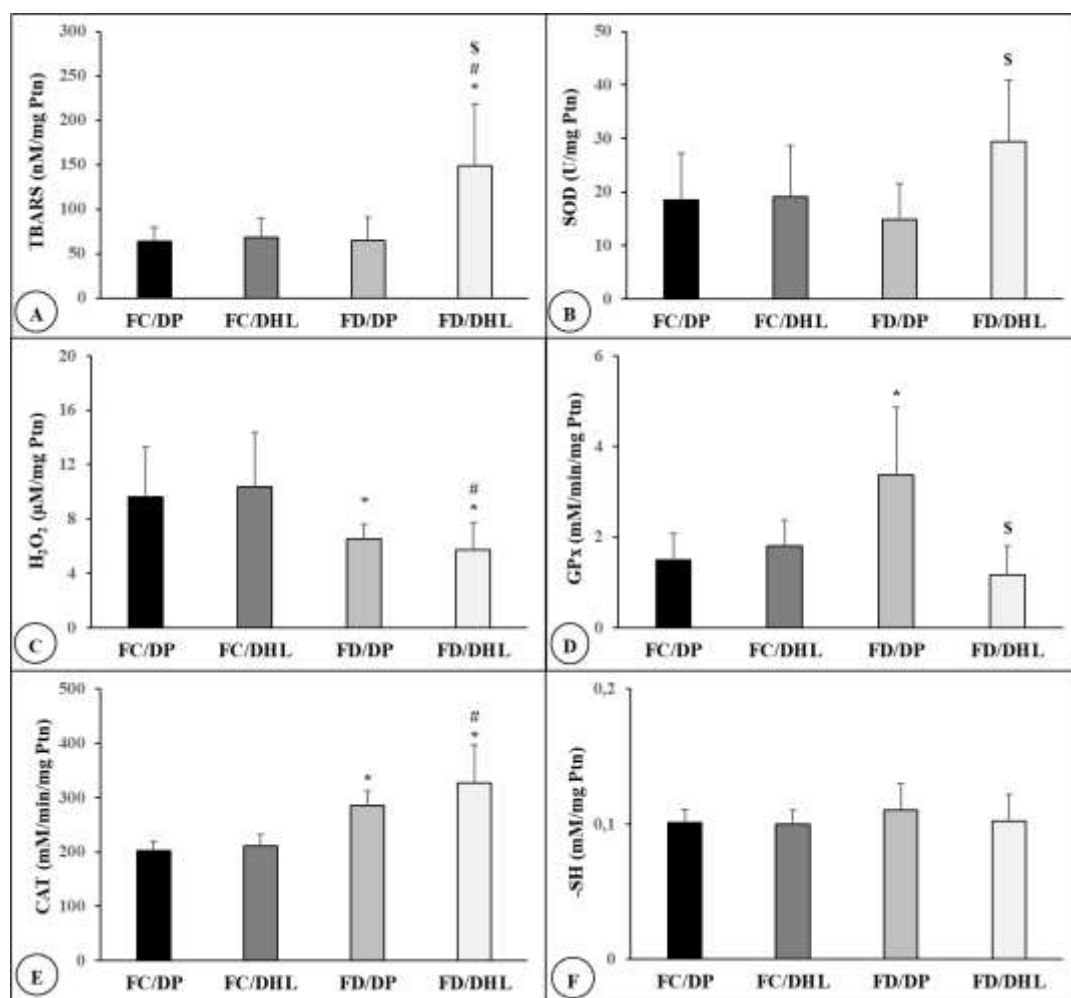


Figura 3. Marcadores de estresse oxidativo no fígado [A - concentração de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS); B - atividade da Superóxido Dismutase (SOD); C - concentração de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2);

D - atividade de Glutathione Peroxidase (GPx); E - atividade da Catalase (CAT) e F - concentração de grupos Tióis Reduzidos (-SH)], no dia 120 de vida da prole feminina de ratas-mães não-diabéticas (Controle - FC) ou Diabéticas (FD), alimentadas com dieta hiperlipídica (DHL) ou não (DP), do desmame até o dia 120 de vida pós-natal.

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 9$ animais/grupo).

* $p < 0,05$ - comparado ao grupo FC/DP; # $p < 0,05$ - comparado ao grupo FC/DHL; \$ $p < 0,05$ - comparado ao grupo FD/DP (Distribuição Gama seguida do teste de comparações múltiplas de Wald).

3.5 Biomarcadores da Inflamação Hepática

A Figura 4 apresenta as concentrações de citocinas no tecido hepático. A DHL causou aumento da concentração da citocina pró-inflamatória TNF- α no fígado independentemente da origem materna. As concentrações de IL-6 nas ratas do grupo FD/DHL foram significativamente maiores do que em ratas dos grupos FD/DP. As ratas FD/DHL também apresentaram aumento de IL-10 hepático quando comparado ao seu grupo controle FC/DHL.

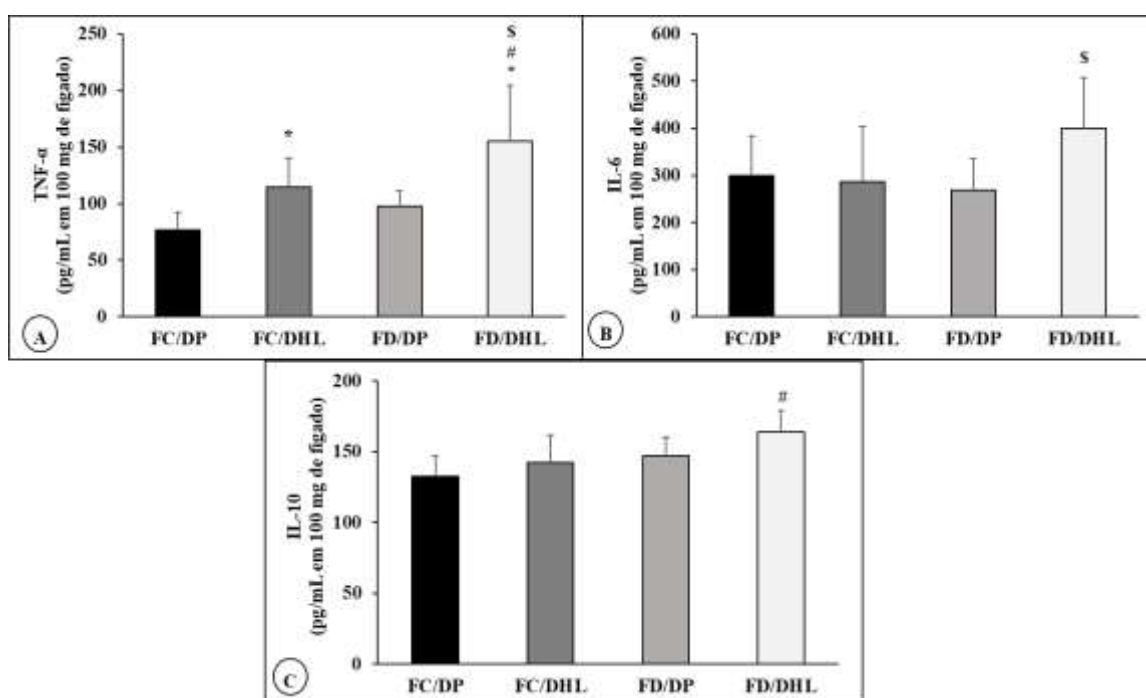


Figura 4. Concentrações de citocinas no fígado [A - Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α); B - Interleucina-6 (IL-6); e C - Interleucina-10 (IL-10)] no dia 120 de vida da prole feminina de ratas-mães não-diabéticas (Controle - FC) ou Diabéticas (FD), alimentadas com dieta hiperlipídica (DHL) ou não (DP), do desmame até o dia 120 de vida pós-natal.

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 9$ animais/grupo).

* $p < 0,05$ - comparado ao grupo FC/DP; # $p < 0,05$ - comparado ao grupo FC/DHL; $^{\S}p < 0,05$ - comparado ao grupo FD/DP (ANOVA seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey).

3.6 Avaliação da Autofagia Hepática da Prole em Idade Adulta

Para estudar a regulação da autofagia no fígado, a expressão de proteínas envolvidas em vários estágios do processo autofágico foi analisada (Figura 5). A expressão das proteínas mTOR e ATG-7 foram maiores e houve diminuição da expressão proteica de p-AMPK α , razão LC3-II/LC3-I e LAMP-2 nas ratas FC/DHL em comparação às ratas FC/DP. Observamos aumento dos níveis de p-AMPK α , elevação da razão LC3-II/LC3-I, acúmulo da proteína p62/SQSTM1 e menor expressão proteica de LAMP-2 nos tecidos hepáticos de ratas FD/DP em relação ao grupo FC/DP. Quanto à expressão proteica das ratas FD/DHL, foi verificado aumento da razão LC3-II/LC3-I e de LAMP-2 com relação às ratas FC/DHL. Houve redução da expressão proteica de p-AMPK α , razão LC3-II/LC3-I e de p62/SQSTM1 e aumento de LAMP-2 nas ratas FD/DHL comparadas às das ratas FD/DP. Entretanto, LAMP-2 foi reduzida no grupo FD/DHL com relação ao grupo FC/DP. Não houve diferença significativa na expressão das proteínas Beclin-1 e ATG-5 em nenhum dos grupos experimentais.

