



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**MARIANA CARLA MENDES BRANDÃO**

**EFEITO DA DERIVAÇÃO GÁSTRICA EM Y DE *ROUX* SOBRE O FÍGADO  
DE FILHOTES DE PAIS OBESOS PELA DIETA DE CAFETERIA**

**EFFECT OF ROUX-EN-Y GASTRIC BYPASS ON LIVER OF MALE  
OFFSPRING OF CAFETERIA OBESE RATS**

CAMPINAS/SP

2018

**MARIANA CARLA MENDES BRANDÃO**

**EFEITO DA DERIVAÇÃO GÁSTRICA EM Y DE ROUX SOBRE O FÍGADO  
DE FILHOTES DE PAIS OBESOS PELA DIETA DE CAFETERIA**

**EFFECT OF ROUX-EN-Y GASTRIC BYPASS ON LIVER OF MALE  
OFFSPRING OF CAFETERIA OBESE RATS**

Tese apresentada ao Programa De Pós-Graduação *Stricto Sensu* Biologia Funcional e Molecular – Nível Doutorado, do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biologia Funcional e Molecular, área de concentração Fisiologia.

Thesis presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the Degree of PhD in Functional and Molecular Biology in the area of Physiology.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA  
ALUNA MARIANA CARLA MENDES BRANDÃO  
E ORIENTADA PELO PROF. DR. ANTONIO  
CARLOS BOSCHIERO

*Orientador: Antonio Carlos Boschiero*

*Co-Orientador: Maria Lúcia Bonfleur e Emerielle Cristine Vanzela*

CAMPINAS-SP

2018

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2015/11304-6

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M522e Mendes, Mariana Carla, 1990-  
Efeito da derivação gástrica em Y de Roux sobre o fígado de filhotes de pais obesos pela dieta de cafeteria / Mariana Carla Mendes Brandão. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Antonio Carlos Boschiero.  
Coorientadores: Maria Lúcia Bonfleur e Emerielle Cristine Vanzela.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Obesidade. 2. Cirurgia bariátrica. 3. Hepatopatia gordurosa não alcoólica. 4. Epigenética. I. Boschiero, Antonio Carlos, 1943-. II. Bonfleur, Maria Lúcia. III. Vanzela, Emerielle Cristine, 1982-. IV. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. V. Título.

**Informações para Biblioteca Digital**

**Título em outro idioma:** Effect of Roux-En-Y gastric bypass on liver of male offspring of cafeteria obese rats

**Palavras-chave em inglês:**

Obesity

Bariatric surgery

Non-alcoholic fatty liver disease

Epigenetics

**Área de concentração:** Fisiologia

**Titulação:** Doutora em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

Antonio Carlos Boschiero [Orientador]

Marciane Milanski

Camila Aparecida Machado de Oliveira

Antonio Marcus de Andrade Paes

Patrícia Cristina Lisboa

**Data de defesa:** 09-03-2018

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 09 de março de 2018

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Antonio Carlos Boschiero (Presidente)

Prof.(a) Marciane Milanski Ferreira

Prof. (a) Camila Aparecida Machado de Oliveira

Prof. Antonio Marcus de Andrade Paes

Prof. (a) Patrícia Cristina Lisboa da Silva

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais Luiz e Sonia, por terem me auxiliado nos momentos mais difíceis dessa jornada, por me incentivarem a sempre conquistar os meus sonhos e por me amarem incondicionalmente. Essa realização também é de vocês! Obrigada por tudo sempre! Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A **Deus**, por ter cuidado de mim em todos os momentos desses três anos e por me conceder fé, sabedoria e paciência para trilhar esse caminho.

Aos meus pais **Luiz e Sonia** por todo incentivo, amor, carinho e paciência!

Ao meu esposo e amor **Paulo** por toda paciência, carinho e principalmente por estar ao meu lado nos momentos difíceis dessa caminhada. Obrigada pelo companheirismo e por sonhar meus sonhos comigo! Te amo!

A minha irmã **Luana** e ao meu cunhado **Diego** que mesmo estando longe, se preocuparam e torceram pelo meu sucesso e minha felicidade.

A minha amiga **Fernanda** por me auxiliar em parte dos experimentos, por torcer por meu sucesso e por estar comigo nos momentos mais especiais da minha vida!

Ao meu querido orientador **Boschiero**, por toda paciência, sabedoria e orientação. Obrigada por toda generosidade e docilidade nesse período.

A minha co-orientadora **Emeriele**, obrigada por toda paciência, ajuda, e orientação nesse período. A minha também co-orientadora **Maria Lúcia**, que me auxiliou desde o início da minha vida na pesquisa!

Aos meus colegas de laboratório que fizeram parte dessa conquista direta ou indiretamente.

Aos funcionários da UNICAMP: **Marise, Tati, Bill, César, Fran e Monica** por cuidarem tão bem dos animais e me auxiliarem no laboratório durante esse período.

A UNICAMP e FAPESP pelo apoio estrutural e financeiro para o desenvolvimento dessa pesquisa.