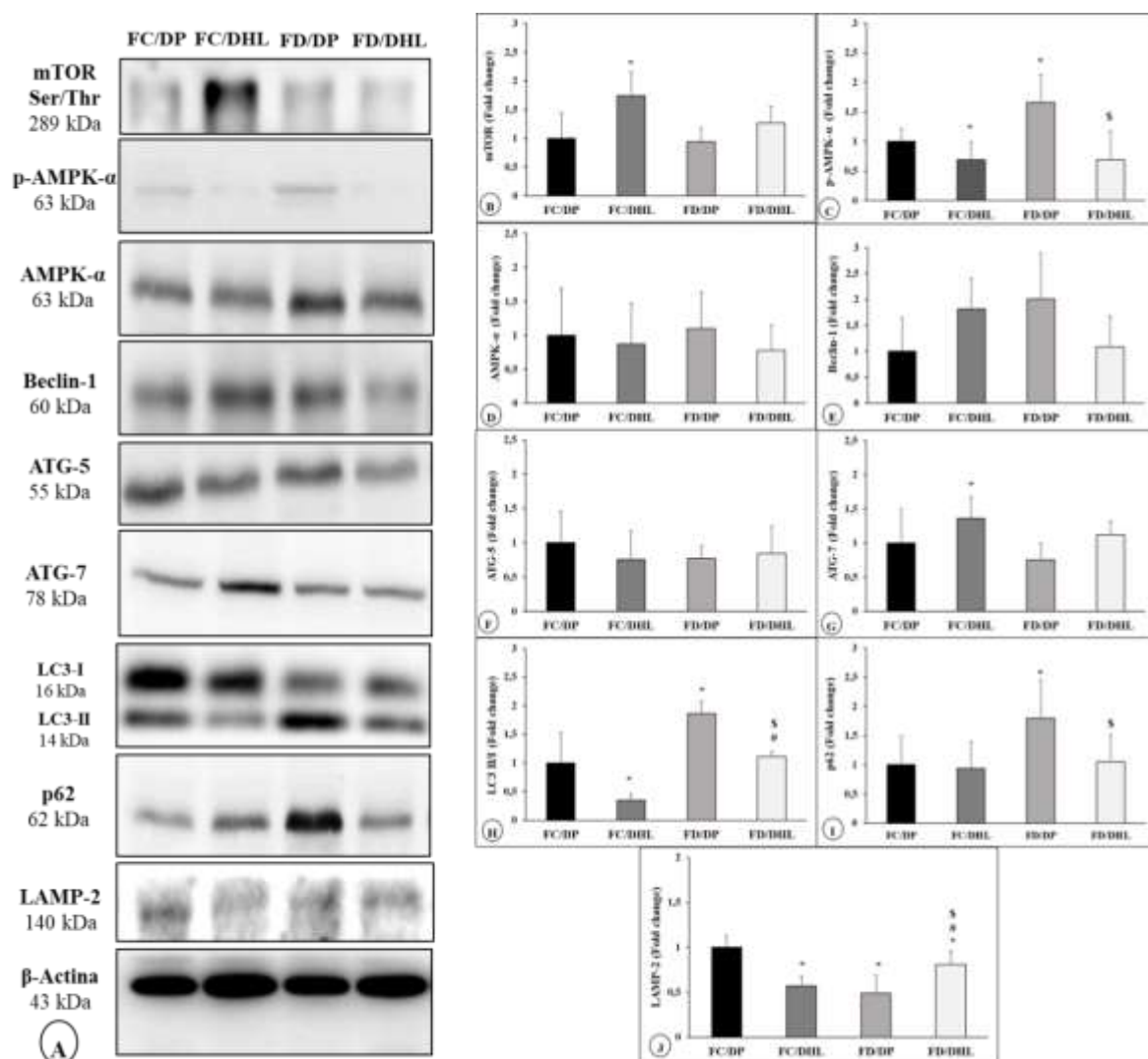


Figura 5. Expressão proteica hepática de reguladores de autofagia no dia 120 de vida da prole feminina de ratas-mães não-diabéticas (Controle - FC) ou Diabéticas (FD), alimentadas com dieta hiperlipídica (DHL) ou não (DP), do desmame até o dia 120 de vida pós-natal. (A) *Western blotting* com análise densitométrica de proteínas envolvidas no controle da autofagia; *Fold change* de (B) mTOR; (C) p-AMPK α ; (D) AMPK α ; (E) Beclin-1; (F) ATG-5; (G) ATG-7; (H) LC3-II/LC3-I; (I) p62/SQSTM1; (J) LAMP-2.

Os valores indicam a quantificação densitométrica normalizada pela β -actina e expressos como média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes ($n = 6$ animais/grupo).

* $p < 0,05$ - comparado ao grupo FC/DP; # $p < 0,05$ - comparado ao grupo FC/DHL; \$ $p < 0,05$ - comparado ao grupo FD/DP (Distribuição Gama seguida do teste de comparações múltiplas de Wald).

3.7 Avaliação da Presença de Lipofuscina nas Células Hepáticas

A lipofuscina são pigmentos com acúmulo lipídios e proteínas oxidadas intracelulares. A presença deste pigmento foi analisada no fígado aos 120 dias de vida com a marcação por *Sudan black*. Foi verificada que a porcentagem de área marcada para lipofuscina foi maior nas células hepáticas nos grupos FC/DHL, FD/DP e FD/DHL em comparação às do grupo FC/DP. As ratas FD/DHL apresentaram menor área marcada com relação ao grupo FD/DP (Figura 6).

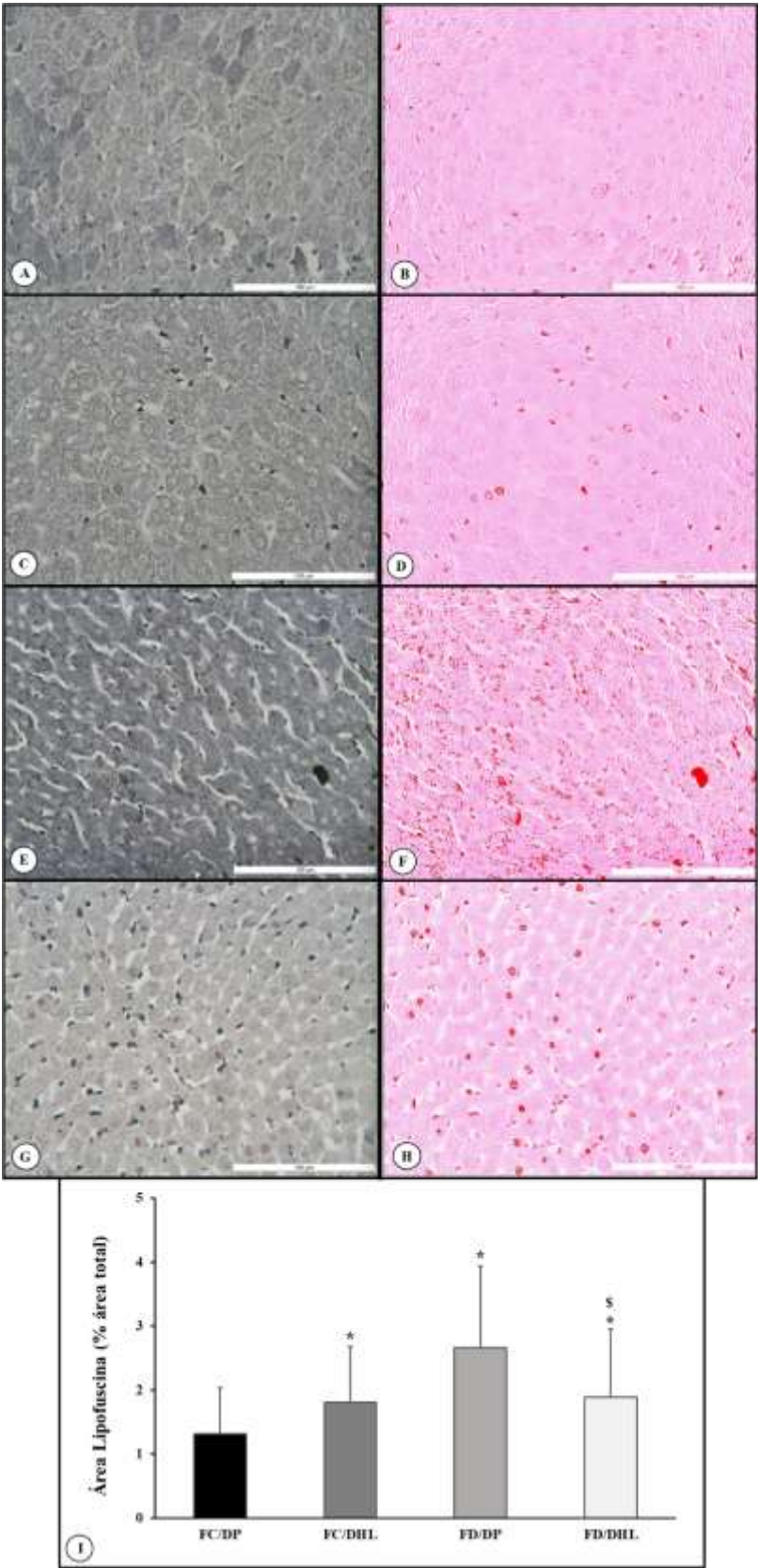


Figura 6. Fotomicrografia do tecido hepático corado com Sudan Black para marcação de lipofuscina (A, C, E, G) e deconvolução de cores usando o *software ImageJ* (B, D, F, H) no dia 120 de vida da prole feminina de ratas-mães não-diabéticas (Controle - FC) ou Diabéticas (FD), alimentadas com dieta hiperlipídica (DHL) ou não (DP), do desmame até o dia 120 de vida pós-natal. A imagem de “pilha” foi gerada a partir de grupos FC/DP (A e B), FC/DHL (C e D), FD/DP (E e F) e FD/DHL (G e H) para quantificar a área corada usando o *software ImageJ*. Os resultados são apresentados como porcentagem da área marcada para coloração de lipofuscina em relação à área total (I). Aumento: 40 x.

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5 ratas/50 fotos/grupo).

* $p < 0,05$ - comparado ao grupo FC/DP; $^{\$}p < 0,05$ - comparado ao grupo FD/DP (ANOVA seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey).

3.8 Avaliação Marcadores de Apoptose nas Células Hepáticas

Como mostrado na Figura 7, a análise da expressão de proteínas relacionadas à apoptose em homogenatos de fígado revelou que as ratas FC/DHL apresentaram diminuição da expressão proteica de BCL-2 e aumento da razão BAX/BCL-2 em comparação ao grupo FC/DP. As ratas FD/DP tiveram expressão reduzida de BCL-2 e maior expressão de caspase-3 clivada em relação ao grupo FC/DP. Contudo, quando as filhas de mães diabéticas foram suplementadas com DHL (FD/DHL), houve também redução da expressão de BCL-2 comparada ao grupo FC/DP e FD/DP, aumento da razão entre BAX e BCL-2 em relação às ratas FC/DP e reduzida expressão de caspase-3 clivada em comparação ao grupo FD/DP. Não houve alterações na expressão de FAS e BAX entre os grupos experimentais.

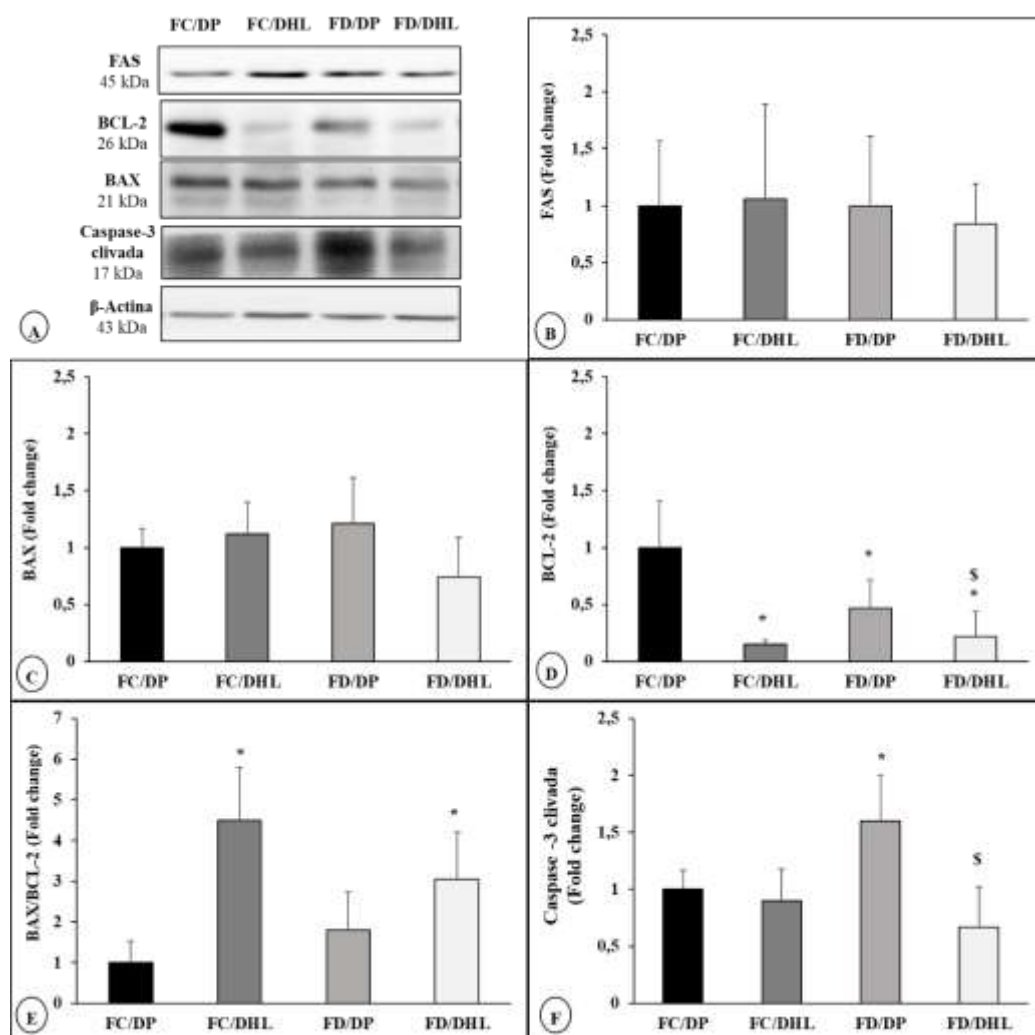


Figura 7. Expressão de proteínas envolvidos no processo de apoptose nas células hepáticas da prole feminina de ratas-mães não-diabéticas (Controle - FC) ou Diabéticas (FD), alimentadas com dieta hiperlipídica (DHL) ou não (DP), do desmame até o dia 120 de vida pós-natal. (A) *Western blotting* com análise densitométrica de proteínas envolvidas na morte celular por apoptose; *Fold change* de (B) FAS; (C) BAX; (D) BCL-2; (E) BAX/BCL-2; (F) Caspase-3 clivada.

Os valores indicam a quantificação densitométrica normalizada pela β -actina e expressos como média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes ($n = 6$ animais/grupo).

* $p < 0,05$ - comparado ao grupo FC/DP; \$ $p < 0,05$ - comparado ao grupo FD/DP (Distribuição Gama seguida do teste de comparações múltiplas de Wald).

5. DISCUSSÃO

Trata-se de um estudo inédito, visto que não há relatos sobre a associação do diabetes materno com uma dieta hiperlipídica (DHL) desde o desmame até a vida adulta (120 dias de vida) de filhas de ratas diabéticas ou não-diabéticas (controle), a fim de avaliar as modificações metabólicas e a modulação da autofagia hepática. Neste estudo, a introdução de uma DHL do desmame à idade adulta resultou em alteração da homeostase da glicose na prole feminina de mães controles, reforçando a importância de uma alimentação saudável. Além disso, houve comprometimento da autofagia, um importante processo de degradação de organelas senescentes, proteínas mal enoveladas e lipídios, e que desempenha um papel na patogênese da MAFLD. Além disso, observamos que a alteração do mecanismo autofágico está associada à sinalização AMPK e pode ser consequência da programação fetal causada pelo diabetes materno e/ou de uma alimentação inadequada. A teoria do "modelo de múltiplos *hits*" é aceita para explicar o progresso de doenças hepáticas (Bechmann *et al.*, 2012; Eslam *et al.*, 2020). Neste estudo, evidenciamos que a exposição a um ambiente materno hiperglicêmico durante os estágios cruciais de desenvolvimento (período concepção, embriofetal e amamentação) representou o primeiro *hit* e um novo desafio quando associado à ingestão da DHL, do desmame à idade adulta, representou o segundo *hit* com maiores danos para o fígado, como o aumento da deposição de lipídios hepáticos, presença de estresse oxidativo e elevação de citocinas inflamatórias.

Ao analisarmos o teste oral de tolerância à glicose (TOTG), evidenciamos que tanto o diabetes materno quanto o consumo pós-natal de DHL foram responsáveis pela presença de diabetes nos grupos FC/DHL, FD/DP e FD/DHL na idade adulta, sendo a alteração no metabolismo glicêmico confirmada pelo aumento de glicose circulante durante o TOTG. Anormalidades no organismo materno, como diabetes materno ou subnutrição, podem induzir adaptações no desenvolvimento fetal, criando um ciclo vicioso de disfunção metabólica transmitida de uma geração para outra, conforme apontado pelo conceito DOHaD (Barco *et al.*, 2022a; Barco *et*

al., 2022b; Paula *et al.*, 2022; da Cruz *et al.*, 2023). O efeito é significativo mesmo quando a hiperglicemia materna excede em apenas 20% em relação ao valor glicêmico do controle (Aerts e Van Assche, 2006). Além disso, a programação fetal induzida pela hiperglicemia materna resultou em resistência à insulina, confirmada pelo índice TyG, que relaciona resistência à insulina com a distribuição e depósitos de gordura (Vasques *et al.*, 2011).

Neste estudo, as descendentes de mães diabéticas apresentaram hiperlipidemia, confirmados por concentrações séricas aumentadas de colesterol total, triglicerídeos e VLDL-colesterol, corroborando outro estudo desenvolvido no nosso laboratório (Paula *et al.*, 2022). Quando os tecidos resistentes à insulina não conseguem acelerar a captação de glicose, a glicose extra pode retornar ao fígado, onde aumenta a lipogênese de novo, gliconeogênese e glicogenólise hepática. Dessa forma, a glicose fornece o esqueleto de glicerol para a síntese de triglicerídeos via triose-fosfato ou aumenta as concentrações de Acetil-CoA a partir da glicólise e, consequentemente, entrada no ciclo do ácido cítrico, em que o citrato formado a partir da união do Acetil-CoA com o oxalacetato, poderá ser desviado da rota metabólica para a síntese de ácidos graxos (Arab *et al.*, 2018; Fink, 2018). Além disso, a resistência à insulina no tecido adiposo pode aumentar o influxo de ácidos graxos para o fígado (Fink, 2018). Dessa forma, o excesso de ácidos graxos livres poderá ser oxidado nas mitocôndrias, esterificados em triglicerídeos para armazenamento ou incorporados nas partículas de VLDL-colesterol secretadas na corrente sanguínea (Lian *et al.*, 2020). Considerando que a lipofagia (um tipo de macroautofagia) tem uma importante função na degradação de gotículas lipídicas intracelulares (Singh *et al.*, 2009), propomos que as alterações lipídicas também estejam associadas à desregulação da autofagia hepática. Entretanto, não observamos mudanças no peso corporal e nem no peso relativo do fígado, mostrando que somente o peso corporal não reflete alterações no metabólicas que surgirão posteriormente (Lomas-Soria *et al.*, 2018). Além disso, o fígado é o único órgão sólido que usa mecanismos regenerativos para garantir que a relação fígado/peso corporal seja equivalente para tentar manter a homeostase corporal

(Michalopoulos e Bhushan, 2021).

Em nossa pesquisa, observamos redução da atividade enzimática da AST e da razão de Ritis nas filhas de ratas diabéticas. A diminuição da razão de Ritis (AST/ALT) em humanos (Niu e Zhou, 2021) e ratos (Müllebner *et al.*, 2022) está associada à resistência à insulina (Niu e Zhou, 2021) e esteato-hepatite (Sorbi *et al.*, 1999). Um padrão semelhante ao nosso estudo, com elevações das concentrações séricas de triglicerídeos, colesterol, glicose e diminuição dos níveis de AST, foram observados em humanos com esteatose hepática moderada ou grave (Grasselli *et al.*, 2014). Além disso, as análises histomorfométricas hepáticas evidenciaram presença de acúmulo lipídico e aumento no número de hepatócitos (na tentativa de restaurar a função hepática). Entretanto, observamos microesteatose em filhas de ratas diabéticas com 120 dias de idade, equivalente a 30 anos da idade humana (Quinn, 2005). Então, sugerimos uma possível transição para macroesteatose com o aumento da idade do animal e/ou período mais prolongado da administração da DHL.