*Erros são, no final das contas,  
fundamentos da verdade. Se um  
homem não sabe o que uma coisa é,  
já é um avanço do conhecimento  
saber o que ela não é (Carl Jung).*

## RESUMO

A obesidade consiste em um importante problema de saúde pública com alta prevalência na população adulta assim como, na população infanto-juvenil. Evidências indicam que a nutrição e o metabolismo materno podem alterar, de forma estável, o fenótipo dos filhos, um fenômeno denominado de “programação fetal”. Pesquisas tem direcionado o foco para o pai, demonstrando que a obesidade paterna, além de aumentar o índice de massa corpórea na infância e na fase adulta, aumenta os riscos de desenvolvimento de co-morbidades relacionadas a esta síndrome. A obesidade e suas co-morbidades podem ser revertidas e, mesmo, evitadas, nos pais e nos filhos com a redução do peso corporal. A cirurgia bariátrica está entre os tratamentos mais eficazes e que oferecem resultados aceitáveis na perda de peso e redução dos riscos provenientes da obesidade. Dentre os procedimentos cirúrgicos, a derivação gástrica em Y de Roux (DGYR) é uma das técnicas mais efetivas para o tratamento de pacientes obesos diabéticos. Porém, até o presente momento, não existem estudos demonstrando se a perda de peso e a melhora metabólica, após cirurgia bariátrica paterna, podem prevenir os efeitos deletérios da obesidade sobre parâmetros metabólicos dos filhos. Dessa forma o objetivo do nosso trabalho foi avaliar o efeito da cirurgia bariátrica DGYR paterna sobre o fígado dos filhotes aos 30 dias de vida. Para isso, ratos Wistar, com 60 dias de idade, receberam dieta de cafeteria (CAF) por 10 semanas e então foram submetidos à cirurgia DGYR (CAF DGYR) ou pseudo-cirurgia (CAF PC). Após 10 semanas de cirurgia, os machos cruzaram com fêmeas controle para a obtenção dos filhotes. Durante a eutanásia, o sangue foi coletado para analisar a glicemia, insulinemia, trigliceridemia e colesterolemia de jejum. Além disso, fragmentos do fígado foram retirados para realizar análise do acúmulo de lipídios hepático, expressão gênica, e análise histológica do tecido. A prole (apenas machos) foi alimentada com uma dieta controle e eutanasiada com 30 dias de vida, sendo então realizada as mesmas análises descritas acima. Como já está descrito na literatura, nos pais, a cirurgia bariátrica foi eficaz em reduzir o peso corporal dos animais bem como o acúmulo de gordura corporal, além do consumo alimentar. Além disso, a cirurgia bariátrica melhorou o acúmulo hepático de gordura e diminuiu a expressão de genes relacionado com o processo de lipogênese *de novo*.



Surpreendentemente, os filhotes dos pais submetidos à DGYR aos 30 dias de vida, apesar de apresentarem maior peso corporal, mostraram menor triglicerídeos e colesterol sérico e hepático quando comparados aos filhotes de pais submetidos a PC. Em conclusão filhotes de pais submetidos à cirurgia bariátrica DGYR, aos 30 dias de vida, apresentam melhora no metabolismo lipídico hepático.

## ABSTRACT

Obesity is an important public health problem with high prevalence in adult as well as young people. Alterations in maternal nutrition and metabolism can affect the offspring in a stable way, a phenomenon defined as fetal programming. It is also demonstrated that paternal obesity also increases the risk to develop co morbidities, related to this syndrome, in the offspring. Obesity and co-morbidities can be reverted and also avoided with the reduction of body weight. Bariatric surgery is one of the most powerful treatments of these problems since they are able to induce weight loss, reducing the risk derived from obesity. Among the bariatric surgeries, the Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) is the gold standard technique for the treatment of obese diabetic patients. However, it was not demonstrated, until now, if the weight loss and the metabolic amelioration, observed after such a paternal surgery, may prevent the deleterious effects upon metabolic parameters in the offspring. Here, we analyzed the effects of the paternal bariatric surgery (DGYR) on liver parameters of offspring aged 1 month. For this purpose, 2 months old male Wistar rats received cafeteria diet (CAF) for 10 weeks. Then, they are subjected to surgery DGYR (CAF DGYR group) or pseudo-surgery (CAF PC group). After 10 weeks, males of both groups mate with control female (fed with standard diet). At euthanasia's day of the rats blood samples were collected for measurement of fast glycemia, insulinemia, triglyceridemia and cholesterolemia. In addition, liver fragments were collected for the analysis of lipid content, genic expression and histology. Males' offspring were feed a control diet and euthanized at 1 month of age. The same parameters described above were measured in the offspring. In the father, the bariatric surgery reduced body weight, fat accumulation and food intake, confirming data from literature. In addition, liver fat accumulation and the expression of genes related to "*de novo*" lipogenesis were reduced. At 1 month of age, the offspring from fathers subjected to DGYR displayed lower concentrations of serum and hepatic triglycerides and cholesterol, although they present higher body weight, compared with offspring of the PC group.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Derivação Gástrica em Y de *Roux*. Retirado de Dixon *et al.*, 2012..... 19

Figura 02 – Esquema dos fatores de transcrição e dos genes relacionados com o processo de lipogênese e beta-oxidação.....21

### Artigo

Figure 1- Photomicrographs of liver transverse section, hematoxylin and eosin staining. CAF-SHAM group (A) and CAF-RYGB group (B). Table with steatosis degree: 0 , none to 5 % of hepatocytes affected; 1 , > 5 % to 30% affected; 2 , > 30 % to 60 % affected ; and 3, > 60% affected (C). Liver weight (D), hepatic triglycerides (E), cholesterol (F); hepatic gene expression of mRNA of *Lpk*, *Acc*, *Fasn*, *Scd-1*, *Aco* and *Mttp* (G) and of transcription factors *Chrebp*, *Srebp-1c*, *Ppar-γ*, *Ppar-α* e *Fxr* (G) of CAF-SHAM and CAF-RYGB rats. The \* symbol indicates significant difference between groups. T student test (P < 0.05), n=6-14.....38