Espécies reativas de oxigênio (EROS) podem ser formadas durante a oxidação de ácidos graxos, transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, e reações que ocorrem no sistema citocromo P-450 (Devarajan *et al.*, 2019). Em resposta a EROS, enzimas hepáticas desempenham a defesa antioxidante (Bak *et al.*, 2018), dentre elas SOD, CAT e GPx, que diferem no tipo de reação catalisada (Cederberg *et al.*, 2000). Neste estudo, houve aumento significativo nas atividades de GPx e CAT nas fêmeas adultas de ratas diabéticas (FD/DP), sugerindo um mecanismo de defesa para driblar o estado de estresse oxidativo após a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação enzimática de SOD, reduzindo os níveis de H_2O_2 . Em contrapartida, nossos resultados mostraram que os níveis hepáticos de TBARS foram aumentados nas filhas adultas de mães diabéticas que receberam DHL no período pós-natal, indicando que o fígado dessas filhas foi vulnerável à peroxidação lipídica quando desafiado pelo insulto adicional da dieta rica em gordura. Desta forma, destacamos que, apesar da ativação dos agentes antioxidantes, caracterizados pelas atividades aumentadas de

SOD e CAT e pelo consumo de GPx, os níveis do marcador de peroxidação lipídica (TBARS) ainda permaneceram elevados, indicando um quadro de estresse oxidativo. O acúmulo de EROS e lipídios peroxidados cria um ambiente adverso, que promove inflamação no tecido hepático (Michalopoulos e Bhushan, 2021). Nosso estudo demonstrou que a suplementação com DHL promoveu um desequilíbrio de marcadores pró-inflamatórios/anti-inflamatórios a favor do aumento na resposta pró-inflamatória. Possivelmente, o excesso calórico induzido pela DHL desencadeou a ativação da via NF- κ B (de hepatócitos ou células de Kupffer ou ambos), resultando na expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6, que também estão relacionadas à resistência à insulina (Zeng *et al.*, 2015) e proliferação de hepatócitos (Xu *et al.*, 2020). Também observamos elevação de IL-10 nos grupos FD/DHL. A IL-10 tem ação anti-inflamatória, mas também tem sido associada à cicatrização de tecidos danificados por inflamação (Ouyang *et al.*, 2011).

Dessa forma, a exposição a uma dieta rica em gordura ocasionou intolerância à glicose, inflamação hepática e aumento no número de hepatócitos, enquanto que a exposição ao diabetes materno promoveu intolerância à glicose, resistência à insulina, hiperlipidemia, aumento no número hepatócitos e elevação na atividade de enzimas antioxidantes hepáticas em fêmeas na idade adulta. Além disso, as ratas adultas expostas a ambos insultos (diabetes materno e dieta rica em gordura) apresentaram características fisiopatológicas típicas do desenvolvimento de MALFD, como hiperglicemia, resistência à insulina, hiperlipidemia, esteatose hepática, estresse oxidativo e inflamação (Geisler e Renquist, 2017; Yu *et al.*, 2019). Como a lipofagia é um mecanismo de defesa para prevenção da MALFD (Bechmann *et al.*, 2012; Martinez-Lopez e Singh, 2015), investigamos as alterações nas proteínas relacionadas à autofagia. Sugerimos que a autofagia hepática da prole feminina de ratas diabéticas foi estimulada na tentativa de proteger o órgão contra os danos causados pela hiperglicemia e evitar o acúmulo lipídico, sendo evidenciado nesta pesquisa pelo aumento da expressão proteica de p-AMPK. O estresse metabólico resulta no declínio das razões ATP:ADP, com subsequente

elevação nas concentrações de adenosina monofosfato (AMP) (Maiuri *et al.*, 2007), o que estimula a atividade AMPK para promover as vias catabólicas com ativação da autofagia e oxidação de ácidos graxos (Alers *et al.*, 2012). Durante o processo autofágico, a forma LC3-I é conjugada com fosfatidiletanolamina e convertida em LC3-II, permitindo o alongamento, fechamento e formação do autofagossomo (Ardem, 2018; Xu *et al.*, 2020). A diferença nos níveis de LC3 entre as duas condições (LC3 I e LC3 II) é um indicador do fluxo autofágico (Klionsky *et al.*, 2021), e outro método complementar para avaliação do fluxo é a quantificação de proteína p62/SQSTM1, que está envolvida no transporte de proteínas ubiquitinadas destinadas à digestão autofágica e é altamente degradado dentro do autolisossomo (Petrović *et al.*, 2017; Klionsky *et al.*, 2021). Dessa forma, é provável que os níveis aumentados da razão LC3-II/LC3-I e o acúmulo de p62/SQSTM1 observados na prole feminina de ratas diabéticas sejam atribuídos ao acúmulo de autofagossomos formados e bloqueio da degradação autofágica. Nossos resultados corroboram outro estudo que verificou aumento da razão de LC3-II/LC3-I e p62/SQSTM1 no pâncreas fetal e placentas de mulheres com DMG (Avagliano *et al.*, 2017).

Em contrapartida, nossos dados mostraram que a exposição à DHL reduziu a autofagia hepática. mTOR é uma via de detecção de excesso de nutrientes e regula negativamente a autofagia (He e Klionsky, 2009; Yu *et al.*, 2019). Nossos achados se somaram a isso, ao demonstrarmos que essa proteína foi ativada pela DHL. Também observamos que, independentemente da influência da hiperglicemia materna, a ATG-7 foi maior nas fêmeas expostas à DHL. A prole de ratas diabéticas que receberam DHL após o nascimento apresentou acúmulo de gotículas lipídicas no fígado, sendo um indicativo de diminuição da autofagia, o que foi confirmado pela menor fosforilação da AMPK e diminuição da conversão de LC3-I para LC3-II. Evidências demonstram que roedores que receberam DHL por um curto período de tempo têm aumento acentuado na autofagia hepática devido a um mecanismo adaptativo para reduzir a sobrecarga de gordura, enquanto há sinais de supressão na autofagia em roedores que recebem um DHL a longo prazo (Papáčková *et al.*, 2012; Da Cruz *et al.*, 2022), sendo a elevação crônica de Acetil-CoA um dos mecanismos

responsáveis pela supressão autofágica (Mariño *et al.*, 2014). Essa relação pode aprisionar os hepatócitos em um ciclo nocivo no qual a autofagia reduzida promove o acúmulo de lipídios, que então suprime ainda mais a função autofágica, aumentando a retenção lipídica (Singh *et al.*, 2009; Sathyanarayan *et al.*, 2017). Além disso, nossos resultados são consistentes com achados anteriores que indicam redução da resposta autofágica na MAFLD humana (Czaja, 2016) e em modelos usando camundongos (Tanaka *et al.*, 2016; Reginato *et al.*, 2016).

No processo de autofagia, o lisossomo é um dos componentes celulares mais importante (Xu *et al.*, 2020). Quando analisamos LAMP-2, uma proteína essencial presente na membrana lisossomal e responsável pela etapa de fusão dos autofagossomos com os lisossomos (Cho *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2021), observamos que, tanto as fêmeas provenientes do ambiente diabético (FD/DP) quanto as alimentadas com DHL na vida pós-natal (FC/DHL e FD/DHL), apresentaram diminuição de sua expressão proteica, demonstrando uma capacidade reduzida de fusão dos autofagossomos e lisossomos. Esses achados corroboram estudos que verificaram que a exposição às dietas com alta concentração de lipídios e à diversidade de graus de saturação dos ácidos graxos (saturados, mono e poli-insaturados) pode afetar as propriedades físico-químicas das bicamadas lipídicas (Hoefel *et al.*, 2011; Lian *et al.*, 2020), diminuindo a capacidade de fusão entre autofagossomos e lisossomos (Koga *et al.*, 2010). Sendo assim, a composição lipídica de membranas lisossomais é relevante para ser investigada nos modelos experimentais.

Nossa pesquisa mostrou um processo autofágico incorreto confirmado pelo acúmulo de lipofuscina. A lipofuscina é um polímero intracelular reticulado, constituído por proteínas insolúveis e lipídios, formada principalmente pela exposição a danos oxidativos nas macromoléculas (Jung *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2020), que se acumula nos lisossomos da maioria das células, incluindo os hepatócitos (Schmucker e Sacher, 2011). Entretanto, as enzimas lisossomais (hidrolases ácidas) não são eficazes para degradar a lipofuscina. Consequentemente, há declínio da capacidade lisossomal para romper macromoléculas intracelulares e

uma distribuição desequilibrada da disponibilidade de enzimas em lisossomos saudáveis não carregados com lipofuscina (Xu *et al.*, 2020), refletindo uma autofagia incompleta e malsucedida (Klionsky *et al.*, 2021). O acúmulo de lipofuscina leva a uma redução do *turnover* das mitocôndrias danificadas, o que resulta em aumento de EROS e causa prejuízo adicional do processo de autofagia pela diminuição da função lisossomal (Xu *et al.*, 2020). Assim, se o fluxo autofágico for bloqueado devido à perda de fusão entre autofagossomos e lisossomos, e/ou aumento de EROS, esse comprometimento na autofagia poderá contribuir para a morte celular via autofágica (morte celular tipo II) ou, alternativamente, contribuir para sinais pró-apoptóticos da morte celular tipo I (morte celular apoptótica) (Maiuri *et al.*, 2007; Ardem, 2018; Ajoolabady *et al.*, 2021).

Sugerimos que as vias apoptóticas (mitocondriais) foram ativadas devido ao comprometimento autofágico nas filhas de ratas-mães diabéticas (FD/DP), conforme demonstrado pelo aumento da expressão de caspase-3 clivada e diminuição da expressão de BCL-2. BCL-2 é uma proteína anti-apoptótica e que também regula a autofagia através da interação com Beclin-1 (Klionsky *et al.*, 2021). Na ausência de BCL-2, as proteínas pró-apoptóticas podem liberar fatores apoptogênicos, como o citocromo c, no citosol e promovem a ativação de caspases (Mahdavi *et al.*, 2018). Além disso, encontramos aumento da razão BAX/BCL-2, indicando que a via pró-apoptótica foi acelerada no fígado após alimentação com dieta rica em gordura (FC/DHL e FD/DHL). Tomados em conjunto, nossos resultados apontam que o prejuízo da autofagia hepática pode levar à morte celular devido a reações oxidativas intensas ocasionadas pelo acúmulo de lipídios, organelas danificadas e/ou proteínas mal dobradas (Petrović *et al.*, 2017). Um esquema dos principais achados neste estudo é mostrado na Figura 8.

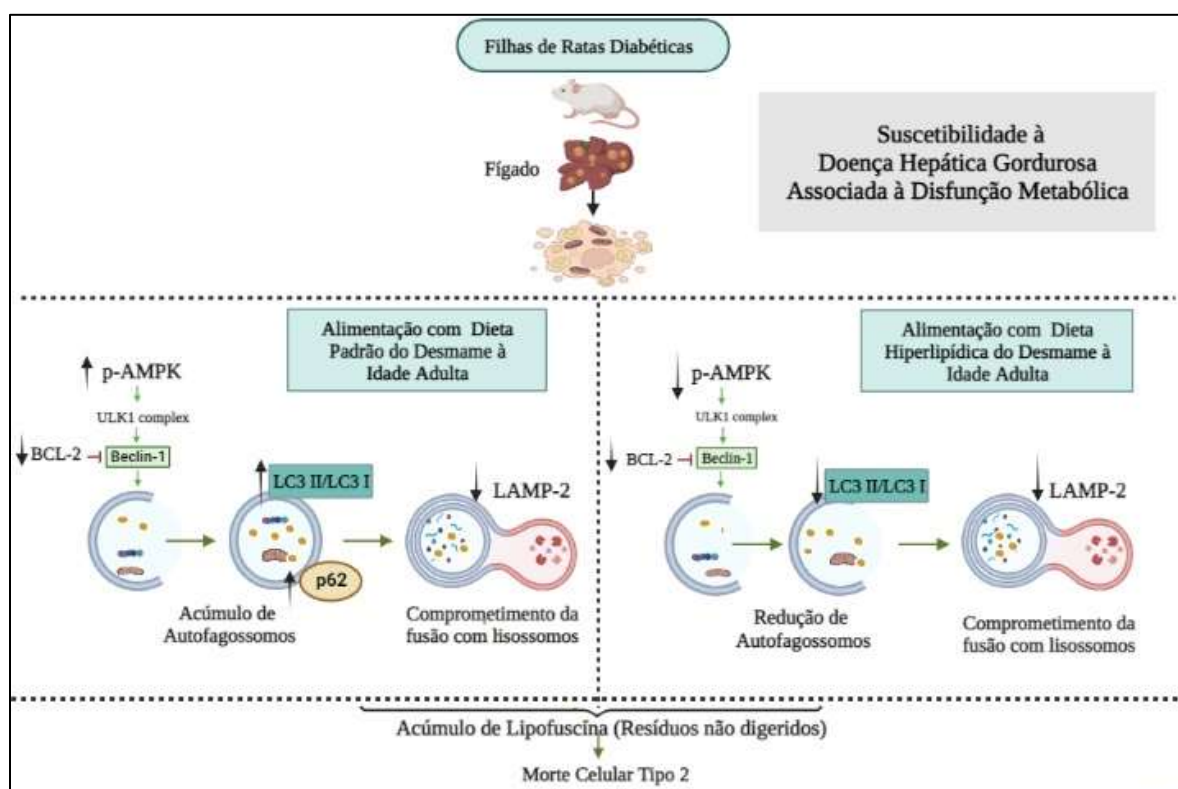


Figura 8. Resumo ilustrativo dos principais resultados encontrados em filhas, advindas de ratas diabéticas, alimentadas ou não com dieta hiperlipídica desde o desmame até a vida adulta (120 dias de vida). Fêmeas de mães diabéticas apresentaram ativação da autofagia hepática, com elevação de p-AMPK na idade adulta. Entretanto, o mecanismo foi comprometido devido ao bloqueio do fluxo autofágico, verificado pelo aumento de LC3-II/LC3-I, ausência de degradação de p62/SQSTM1 e diminuição de LAMP-2. Quando expostas a ambos insultos (hiperglicemia materna e dieta inadequada pós-desmame), a prole feminina apresentou comprometimento da resposta autofágica com diminuição de expressão de p-AMPK, LC3-II/LC3-I e LAMP-2, contribuindo para acúmulo de gotículas lipídicas, estresse oxidativo e inflamação hepática. As alterações na autofagia não foram capazes de restaurar a homeostase metabólica na prole, levando ao aparecimento do diabetes e hiperlipidemia na idade adulta, contribuindo para maior suscetibilidade à doença hepática gordurosa associada à disfunção metabólica. Além disso, a autofagia desregulada no fígado da prole feminina adulta, independentemente do tipo de dieta, levou ao acúmulo de lipofuscina nos

lisossomos e morte celular por apoptose (Fonte: do Autor).

De acordo com a base de dados analisada, este é o primeiro estudo que explora a influência do diabetes materno e de uma dieta rica em gordura na autofagia hepática da prole feminina na vida adulta. Nossas descobertas fornecem *insights* mais profundos sobre a relação da autofagia e apoptose na programação fetal ocasionada pelo diabetes. Além disso, nossos achados mostraram que as filhas de ratas diabéticas desafiadas à suplementação dietética com 30% kcal de gordura depois do nascimento apresentaram hiperglicemia e MAFLD, o que sugere potenciais implicações translacionais para a patologia humana. Ademais, apontamos a autofagia como um importante alvo para que estudos envolvendo drogas terapêuticas ou exercícios físicos no tratamento das complicações hepáticas relacionadas ao diabetes sejam feitos.

Cabe destacar há algumas limitações a serem apontadas: 1) Embora a extensão do acúmulo de lipídios fosse avaliada em microfotografias coradas com HE, poderia ter sido utilizado Oil-Red-O; 2) a conversão de LC3-II/LC3-I não foi estudada na presença de inibidores lisossômicos (como cloroquina) para estudar a influência do ambiente materno hiperglicêmico, o que poderia fornecer mais detalhes sobre o processo autofágico; 3) a análise da ultraestrutura de autofagossomos por microscopia eletrônica teria reforçado ainda mais os achados apresentados neste estudo e 4) estudo do efeito do diabetes materno na progênie com relação a alterações epigenéticas na prole seria importante para entender se estas modificações são progressivas.

5. CONCLUSÃO

A programação fetal causada pela hiperglicemia materna é determinante para indução do diabetes, resistência à insulina, hiperlipidemia e autofagia hepática desregulada em descendentes fêmeas na idade adulta, independentemente do tipo de dieta, o que causa morte celular por apoptose. Além disso, ambos os insultos

(hiperglicemia materna e DHL pós-natal) causam comprometimento da autofagia celular, contribuindo para a doença hepática gordurosa associada à disfunção metabólica, com a presença de acúmulo lipídico no fígado, estresse oxidativo e inflamação. Nossos achados são de extrema importância, uma vez que a alta prevalência do diabetes está crescendo exponencialmente devido às escolhas atuais de estilo de vida, como sedentarismo e a alta ingestão calórica. Assim, a regulação da autofagia é um importante alvo terapêutico para o diabetes e suas complicações hepáticas. Desta forma, prevenir e tratar o diabetes da mãe evitará a transmissão do diabetes para seus descendentes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem Sr. Danilo Chaguri e Jurandir Antonio pela assistência laboratorial e cuidados com os animais.

FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP/Brasil, sob coordenação da Dra. Débora Cristina Damasceno [Processo número 2016/25207-5], e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [Código Financeiro 001] relacionada à bolsa à Larissa Lopes da Cruz.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; v.105, p.121-126. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.
- Aerts L, Van Assche FA. Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; v.38, p.894-903. doi: 10.1016/j.biocel.2005.07.006

- Ajoolabady A, Aslkhodapasandhokmabad H, Libby P, Tuomilehto J, Lip GYH, Penninger JM, Richardson DR, Tang D, Zhou H, Wang S, Klionsky DJ, Kroemer G, Ren J. Ferritinophagy and ferroptosis in the management of metabolic diseases. *Trends Endocrinol Metab* 2021; v.32, p.444-462. doi: 10.1016/j.tem.2021.04.010.
- Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol* 2012; v.32, p.2-11. doi: 10.1128/MCB.06159-11.
- American Diabetes Association, ADA. Classification and diagnosis of diabetes: standards of cares in diabetes—2023. *Diabetes Care* 2023; v.46, p.S19–S40. doi: 10.2337/dc23-S002.
- Arab JP, Arrese M, Trauner M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Pathol* 2018; v.13, p.321-350. doi: 10.1146/annurev-pathol-020117-043617.
- Arden C. A role for Glucagon-Like Peptide-1 in the regulation of β -cell autophagy. *Peptides* 2018; v.100, p.85-93. doi: 10.1016/j.peptides.2017.12.002.
- Avagliano L, Massa V, Terraneo L, Samaja M, Doi P, Bulfamante GP, Marconi AM. Gestational diabetes affects fetal autophagy. *Placenta* 2017; v.55, p.90-93. doi: 10.1016/j.placenta.2017.05.002
- Bak DH, Na J, Choi MJ, Lee BC, Oh CT, Kim JY, Han HJ, Kim MJ, Kim TH, Kim BJ. Anti-apoptotic effects of human placental hydrolysate against hepatocyte toxicity in vivo and in vitro. *Int J Mol Med* 2018; v.42, p.2569-2583. doi: 10.3892/ijmm.2018.3830.
- Barco VS, Gallego FQ, Paula VG, Sinzato YK, Cruz LL, Souza MR, Iessi IL, Karki B, Corrente J, Volpato GT, Damasceno DC. Exposure to intrauterine diabetes and post-natal high-fat diet: effects on endocrine pancreas of adult rat female pups. *Life Sci* 2022a; p.121108. doi: 10.1016/j.lfs.2022.121108.
- Barco VS, Gallego FQ, Paula VG, Cruz LL, Karki B, Volpato GT, Damasceno DC. Effects of diabetes between generations on the pre-embryos of rats. *An Acad Bras Cienc* 2022b; v.94, p.e20220717. doi: 10.1590/0001-376520220220717
- Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol* 2012; v.56, p.952-964. doi: 10.1016/j.jhep.2011.08.025.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; v.72, p.248–254. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology* 2005; v.42, p.987-1000. doi: 10.1002/hep.20920.
- Cederberg J, Galli J, Luthman H, Eriksson UJ. Increased mRNA levels of Mn-SOD and catalase in embryos of diabetic rats from a malformation-resistant strain. *Diabetes* 2000; v.49, p.101–107. doi: 10.2337/diabetes.49.1.101.
- Cho DK, Choi DH, Cho JY. Effect of treadmill exercise on skeletal muscle autophagy in rats with obesity induced by a high-fat diet. *J Exerc Nutrition Biochem* 2017; v.21, p.26-34. doi: 10.20463/jenb.2017.0013.