Figure 2 – Body weight of offsprings with 4 and 30 days of life (A) and retroperitoneal and perigonadal fat pads (B) of CAF-SHAM-F1 and CAF-RYGB-F1 with 30 days of life. The \* symbol indicates significant difference between groups. T student test (P < 0.05), n=6-10.....39

Figure 3 – Photomicrographs of liver transverse section, hematoxylin and eosin staining. CAF-SHAM-F1 (A) and CAF-RYGB-F1 (B) rats with 30 days of life. Table with steatosis degree: 0 , none to 5 % of hepatocytes affected; 1 , > 5 % to 30% affected; 2 , > 30 % to 60 % affected ; and 3, > 60% affected (C). Hepatic triglycerides (C) and cholesterol (D) content. The \* symbol indicates significant difference between groups. T student test (P < 0.05), n=4-8.....40

Figure 4 - Hepatic gene expression of mRNA of *Lpk*, *Acc*, *Fasn*, *Scd-1*, *Aco* and *Mttp* (A) and of transcription factors *Chrebp*, *Srebp-1c*, *Ppar-γ*, *Ppar-α* e *Fxr* (B) of CAF-SHAM-F1 and CAF-RYGB-F1 rats with 30 days of life. The \* symbol indicates significant difference between groups. T student test (P < 0.05), n=7-9.....41

Figure 5- Outline of the CpG islands detected in *Fasn* (A) and overall methylation degree in liver (B) of CAF-SHAM-F1 and CAF-RYGB-F1 rats with 30 days of life. The \* symbol indicates significant difference between groups. T student test (P < 0.05), n=6-7.....42

Figure S1 – Weekly preoperative body weight of father from CTL and CAF groups. The \* symbol indicates significant difference between groups. T student test (P < 0.05), n=6-14.....43

Figure S2 – Fasting triglycerides (A) and cholesterol (B); hepatic triglycerides (C) and cholesterol (D); and hepatic gene expression of mRNA of *Lpk*, *Acc*, *Fasn*, *Scd-1*, *Aco* and *Mttp* (E) and of transcription factors *Chrebp*, *Srebp-1c*, *Ppar-γ*, *Ppar-α* e *Fxr* (F) of CAF-SHAM-F1 and CAF-RYGB-F1 rats with 90 days of life. The \* symbol indicates significant difference between groups. T student test (P < 0.05), n=6-8.....44

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO

**Table 1** – Primer sequences for real-time qPCR assays.....35

**Table 2:** Body features and fasting serum parameter of CAF-SHAM and CAF-RYGB rat fathers with 90 days of postoperative.....36

**Table 3:** Fasting serum parameters of CAF-SHAM-F1 and CAF-RYGB-F1 rats with 30 days of life.....37

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	Acetil-CoA-carboxilase
ACO	Acetil-CoA-oxidase
AG	Ácidos graxos
AGCL	Ácidos graxos de cadeia longa
ATP	Adenosina trifosfato
BPD	Derivação bilio-pancreática
COL	Colesterol
CPT	Carnitina palmitoil-transferase
DGYR	Derivação gástrica em Y de Roux
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoolica
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
FAS	Ácido graxo sintetase
GIP	Polipeptídeo inibidor gástrico
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon
GVS	Gastrectomia vertical em sleeve
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPK	Piruvato quinase hepática
MTTP	Enzima de transferência de triglicerídeos microssomal
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
OMS	Organização Mundial de Saúde

PYY	Peptídeo YY
SCD-1	Estearoil-CoA-desaturase
TA	Tecido adiposo
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
TG	Triacilglicerol
VIGITEL	Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico
VLDL	Lipoproteínas de densidade muito baixa

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>08</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>13</b>
<b>LISTA DE ABREVIACOES.....</b>	<b>14</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1 Obesidade e programaco metabólica.....	17
1.2 Cirurgia bariátrica.....	18
1.3 Metabolismo hepático e doenças associadas.....	21
1.4 Modelos experimentais de obesidade animal e dieta de cafeteria.....	23
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
2.1 Objetivos Específicos.....	25
<b>3. ARTIGO.....</b>	<b>26</b>
Abstract.....	27
Introduction.....	28
Material and Methods.....	29
Results.....	32
Discussion.....	34
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>54</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Obesidade e programação metabólica

O crescimento da obesidade e das co-morbidades associadas a essa doença, tem sido objeto de estudos da comunidade científica em busca de um tratamento efetivo para tais doenças. Nas últimas décadas, a obesidade alcançou proporções alarmantes, acometendo indivíduos de todas as idades. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2014 em todo o mundo, cerca de 1,9 bilhões de adultos com 18 anos ou mais apresentavam sobrepeso, e mais de 600 milhões eram obesos. No Brasil, de acordo com informações do VIGITEL (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), fornecidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2016, o excesso de peso na população brasileira foi de 53,8%, sendo 57,7% homens e 50,5% mulheres. A obesidade, por sua vez, atingiu 18,9% do total da população, sendo esse mesmo valor para ambos os sexos.

Ainda de acordo com a OMS, o sobrepeso e a obesidade são definidos como acúmulo excessivo de gordura que pode prejudicar a saúde. A obesidade aumenta o risco de desenvolvimento de problemas de saúde tais como alterações cardiovasculares, diabetes mellitus (DM) tipo 2, osteoartrite, alguns tipos de câncer, como o de endométrio e o de fígado, desordens metabólicas (Mayes e Watson, 2004) bem como, alterações nas funções reprodutivas.

Insultos paternos preconcepção, tais como, exposição a toxinas e produtos químicos, o uso de medicamentos, infecções, e o “status” nutricional, como a obesidade, afetam o risco de desenvolvimento de doenças na prole (Soubry *et al.*, 2013). Figueroa-Colon e colaboradores (2000) demonstraram pela primeira vez em humanos que a composição corporal do pai pode alterar a prole, aumentando a gordura corporal nesta. Estudos também mostram que a obesidade paterna reduz o estabelecimento da gestação (Bakos *et al.*, 2011; Mitchell *et al.*, 2011), aumenta o índice de massa corporal na criança (Danielzik *et al.*, 2002), bem como sua susceptibilidade a adoecer durante a vida (Fullston *et al.*, 2012; Fullston *et al.*, 2013). Ng e colaboradores (2010) demonstraram que filhotes fêmeas de ratos obesos por dieta hiperlipídica apresentam

intolerância à glicose, redução da secreção de insulina e alteração da expressão gênica em ilhotas pancreáticas, ligada a diminuição da metilação do fator *IL12ra2* que modula o crescimento de várias linhagens pancreáticas de câncer e é parte da via de sinalização da leptina.

Atualmente, é aceito que as alterações biológicas derivadas de condições como a obesidade, estão associadas com modificações epigenéticas, as quais incluem metilação do DNA, modificações nas histonas e na transcrição de RNAs não-codificantes (Marmo *et al.*, 1994; Waterland e Jirtle, 2003). Lane e colaboradores (2014) demonstraram que a indução de estresse oxidativo no espermatozoide de ratos causou, provavelmente, dano oxidativo no genoma/epigenoma do espermatozoide, o que, conseqüentemente, reduziu as taxas de pré-implantação embrionária e provocou alteração no blastocisto. Isso resultou do crescimento fetal, além de aumento na adiposidade, diminuição da massa magra e redução da tolerância à glicose em filhotes fêmea.

### **1.2 Cirurgia Bariátrica**

Dentre as várias opções em se tratar a obesidade e suas doenças relacionadas, a cirurgia bariátrica tem sido, por muitas vezes, o tratamento de primeira escolha (Buchwald *et al.*, 2004; Christou *et al.*, 2004). De acordo com Rubino *et al.* (2010), os procedimentos bariátricos são classificados em três categorias em relação ao seu mecanismo de ação que objetiva o emagrecimento: 1) cirurgia disabsortiva, na qual menor quantidade de nutrientes são absorvidos no intestino; 2) cirurgia restritiva, onde é restringida a ingestão dos alimentos, levando de forma precoce à saciedade e 3) cirurgia mista, onde ambos mecanismos fisiológicos estão associados ao final do procedimento cirúrgico, ou seja: a menor ingestão de alimentos e a menor absorção de nutrientes.

Existem vários tipos de cirurgias bariátricas e, alguns autores, como Mingrone *et al.* (2012), relatam que dois tipos são mais efetivos no controle glicêmico: a derivação gástrica em Y de *Roux* (DGYR) e a derivação bilio-pancreática (BPD). Buchwald *et al.* (2004) apontam que a primeira modalidade resulta em uma melhora de 84% na homeostase glicêmica dos pacientes com DM2, enquanto a segunda pode chegar a uma melhora de 98%. Além disso, já

foi comprovado que a DGYR também é eficaz em pacientes não obesos com DM2 (Cohen *et al.*, 2006). Entre outros efeitos, a cirurgia de DGYR reduz a hiperglicemia e, frequentemente, causa a remissão do diabetes em pacientes com obesidade mórbida e DM2, com aumento da sensibilidade à insulina e da função da célula beta (Anderwald *et al.*, 2012).

Existem algumas hipóteses para tentar explicar a melhora da homeostase glicêmica pelas cirurgias bariátricas. A *foregut hypothesis*, propõe que, após a exclusão do intestino proximal do trânsito alimentar, fatores anti-incretinas desconhecidos teriam sua produção diminuída. Esses fatores possuiriam efeitos contrários aos das incretinas secretadas pelo duodeno, jejuno e íleo, entre eles o Peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1), o Polipeptídeo inibidor gástrico (GIP) e o Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) que, sabidamente, estimulam a secreção de insulina e possuem efeitos anti-apoptóticos sobre as células  $\beta$  pancreáticas (Rubino e Gagner, 2002; Rubino *et al.*, 2006; Dixon *et al.*, 2012). Outra hipótese amplamente difundida, a *hindgut hypothesis*, sugere que a exclusão do segmento do intestino proximal faz com que haja menor absorção de nutrientes dos alimentos ingeridos, aumentando dessa forma a secreção de GLP-1 e Peptídeo YY (PYY), resultando em uma melhora da homeostase da glicose (Wang *et al.*, 2008; Thaler e Cummings, 2009).