- Czaja MJ. Function of autophagy in nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci* 2016; v.61, p.1304-1313. doi: 10.1007/s10620-015-4025-x.
- Da Cruz LL, Vesentini G, Sinzato YK, Villaverde AISB, Volpato GT, Damasceno DC. Effects of high-fat diet-induced diabetes on autophagy in the murine liver: A systematic review and meta-analysis. *Life Sci* 2022; p.121012. doi: 10.1016/j.lfs.2022.121012.
- Da Cruz LL, Barco VS, Paula VG, Gallego FQ, Souza MR, Corrente JC, Zambrano E, Volpato GT, Damasceno DC. Severe diabetes induction as a generational model for growth restriction of rat. *Reprod Sci* 2023; v.30, p.2416-2428. doi: 10.1007/s43032-023-01198-9.
- Devarajan A, Rajasekaran NS, Valburg C, Ganapathy E, Bindra S, Freije WA. Maternal perinatal calorie restriction temporally regulates the hepatic autophagy and redox status in male rat. *Free Radic Biol Med*. 2019; v.130, p.592-600. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.029.
- De Ritis F, Coltorti M, Giusti G. An enzymic test for the diagnosis of viral hepatitis; the transaminase serum activities. *Clin Chim Acta* 1957; v.2, p.70-74. doi: 10.1016/0009-8981(57)90027-x.
- Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, Zelber-Sagi S, Wai-Sun Wong V, Dufour JF, Schattenberg JM, *et al.* A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol* 2020; v.73, p.202-209. doi: 10.1016/j.jhep.2020.03.039.
- Finck BN. Targeting Metabolism, Insulin resistance, and diabetes to treat nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes* 2018; v.67, p.2485-2493. doi: 10.2337/dbi18-0024.
- Gallego FQ, Miranda CA, Sinzato YK, Iessi IL, Dallaqua B, Pando RH, Rocha NS, Volpato GT, Damasceno DC. Temporal analysis of distribution pattern of islet cells and antioxidant enzymes for diabetes onset in postnatal critical development window in rats. *Life Sci* 2019; v.226, p.57-67. doi: 10.1016/j.lfs.2019.03.061.
- Geisler CE, Renquist BJ. Hepatic lipid accumulation: cause and consequence of dysregulated glucoregulatory hormones. *J Endocrinol* 2017; v.234, p.R1-R21. doi: 10.1530/JOE-16-0513.
- González P, Lozano P, Ros G, Solano F. Hyperglycemia and oxidative stress: An integral, updated and critical overview of their metabolic interconnections. *Int J Mol Sci* 2023; v.24, p.9352. doi: 10.3390/ijms24119352
- Grasselli E, Compalati AD, Voci A, Vecchione G, Ragazzoni M, Gallo G, Borro P, Sumberaz A, Testino G, Vergani L. Altered oxidative stress/antioxidant status in blood of alcoholic subjects is associated with alcoholic liver disease. *Drug Alcohol Depend* 2014; v.143, p.112-119. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2014.07.013.
- Guerrero-Romero F, Simental-Mendía LE, González-Ortiz M, Martínez-Abundis E, Ramos-Zavala MG, Hernández-González SO, Jacques-Camarena O, Rodríguez-Morán M. The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; v.95, p.3347-3351. doi: 10.1210/jc.2010-0288.

- He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009; v.43, p.67-93. doi: 10.1146/annurev-genet-102808-114910.
- Hod M, Kapur A, Sacks DA, Hadar E, Agarwal M, Di Renzo GC, Cabero Roura L, McIntyre HD, Morris JL, Divakar H. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) Initiative on gestational diabetes mellitus: A pragmatic guide for diagnosis, management, and care. *Int J Gynaecol Obstet* 2015; v.131, p.S173-211. doi: 10.1016/S0020-7292(15)30033-3.
- Hoefel AL, Hansen F, Rosa PD, Assis AM, Silveira SL, Denardin CC, Pettenuzzo L, Augusti PR, Somacal S, Emanuelli T, Perry ML, Wannmacher CM. The effects of hypercaloric diets on glucose homeostasis in the rat: influence of saturated and monounsaturated dietary lipids. *Cell Biochem Funct* 2011; v.29, p.569-576. doi: 10.1002/cbf.1789.
- Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol* 1994; v.233, p.380–385. doi: 10.1016/s0076-6879(94)330441.
- Joo HW, Song YS, Park IH, Shen GY, Seong JH, Shin NK, Lee AH, Kim H, Kim KS. Granulocyte colony stimulating factor ameliorates hepatic steatosis associated with improvement of autophagy in diabetic rats. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2020; v.2020, p.2156829. doi: 10.1155/2020/2156829.
- Jung T, Höhn A, Grune T. Lipofuscin: detection and quantification by microscopic techniques. *Methods Mol Biol* 2010; v.594, p.173-193. doi: 10.1007/978-1-60761-411-1_13.
- Keshavjee B, Lambelet V, Coppola H, Viertl D, Prior JO, Kappeler L, Armengaud JB, Chouraqui JP, Chehade H, Vanderriele PE, Allouche M, Balsiger A, Sarre A, Peyter AC, Simeoni U, Zydzorczyk C. Stress-induced premature senescence related to oxidative stress in the developmental programming of nonalcoholic fatty liver disease in a rat model of intrauterine growth restriction. *Antioxidants (Basel)* 2022; v.11, p.1695. doi: 10.3390/antiox11091695.
- Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, Abdellatif M, Abdoli A, Abel S, Abeliovich H, Abildgaard MH, Abudu YP, Acevedo-Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy* 2021; v.17, p.1-382. doi: 10.1080/15548627.2020.1797280.
- Knopfholz J, Disserol CC, Pierin AJ, Schirr FL, Streisky L, Takito LL, Massucheto Ledesma P, Faria-Neto JR, Olandoski M, da Cunha CL, Bandeira AM. Validation of the friedewald formula in patients with metabolic syndrome. *Cholesterol* 2014; v.2014, p.261878. doi: 10.1155/2014/261878.
- Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *FASEB J* 2010; v.24, p.3052-3065. doi: 10.1096/fj.09-144519.
- Kwanten WJ, Martinet W, Michielsen PP, Francque SM. Role of autophagy in the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease: a controversial issue. *World J Gastroenterol* 2014; v.20, p.7325-7338. doi: 10.3748/wjg.v20.i23.7325.
- Lai LL, Lu HQ, Li WN, Huang HP, Zhou HY, Leng EN, Zhang YY. Protective effects of quercetin and crocin in the kidneys and liver of obese Sprague-Dawley rats with Type 2 diabetes: Effects of quercetin and crocin on T2DM rats. *Hum Exp Toxicol* 2021; v.40, p.661-672. doi: 10.1177/0960327120954521.

- Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; v.71, p.952-958. doi: 10.1016/0006-291X(76)90747-6.
- Lian CY, Zhai ZZ, Li ZF, Wang L. High fat diet-triggered non-alcoholic fatty liver disease: A review of proposed mechanisms. *Chem Biol Interact* 2020; v.330, p.109199. doi: 10.1016/j.cbi.2020.109199.
- Lomas-Soria C, Reyes-Castro LA, Rodríguez-González GL, Ibáñez CA, Bautista CJ, Cox LA, Nathanielsz PW, Zambrano E. Maternal obesity has sex-dependent effects on insulin, glucose and lipid metabolism and the liver transcriptome in young adult rat offspring. *J Physiol* 2018; v.596, p.4611-4628. doi: 10.1113/JP276372.
- López-Soldado I, Herrera E. Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring. *Exp Diabetes Res* 2003; v.4, p.107-118. doi: 10.1155/EDR.2003.107.
- Madrigal-Matute J, Cuervo AM. Regulation of liver metabolism by autophagy. *Gastroenterology* 2016; v.150, p.328-339. doi: 10.1053/j.gastro.2015.09.042.
- Mahdavi S, Khodarahmi P, Roodbari NH. Effects of cadmium on Bcl-2/ Bax expression ratio in rat cortex brain and hippocampus. *Hum Exp Toxicol*. 2018; v.37, p.321-328. doi: 10.1177/0960327117703687.
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; v.8, p.741-752. doi: 10.1038/nrm2239.
- Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1974; v.47, p.469-474. doi: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x.
- Mariño G, Pietrocola F, Eisenberg T, Kong Y, Malik SA, Andryushkova A, Schroeder S, Pendl T, Harger A, Niso-Santano M, et al. Regulation of autophagy by cytosolic acetyl-coenzyme A. *Mol Cell* 2014; v.53, p.710-725. doi: 10.1016/j.molcel.2014.01.016.
- Martinez-Lopez N, Singh R. Autophagy and lipid droplets in the liver. *Annu Rev Nutr* 2015; v.35, p.215-237. doi: 10.1146/annurev-nutr-071813-105336.
- Michalopoulos GK, Bhushan B. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2021; v.18, p.40-55. doi: 10.1038/s41575-020-0342-4.
- Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 2011; v.147, p.728-741. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.026.
- Morrison JL, Botting KJ, Darby JRT, David AL, Dyson RM, Gatford KL, Gray C, Herrera EA, Hirst JJ, Kim B, et al. Guinea pig models for translation of the developmental origins of health and disease hypothesis into the clinic. *J Physiol* 2018; v.596, p.5535-5569. doi: 10.1113/JP274948.
- Müllebnner A, Herminghaus A, Miller I, Kames M, Luís A, Picker O, Bauer I, Kozlov AV, Duvigneau JC. Tissue damage, not infection, triggers hepatic unfolded protein response in an experimental rat peritonitis model. *Front Med (Lausanne)* 2022; v.9, p.785285. doi: 10.3389/fmed.2022.785285.
- National Research Council (US). Committee for the update of the guide for the care