Há controvérsias na literatura sobre o efeito das cirurgias bariátricas sobre o perfil lipídico. Em 2005 foi demonstrado que indivíduos com obesidade mórbida, submetidos à DGYR reduziram as concentrações plasmáticas de triacilglicerol (TG), colesterol total (COL) e LDL-COL no período de seis e doze meses após a cirurgia. (Holdstock *et al.*, 2005). Em relação à gastrectomia vertical em *sleeve* (GVS), pacientes obesos apresentaram redução na concentração de TG, um mês após a cirurgia, mantendo-se esta redução aos três e seis meses. O COL total e o LDL-COL foram reduzidos somente aos três meses pós-cirurgia e, o HDL-COL não foi alterado (Hady *et al.*, 2012). Outro estudo utilizando-se da GVS, em mulheres obesas, demonstrou redução na concentração de TG seis meses após o procedimento cirúrgico, sem alterar a concentração do LDL-COL (Bužga *et al.*, 2013). Em ratos obesos, a GVS reduziu a concentração plasmática em jejum de fosfolípidios, TG e COL no 50º dia de pós-operatório. (Stefater *et al.*, 2011).

Poucos estudos têm associado o efeito da cirurgia bariátrica sobre a perda de peso e a melhora metabólica, com a possível prevenção dos efeitos deletérios da obesidade sobre parâmetros metabólicos dos filhos. Estudos demonstraram que crianças nascidas, após cirurgia bariátrica materna de derivação biliopancreática (DBP), exibem menor peso corporal, maior sensibilidade à insulina e melhora no perfil lipídico quando comparadas com os irmãos que nasceram antes do procedimento cirúrgico materno (Kral *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2009). Guénard e colaboradores (2013) encontraram superexpressão e metilação gênica diferencial em cinco vias imunes e inflamatórias, em crianças nascidas após cirurgia bariátrica materna de DBP, em relação aos irmãos nascidos antes do procedimento cirúrgico materno, sugerindo melhora nos marcadores cardiometabólicos. Ratas obesas por dieta hiperlipídica, submetidas à GVS, procedimento restritivo, tiveram prole com redução do peso e do tamanho ao nascer em relação à prole de mães alimentadas com dieta normocalórica. Quando a dieta hiperlipídica foi mantida até a puberdade, verificou-se que os animais nascidos de mães submetidas à GVS apresentaram propensão ao desenvolvimento de intolerância à glicose e aumento da adiposidade, comparada aos animais de mães controles (Grayson *et al.*, 2013). Contudo, ainda não há relato na literatura sobre o efeito da cirurgia bariátrica paterna na prole.

A escolha do procedimento bariátrico misto de DGYR para a execução desse trabalho se deu pois a mesma foi considerada o procedimento bariátrico "padrão-ouro" por três décadas e ainda obtem esse título no dia de hoje. Além disso, o sucesso que apresenta sobre a perda de peso e baixa morbidade com melhor qualidade de vida assegurou o seu uso contínuo na atualidade (Ashrafian *et al.*, 2010). Além disso, utilizamos também apenas os filhotes machos, embasados em alguns estudos que tem utilizado apenas esse gênero para análises epigenéticas (Zhang *et al.*, 2017).



**Figura 01-** Derivação Gástrica em Y de Roux. Retirado de Dixon *et al.*, 2012.

### **1.3 Metabolismo lipídico hepático e doenças associadas**

Após a digestão dos alimentos, os metabólitos são encaminhados para o fígado através do sistema porta-hepático. A glicose é transportada para os hepatócitos através dos transportadores GLUT2 e fosforilada pela enzima G6P gerando glicose-6-fosfato (G6P). A G6P é convertida em glicose-1-fosfato (G1P) que é adicionada às cadeias de glicogênio através da enzima glicogênio sintase (Rui, 2014). Quando a capacidade de armazenamento de glicogênio no fígado é alcançada, o excesso de glicose é direcionado para síntese de ácidos graxos (AG), processo conhecido como lipogênese *de novo* hepática.

Na lipogênese *de novo* a glicose é encaminhada para o fluxo glicolítico gerando gliceraldeído-3-fosfato (G3P), fosfoenolpiruvato e piruvato, o último por sua vez é oxidado e gera acetil-CoA o qual através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) na mitocôndria, gera citrato. Após ser transportado para o citoplasma o citrato é convertido em Acetil-CoA em que através da ação da enzima acetil-CoA-carboxilase (ACC) transforma acetil-CoA em malonil-CoA, que por sua vez é transformado em ácido palmítico, através da enzima ácido graxo sintetase (FAS). O ácido palmítico é então dessaturado pela enzima esteroil-CoA-desaturase (SCD-1) formando AG insaturados (Fabbrini *et al.*, 2010; Bechmann *et al.*, 2012; Kawano e Cohen, 2013), que esterificados com o

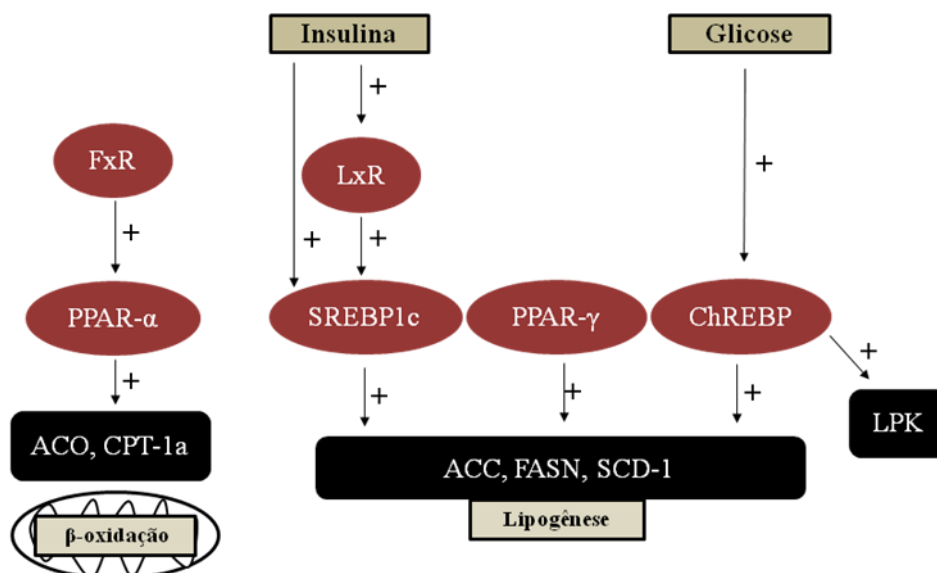
G3P formam TG, que em condições fisiológicas normais, são transportados para o tecido adiposo (TA).

Os TG hepáticos, provenientes da dieta ou da síntese *de novo*, são transportados ao TA pelas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) que são ricas em apoproteína denominada de apoB (Hussain *et al.*, 2011). A enzima de transferência de triglicerídeos microsomal (MTTP), no retículo endoplasmático, transfere fosfolipídios, TG, COL livre e ésteres de COL para a apo B durante o processo de translação dando origem a uma molécula de pré-VLDL. Então, essa molécula se une com o MTTP e forma o VLDL maduro que é secretado pelo fígado (Sparks e Sparks, 2008). A MTTP pode ser regulada por hormônios e macronutrientes, ocorrendo em níveis transcricionais, pós-transcricionais e pós-translacionais (Hussain *et al.*, 2011).

Para manter a quantidade de ATP necessária o fígado utiliza ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) (Murthy e Pande, 1994), através da beta-oxidação, que pode ocorrer via mitocondrial ou peroxissomal (Lima *et al.*, 2005). Na beta-oxidação peroxissômica a enzima acil-CoA-oxidase (ACO) catalisa as primeiras etapas desse processo (Wanders, 2004), enquanto que na oxidação mitocondrial, o complexo enzimático denominado de carnitina palmitoil-transferase (CPT), é ativado para que os AG atravessem a membrana da mitocôndria. Esse complexo é formado por duas proteínas (CPTI e CPT II) e conduz os AGCL pelas membranas da mitocôndria para serem encaminhados à beta-oxidação (Lira *et al.*, 2010). Durante a formação de AG através da ação da ACC o malonil-CoA gerado pode inibir o sítio de ligação da CPTI impedindo assim a beta-oxidação (Witters *et al.*, 1988).

Alterações nos processos descritos acima podem levar a um acúmulo de TG no citoplasma dos hepatócitos. Isso pode ocorrer devido as seguintes situações: aumento da absorção de AG da circulação, que são provenientes de uma dieta altamente calórica ou da lipólise do tecido adiposo; síntese *de novo* AG pela ativação da via lipogênica; diminuição da beta-oxidação de AG; e diminuição da secreção hepática de VLDL (Berlenga *et al.*, 2014). O excesso de gordura hepática em indivíduos que não apresentam histórico de consumo abusivo de álcool caracteriza a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (Ângulo, 2002). O indivíduo que possui DHGNA pode apresentar desde simples esteatose hepática, caracterizada pelo acúmulo de gordura, até uma esteato-hepatite

(EHNA), onde além do acúmulo de gordura, há a presença de inflamação e degeneração hepatocelular, que pode estar acompanhada do aparecimento de fibrose podendo evoluir para a cirrose hepática ou carcinoma hepatocelular (Cohen *et al.*, 2011).



**Figura 02-** Esquema dos fatores de transcrição e dos genes relacionados com o processo de lipogênese e beta-oxidação. Fonte: SOARES, G. M. Adaptado de BERLANGA *et al.*, 2014.

#### **1.4 Modelos de obesidade animal**

São utilizados vários modelos experimentais animais na tentativa de compreender a fisiopatologia da obesidade e da DM2. Dentre os diferentes modelos encontram-se os oriundos de linhagens genéticas, provocadas por mutações autossômicas recessivas (ratos Zucker *fa/fa*, camundongos *ob/ob*) bem como, camundongos transgênicos e *knockouts* para determinados genes específicos, roedores submetidos a lesões eletrolítica no hipotálamo ventromedial e lesões químicas em regiões hipotalâmicas por drogas específicas como o glutamato monossódico, e por consumo de dieta hiperlipídica e/ou hipercalórica (Bray e York, 1979).

Dentre os modelos de dietas experimentais para roedores, utilizados em laboratórios, a “dieta de cafeteria” ou “dieta ocidentalizada”, é o modelo que mais fielmente assemelha-se a grande variedade de alimentos relacionados à pandemia da obesidade na sociedade ocidental. A dieta de cafeteria promove hiperfagia voluntária, resulta em rápido ganho de peso, aumento da massa de

gordura e gera parâmetros pré-diabéticos tais como perda da homeostase glicêmica e intolerância à insulina (Brandt *et al.*, 2010; Sampey *et al.*, 2011; Castell-Auví *et al.*, 2012). Em 15 semanas de dieta de cafeteria essas alterações podem ser evidenciadas em ratos *Wistar* (Duarte *et al.*, 2006), além de gerar adipogênese e inflamação e aumentar as concentrações plasmáticas de insulina e glicose devido aos efeitos crônicos do teor elevado de gordura sobre o pâncreas (Castell-Auví *et al.*, 2012). A composição da dieta de cafeteria que utilizamos em nosso estudo encontra-se na seção apêndice.