- and use of laboratory animals. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US), 2011.
- Niu H, Zhou Y. Nonlinear relationship between AST-to-ALT ratio and the incidence of Type 2 Diabetes Mellitus: A Follow-Up Study. *Int J Gen Med* 2021; v.14, p.8373-8382. doi: 10.2147/IJGM.S341790.
- Noble RW, Gibson QH. The reaction of ferrous horseradish peroxidase with hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1970; v.245, p.2409-2413. doi: 10.1016/s0021-9258(18)63167-9.
- Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol* 2011; v.29, p.71-109. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101312.
- Papáčková Z, Daňková H, Páleníčková E, Kazdová L, Cahová M. Effect of short- and long-term high-fat feeding on autophagy flux and lysosomal activity in rat liver. *Physiol Res* 2012; v.61, p.S67-76. doi: 10.33549/physiolres.932394.
- Paula VG, Sinzato YK, de Moraes-Souza RQ, Soares TS, Souza FQG, Karki B, de Andrade Paes AM, Corrente JE, Damasceno DC, Volpato GT. Metabolic changes in female rats exposed to intrauterine hyperglycemia and postweaning consumption of high-fat diet†. *Biol Reprod* 2022; v.106, p.200-212. doi: 10.1093/biolre/ioab195.
- Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, *et al.* Reporting animal research: Explanation and Elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol* 2020; v.18, p.e3000411. doi: 10.1371/journal.pbio.3000411.
- Petrović A, Bogojević D, Korać A, Golić I, Jovanović-Stojanov S, Martinović V, Ivanović-Matić S, Stevanović J, Poznanović G, Grigorov I. Oxidative stress-dependent contribution of HMGB1 to the interplay between apoptosis and autophagy in diabetic rat liver. *J Physiol Biochem* 2017; v.73, p.511-521. doi: 10.1007/s13105-017-0574-0.
- Piao D, Ritchey JW, Holyoak GR, Wall CR, Sultana N, Murray JK, Bartels KE. In vivo percutaneous reflectance spectroscopy of fatty liver development in rats suggests that the elevation of the scattering power is an early indicator of hepatic steatosis. *J Innov Opt Health Sci.* 2018, v.11, p.1850019.
- Qian Q, Zhang Z, Orwig A, Chen S, Ding WX, Xu Y, Kunz RC, Lind NRL, Stamler JS, Yang L. S-nitrosoglutathione reductase dysfunction contributes to obesity-associated hepatic insulin resistance via regulating autophagy. *Diabetes* 2018; v.67, p.193-207. doi: 10.2337/db17-0223.
- Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition* 2005; v.21, p.775-777. doi: 10.1016/j.nut.2005.04.002.
- Reginato A, de Fante T, Portovedo M, da Costa NF, Payolla TB, Miyamoto JÉ, Simino LA, Ignácio-Souza LM, Torsoni MA, Torsoni AS, Milanski M. Autophagy proteins are modulated in the liver and hypothalamus of the offspring of mice with diet-induced obesity. *J Nutr Biochem* 2016; v.34, p.30-41. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.04.002.
- Sathyanarayan A, Mashek MT, Mashek DG. ATGL Promotes autophagy/lipophagy

- via SIRT1 to control hepatic lipid droplet catabolism. *Cell Rep* 2017; v.19, p.1-9. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.026.
- Schmucker DL, Sanchez H. Liver regeneration and aging: A current perspective. *Curr. Gerontol Geriatr Res* 2011, v.2011, p.526379. doi: 10.1155/2011/526379.
- Spradley FT, Smith JA, Alexander BT, Anderson CD. Developmental origins of nonalcoholic fatty liver disease as a risk factor for exaggerated metabolic and cardiovascular-renal disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2018; v.315, p.E795-E814. doi: 10.1152/ajpendo.00394.2017.
- Simpson J, Kelly JP. The impact of environmental enrichment in laboratory rats—Behavioural and neurochemical aspects. *Behav Brain Res* 2011; v.222, p.246-264. doi: 10.1016/j.bbr.2011.04.002
- Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 2009; v.458, p.1131-1135. doi: 10.1038/nature07976.
- Sinzato YK, Klöppel E, Miranda CA, Paula VG, Alves LF, Nascimento LL, Campos AP, Karki B, Hampl V, Volpato GT, Damasceno DC. Comparison of streptozotocin-induced diabetes at different moments of the life of female rats for translational studies. *Lab Anim* 2021; v.55, p.329-340. doi: 10.1177/00236772211001895.
- Sinzato YK, Paula VG, Gallego FQ, Moraes-Souza RQ, Corrente JE, Volpato GT, Damasceno DC. Maternal diabetes and postnatal high-fat diet on pregnant offspring. *Front Cell Dev Biol* 2022; v.10, p.818621. doi: 10.3389/fcell.2022.818621.
- Sinzato YK, Rodrigues T, Cruz LL, Barco VS, Souza MR, Volpato GT, Damasceno DC. Assessment of oxidative stress biomarkers in rat blood. *Bio-protocol* 2023; v.13, p.e4626. doi: 10.21769/BioProtoc.4626
- Sorbi D, Boynton J, Lindor KD. The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol* 1999; v.94, p.1018–1022. doi: 10.1111/j.1572-0241.1999.01006.x.
- Tanaka S, Hikita H, Tatsumi T, Sakamori R, Nozaki Y, Sakane S, Shiode Y, Nakabori T, Saito Y, Hiramatsu N, *et al.* Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology* 2016; v.64, p.1994-2014. doi: 10.1002/hep.28820.
- Tai MM. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes Care* 1994; v.17, p.152-154. doi: 10.2337/diacare.17.2.152.
- Tain YL, Hsu CN. Interplay between oxidative stress and nutrient sensing signaling in the developmental origins of cardiovascular disease. *Int J Mol Sci* 2017; v.18, p.841. doi: 10.3390/ijms18040841.
- Tozour J, Hughes F, Carrier A, Vieau D, Delahaye F. Prenatal hyperglycemia exposure and cellular stress, a sugar-coated view of early programming of metabolic diseases. *Biomolecules* 2020; v.10, p.1359. doi: 10.3390/biom10101359.

- Vasques AC, Novaes FS, de Oliveira Mda S, Souza JR, Yamanaka A, Pareja JC, Tambascia MA, Saad MJ, Geloneze B. TyG index performs better than HOMA in a Brazilian population: a hyperglycemic clamp validated study. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; v.93, p.e98-e100. doi: 10.1016/j.diabres.2011.05.030.
- Williams L, Seki Y, Vuguin PM, Charron MJ. Animal models of in utero exposure to a high fat diet: a review. *Biochim Biophys Acta* 2014; v.1842, p.507-519. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.07.006.
- Wojcikowski K, Gobe G. Animal studies on medicinal herbs: predictability, dose conversion and potential value. *Phytother Res* 2014; v.28, p.22-27. doi: 10.1002/ptr.4966.
- Xu F, Hua C, Tautenhahn HM, Dirsch O, Dahmen U. The role of autophagy for the regeneration of the aging liver. *Int J Mol Sci* 2020; v.21, p.3606. doi: 10.3390/ijms21103606.
- Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* 1976; v.15, p.212-216. doi: 10.1016/0006-2944(76)90049-1.
- Yao D, GangYi Y, QiNan W. Autophagic dysfunction of β cell dysfunction in type 2 diabetes, a double-edged sword. *Genes Dis* 2020; v.8, p.438-447. doi: 10.1016/j.gendis.2020.03.003.
- Yu X, Zhang L, Lu H, Chen H, Yu L, Cao X, Shen D. Rapamycin protects against hepatic injury in streptozotocin-induced diabetic rats by enhancing autophagy. *Int J Clin Exp Med* 2019; v.12, p.11383-11393.
- Zyzdorzcyk C, Li N, Chehade H, Mosig D, Bidho M, Keshavjee B, Armengaud JB, Nardou K, Siddeek B, Benahmed M, Vergely C, Simeoni U. Transient postnatal overfeeding causes liver stress-induced premature senescence in adult mice. *Sci Rep* 2017; v.7, p.12911. doi: 10.1038/s41598-017-11756-2.
- Zambrano E, Martínez-Samayoa PM, Bautista CJ, Deás M, Guillén L, Rodríguez-González GL, Guzmán C, Larrea F, Nathanielsz PW. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol* 2005; v.566, p.225-36. doi: 10.1113/jphysiol.2005.086462.
- Zeng TS, Liu FM, Zhou J, Pan SX, Xia WF, Chen LL. Depletion of Kupffer cells attenuates systemic insulin resistance, inflammation and improves liver autophagy in high-fat diet fed mice. *Endocr J* 2015; v.62, p.615-626. doi: 10.1507/endocrj.EJ15-0046.
- Zhang D, Liu K, Hu W, Lu X, Li L, Zhang Q, Huang H, Wang H. Prenatal dexamethasone exposure caused fetal rats liver dysplasia by inhibiting autophagy-mediated cell proliferation. *Toxicology* 2021; v.15, p.152664. doi: 10.1016/j.tox.2020.152664.
- Zhou W, Ye S. Rapamycin improves insulin resistance and hepatic steatosis in type 2 diabetes rats through activation of autophagy. *Cell Biol Int* 2018; v.42, p.1282-1291. doi: 10.1002/cbin.11015.

Anexos

ANEXO 1. Aprovação CEUA - FMB/Unesp - Projeto de pesquisa “guarda-chuva”



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA




Comissão de Ética no Uso de Animais
Criação através da Portaria DFM nº 811 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1218/2017 -CEUA

Certificamos que a proposta intitulada: **“Avaliação de descendentes expostas ao diabetes moderado intraútero submetidas à dieta hiperlipídica no período pós-natal e tratadas com mistura de cálcio e vitamina D durante a prenhez”**, conduzida pela Pesquisadora Principal: **Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno Mairalles dos Santos**, com a colaboração de Gustavo Tadeu Volpato, Antônio Carlos Lalla, Arlindo Sérgio Gabriel, Carlos Roberto Gonçalves Lima, Danilo Chaguri, Franciane Quintanilha Gallego Souza, Marcos Rogério Pimentel, Raianne Queiroz de Moraes Souza, Thaígra de Sousa Soares, Verônica Gonçalves Paula e Yuri Karen Sinzato, com o nº 1218/2017, **Subprojeto I** : **“Análise do perfil lipídico e estresse oxidativo de ratas expostas à hiperglicemia intraútero, dieta hiperlipídica no período pós-natal e tratadas com cálcio e vitamina D na prenhez”**, conduzido pela Pesquisadora: **Thaígra de Sousa Soares**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.099, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião de 27 de abril de 2017.