Considerando que já existem estudos demonstrando a efetividade da DGYR em alterar condições metabólicas associadas com a obesidade e que não há relato mostrando se os efeitos desta cirurgia bariátrica no pai podem influenciar a homeostase lipídica na prole, neste estudo buscou-se elucidar os efeitos desse procedimento cirúrgico sobre o fígado dos filhotes de animais obesos pela dieta de cafeteria. Ademais é importante ressaltar que diante de diversos estudos existentes na literatura atualmente, relacionados com a metodologia epigenética, decidimos



## 2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da Derivação Gástrica em Y de *Roux* (DGYR) paterna sobre o fígado de seus filhotes machos de 1ª geração.

### 2.1. Objetivos específicos:

Investigar se os efeitos benéficos da cirurgia DGYR sobre a homeostase lipídica observados em ratos machos obesos são passados para a prole destes ratos. Desta forma, investigamos nos filhotes machos destes ratos, aos 30 dias de vida:

- parâmetros para avaliação de obesidade como: ganho de peso corporal, peso do tecido adiposo perigonadal e retroperitoneal e, Índice de Lee;
- a lipídemia e a deposição de gordura hepática avaliando se há micro ou macroesteatose e presença de infiltrado inflamatórios (avaliação histológica);
- a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas com a lipogênese *de novo* e com a beta-oxidação como *Acc*, *Fasn*, *Scd-1* e *Srbp1c* (RT-real time PCR);
- a metilação do DNA do gene *Fasn* no fígado da prole aos 30 dias de vida.

### 3. ARTIGO

#### **PATERNAL ROUX-EN-Y GASTRIC BYPASS PREVENTS FAT ACCUMULATION ON LIVER OF MALE OFFSPRING**

Mariana Carla Mendes Brandão<sup>1</sup>, Fernanda Soares da Silva Morita<sup>2</sup>; Emerielle  
Cristine Vanzela<sup>1</sup>, Maria Lúcia Bonfleur<sup>2</sup>, Allan Cezar de Freitas Araújo<sup>2</sup>,  
Antonio Carlos Boschiero<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University  
of Campinas, Campinas, SP.

<sup>2</sup>State University of Western Paraná (UNIOESTE) – Cascavel –Paraná – Brazil

**\*Correspondence author:**

Antonio Carlos Boschiero

Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University  
of Campinas (UNICAMP), Monteiro Lobato Street, 13083-970, Campinas, SP,  
Brazil.

Email: boschero@unicamp.br

**Grants, sponsors, and funding sources:** This study was supported by grants  
from Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP); Conselho  
Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and  
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**Abstract**

*Aims:* Obesity is a severe condition, generally associated with other metabolic diseases, which can be transferred to next generations. Bariatric surgery is used to correct this problem but, until now, the effects of father's bariatric surgery on offspring are unknown. Here, we analyze the effects of bariatric surgery RYGB on liver of obese fathers and their offspring.

*Methods:* After 10 weeks of western diet (WD) adult rats were submitted to sham (CAF-SHAM) or duodenal-jejunal bypass (CAF-RYGB). Body weight, fat pad depots, glycemia, insulinemia, lipids profile and hepatic features were measured three months after surgery. Before euthanasia, the male rats were mated to control female, and the parameters listed above was also measured in male offspring with 30 days of life, further the DNA methylation analysis.

*Results:* As expected, RYGB surgery reduced hyperglycemia, hyperinsulinemia and fat content in the liver of fathers. Paternal bariatric surgery was efficient to reduce the triglyceridemia and cholesterolemia in the pups, at 30 days of life. In addition, these pups presented a reduction in hepatic fat content as well as decreased gene expression of the lipogenic enzymes ACC and FASN. The methylation levels of *Fasn* was higher in CAF-RYGB-F1 pups compared to CAF-SHAM-F1 group.

*Conclusion:* We demonstrated, for the first time, that paternal bariatric surgery is efficient to normalize liver parameters in offspring with 30 days of life.

*Key Words:* obesity; bariatric surgery; NAFLD; epigenetic.

## Introduction

Obesity is associated with several comorbidities such as Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), which is defined as a pathologic accumulation of triglycerides (TG) within hepatocytes in the absence of significant alcohol consumption (Adams *et al.*, 2005). Nowadays, in developed countries, the NAFLD is the most common cause of chronic liver disease (Podrini *et al.*, 2013) and it is expected that in the next decade NAFLD, together with another hepatic disorders, such as cirrhosis and cancer, could be the most common indication for liver transplantation (Anstee *et al.*, 2013).

The cafeteria diet- or western diet (WD) is an experimental rodent diet model that more accurately reflects the variety of highly palatable, energy dense foods that are prevalent in Western society and associated with the current obesity pandemic. The cafeteria diet promotes voluntary hyperphagia, resulting in rapid weight gain, increased fat mass, and lipid accumulation on liver (Brandt *et al.*, 2010; Sampey *et al.*, 2011; Castell-Auví *et al.*, 2012).