Inclusão do Subprojeto I - Aprovado em 12 de dezembro de 2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	29 de abril de 2019
Espécie/Linhagem/Raça	Rato Sprague Dawley
Nº de animais	412
Idade/Peso	4 a 400 gramas / Recém-nascidos e adulto
Sexo	Macho e Fêmea
Origem	Biotério Central da Unesp - Botucatu

Graziela Nogueira Bertani
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Prof. Ass. Guilherme Antônio Moreira de Barros
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Distrito Rubião Júnior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP/ 18.519-970 Fones: (14) 3880.1608 e 3880.1609 E-mail Secretaria: ccua@fmb.unesp.br

ANEXO 2. Aprovação CEUA - FMB/Unesp – Relacionado ao referido Projeto de pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA



Comissão de Ética no Uso de Animais

Criada através da Portaria DFM nº 511 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1341/2019 – CEUA

Certificamos que o projeto intitulado: **"Avaliação da regulação autofágica de ratas expostas à hiperglicemia materna intrauterina e submetidas à dieta após desmame"**, conduzido pela Pesquisadora: **Larissa Lopes da Cruz** – Orientador: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno – Coorientador: Profa. Dra. Yuri Karen Sinzato – Colaborador: Gustavo Tadeu Volpato, registrada com o nº **1341/2019**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (e xeto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião ordinária de 04 março de 2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/04/2023
Espécie/Linhagem/Raça	Sprague Dawley
Nº de animais	54
Idade/Peso	120 dias – 250gramas
Sexo	08 Machos e 46 Fêmeas
Origem	Biotério



Sara Rosa Stanley Sampaio
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP



Profa. Associada Bertha Furlan Polegato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Distrito Rubião Júnior, s/nº – Botucatu – SP, CEP: 18.618-970 Fones: (14) 3880.18.80 – E-mail Secretária: ceua@fmb.unesp.br

Apêndice

Quadro 1. Composição bromatológica da dieta padrão e dieta hiperlipídica.

Composição	Dieta	
	Padrão	Hiperlipídica
Energia (Kcal/g)	4,0	4,9
Mistura (%/100 g)	7,4	3,6
Matéria Seca (%/100 g)	92,5	96,3
Minerais (% Matéria seca)	6,7	2,8
Proteína Crua (% Matéria seca)	25,8	26,8
Extrato Etéreo (% Matéria seca)	3,5	15,2
Fibra Crua (% Matéria seca)	43,6	45,4

As ratas filhas de mães controles e diabéticas receberam uma dieta padrão (28,5% Kcal de proteína, 62,6% kcal de carboidrato, 8,7% kcal de gordura – ração comercial de rato, Purina®, Brasil) ou hiperlipídica (DHL) (23,4% kcal de proteína, 46,6% kcal de carboidratos, 30% kcal de gordura) do desmame à vida adulta (120 dias de vida pós-natal). A DHL foi preparada na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/UNESP). Foram utilizados os seguintes ingredientes: farelo de soja, sorgo, casca de soja, amido de milho, açúcar refinado, banha de porco, minerais (ferro, biotina, vitamina B12, vitamina D, vitamina B6, vitamina E, vitamina A, selênio e potássio), sal. Estes ingredientes foram moídos, misturados e oferecidos na forma de *pellets*. Após o preparo, a ração foi mantida sob refrigeração até o momento do consumo.



Ração hiperlipídica. Fonte: LAPGO

Publicações durante o Doutorado

Artigos como primeira autora:

1. Phytochemical and antidiabetic analysis of *Curatella americana* L. aqueous extract on the rat pregnancy. **Cruz LL**, Ferreira Silva BS, Araujo GG, Leal-Silva T, Paula VG, Souza MR, Soares TS, Moraes-Souza RQ, Monteiro GC, Lima GPP, Damasceno DC, Volpato GT. J Ethnopharmacol. 2022; 293:115287. doi: 10.1016/j.jep.2022.115287. PMID: 35421527
2. Effects of a maternal high-fat diet on adipose tissue in murine offspring: A systematic review and meta-analysis. Saullo C, **Cruz LLD**, Damasceno DC, Volpato GT, Sinzato YK, Karki B, Gallego FQ, Vesentini G. Biochimie. 2022; 201:18-32. doi: 10.1016/j.biochi.2022.06.009. PMID: 35779649
3. Effects of high-fat diet-induced diabetes on autophagy in the murine liver: A systematic review and meta-analysis. **da Cruz LL**, Vesentini G, Sinzato YK, Villaverde AISB, Volpato GT, Damasceno DC. Life Sci. 2022; 309:121012. doi: 10.1016/j.lfs.2022.121012. PMID: 36179817
4. Severe diabetes induction as a generational model for growth restriction of rat. **Cruz LL**, Barco VS, Paula VG, Gallego FQ, Souza MR, Corrente JC, Zambrano E, Volpato GT, Damasceno DC. Reprod Sci. 2023; 30:2416-2428. doi: 10.1007/s43032-023-01198-9. PMID: 36849856

Publicações de co-autoria:

1. Maternal-fetal repercussions of *Phyllanthus niruri* L. treatment during rat pregnancy. Paula VG, **Cruz LL**, Sene LB, Gratão TB, Soares TS, Moraes-Souza RQ, Damasceno DC, Volpato GT. J Ethnopharmacol. 2020; 254:112728. doi: 10.1016/j.jep.2020.112728. Epub 2020 Mar 4. PMID: 32145330.
2. Exposure to intrauterine diabetes and post-natal high-fat diet: Effects on the endocrine pancreas of adult rat female pups. Barco VS, Gallego FQ, Paula VG, Sinzato YK, **Cruz LL**, Souza MR, Iessi IL, Karki B, Corrente JE, Volpato GT, Damasceno DC. Life Sci. 2022; 310:121108. doi: 10.1016/j.lfs.2022.121108. PMID: 36273628
3. Effects of diabetes between generations on the pre-embryos of rats. Barco VS, Gallego FQ, Paula VG, **Cruz LL**, Karki B, Volpato GT, Damasceno DC. An Acad Bras Cienc. 2022; 94(Suppl. 4):e20220717. doi: 10.1590/0001-376520220220717
4. Assessment of oxidative stress biomarkers in rat blood. Sinzato YK, Rodrigues T, **Cruz LL**, Barco VS, Souza MR, Volpato GT, Damasceno DC. Bio-protocol. 2023; 13(05):e4626. doi: 10.21769/BioProtoc.4626. PMID: 36908641
5. Toxicological effects of the *Morinda citrifolia* L. fruit extract on maternal reproduction and fetal development in rats. Leal-Silva T, Souza MR, **Cruz LL**, Moraes-Souza RQ, Paula VG, Soares TS, Dela Justina V, Giachini FR, Damasceno DC, Américo MF, Volpato GT. Drug Chem Toxicol. 2023; 46(3):609-615. doi: 10.1080/01480545.2022.2070197. PMID: 35502509
6. Maternal-fetal toxicity of *Strychnos pseudoquina* extract treatment during pregnancy. Souza MR, Brito ECB, Furtado LS, Barco VS, **Cruz LLD**, Moraes-Souza RQ, Monteiro GC, Lima GPP, Damasceno DC, Volpato GT. J

Ethnopharmacol. 2023; 311:116459. doi: 10.1016/j.jep.2023.116459. PMID: 37023837

7. Intergenerational hyperglycemia impairs mitochondrial function and follicular development and causes oxidative stress in rat ovaries independent of the consumption of a high-fat diet. Paula VG, Sinzato YK, Gallego FQ, **Cruz LL**, Aquino AM, Scarano WR, Corrente JE, Volpato GT, Damasceno DC. *Nutrients*. 2023; 15:4407. doi: 10.3390/nu15204407.

Contatos on line:

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7785234526526284>

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6740-2202>

Divulgação e eventos científicos durante o Doutorado e relacionados ao projeto de pesquisa

Trabalhos como autora principal:

1. **Cruz LL**, Sinzato YK, Paula VG, Gallego FQ, Barco VS, Volpato GT, Damasceno DC. Maternal diabetes and a high-fat diet promote metabolic dysfunction-associated fatty liver disease in female pups rats. In: **XXXVII Reunião Anual da FeSBE**, 2023, Búzios - RJ. Anais da XXXVII Reunião Anual da FeSBE. v.1. p. 168620-168620.
2. **Cruz LL**, Sinzato YK, Paula VG, Fioretto MN, Camargo ACL, Gallego FQ, Barco VS, Corrente JE, Rodrigues T, Justulin LA, Volpato GT, Damasceno DC. Evaluation of liver autophagy regulation of adult rats exposed to intrauterine hyperglycemia and submitted to the high - fat diet after weaning. In: **XXXVI Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE)**, 2022. XXXVI Annual Meeting of Federation of Societies of Experimental Biology (FeSBE) Abstracts, 2022. v. 19. p. 1-491.
3. **Cruz LL**, Kloppel E, Gallego FQ, Iessi IL, Gelaleti RB, Moraes-Souza RQ, Corrente JE, Santos DC, Justulin LA, Rodrigues T, Volpato GT, Damasceno DC. Impact of maternal hyperglycemia on insulin signalling and mitochondrial phenotype of skeletal muscle of adult female diabetic rats. In: **XXXVI Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE)**, 2022. XXXVI Annual Meeting of Federation of Societies of Experimental Biology (FeSBE) Abstracts, 2022. v. 19. p. 1-491.
4. **Cruz LL**, Barco VS, Paula VG, Gallego FQ, Souza MR, Kloppel E, Sinzato YK, Damasceno DC, Volpato GT. *Curatella americana* extract impacts on the embryo implantation of offspring from diabetic rats. In: **International Symposium on Reproductive Health**, 2021. International Symposium on Reproductive Health: overcoming barriers for research in reproduction. Buenos Aires - Argentina: Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology, 2021. v. 48. p. 733-777.
5. **Cruz LL**. Evaluation of autophagic regulation of the offspring exposed to intrauterine diabetes and submitted to hyperlipid diet after weaning. **IV Encontro Translational Researches in Complicated Pregnancies**. Faculdade de Medicina - UNESP – Botucatu. 2019.