Weight loss is the best treatment for NAFLD, however change in life style and adherence to exercise practice, as well as the use of some drugs are not always effective. Nowadays, there are a few surgical procedures effective to treat obesity and its comorbidities. Among these, the Roux-en-Y Gastric Bypass (RYGB) is considered a gold stand bariatric/metabolic procedure that improves glycemic profile, insulin resistance, adiposity, and lipid accumulation in the liver (Holdstock *et al.*, 2005; Stefater *et al.*, 2011; Ebertz *et al.*, 2014).

Paternal insults preconception, such as: toxin exposure; drugs; infections and, the nutritional status, like obesity, increase the risk of development of offspring's disease (Soubry *et al.*, 2013). It was demonstrated that in humans the father's body composition can alter several features in children (Figueroa-Colon *et al.*, 2000). The paternal obesity increases the body mass index in children (Danielzik *et al.*, 2002), as well as their susceptibility to diseases during the adult life (Fullston *et al.*, 2012; Fullston *et al.*, 2013).

In this way, the aim of this study was to analyze the effects of bariatric surgery RYGB on liver offspring's of obese fathers.

## Materials and Methods

### *Experimental Groups*

All experiments were approved by the UNICAMP's Committee on Ethics in Animal Experimentation (certificate n<sup>o</sup>.: 3756-1). Male *Wistar* rats (aged 8 weeks) received a standard rodent chow (CTL group) or Western Diet (WD) and soft drink *ad libitum*. The control group was used just to verify the effectiveness of western diet to obesity development, and then we used just the cafeteria groups to the analysis. In this way, after 10 weeks of WD, the rats were divided into two groups: Cafeteria diet rats submitted to sham operation (CAF-SHAM), and cafeteria diet rats which were submitted to Roux-en-Y Gastric Bypass (CAF-RYGB). The rats were housed in standard cages and maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on 07:00–19:00 h) and controlled temperature (22±1°C). After 12 postoperative weeks, rats of both groups were mated with lean virgin female rats, and 10 days after the father were euthanized and their tissues were collect for analysis. After birth, the pups were kept in number of 6 in the cage during the breastfeeding period and their mothers were fed with standard diet. Weaning was performed until 21 days of age and the male offspring (1st generation- F1) were separated according to the parents' treatment in two groups: 1) CAF-SHAM-F1 and 2) CAF-RYGB-F1. Rats from both groups continued to receive standard diet and water *ad libitum* throughout the experimental period. The rats were sacrificed at 30 days of age and the tissues were collected for analysis.

### *Roux-en-Y Gastric Bypass and SHAM Operations*

Preoperative procedures were performed as previously described by Meguid et al (2004). Briefly, stomach was sectioned forming a gastric pouch corresponding to a volume of 5% of the total stomach volume. After, one gastroduodenal transection tied back duodenal stump was performed. After the jejunum was divided at a distance of 10 cm distal to the ligament of Treitz, and its distal end connected to the stomach (gastrojejunostomy). The proximal stump was reunited end-to-side, at a distance of 15 cm distal of the gastrojejunostomy, called jejunojejunostomia. For the SHAM surgery was performed an exploratory laparotomy, making the movement of the intestines to

mimic the surgical movements with posterior suture. Seven days after operation, both groups received a liquid high-energy diet.

#### *Obesity parameters*

At euthanasia's day the rats were weighed and after euthanasia, the retroperitoneal and perigonadal fat were removed and weighed. The result was expressed as percentage of body weight.

#### *Serum biochemical analysis*

After 8 hours of fasting, tail blood was collected to measure glucose, using a glucose analyzer (Accu-check® Roche, USA), and after the rats were decapitated. Whole blood was collected and serum was obtained for further evaluation cholesterol (CHOL) concentration and total TG which were performed using commercial kits according to the manufacturer's instructions (Wako®, Germany). The determination of insulin concentration was performed by radioimmunoassay using human insulin radiolabelled with <sup>125</sup>I as tracer, rat insulin as standard (Crystal Chem Inc., USA), and rat insulin antibody.

#### *TG and CHOL content in the liver*

The liver was removed and weighed and fragmented. The lipids were extracted by the Folch method (Folch *et al.*, 1957) and the extract was evaporated and diluted with isopropanol for the determination of liver TG and CHOL levels using commercial kits as described above (Ropelle *et al.*, 2006).

#### *Histology of the liver*

Liver samples were fixed in 10% formalin, embedded in Paraplast (Sigma-Aldrich Chemicals, St. Louis, MO, USA), sectioned at 7 microns cuts and stained with hematoxylin and eosin (H & E) for evaluation of liver histology. Liver histopathology was examined and graded according to the magnitude of steatosis, based on Brunt's classification with modifications (Ebertz *et al.*, 2014) for rodent models. Briefly, steatosis was graded (0-3), as follows: 0, none to 5% of hepatocytes affected; 1, >5% to 30% affected; 2, >30% to 60% affected; and 3, >60% affected.

### *Isolation of RNA and qPCR*

Another fragment of the liver was collected and RNA was extracted using RNA minikit PuriLink® (Life Technologies, CA, USA). The mRNA quantification was performed using the Fast System 7500 & 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) and the amount of expression of each gene was normalized for the internal control RPS-29. The absolute amount of gene expression was calculated by the use of standard curves ( $10^8$ - $10^3$  copies / DNA molecules  $2\mu\text{L}$ ), produced from the gene amplification products on 2% agarose gels. Primers for expression of the genes of interest were designed by us and manufactured by Sigma-Aldrich, MO, USA. The sequences used are shown in Table 1.

### *DNA methylation assay*

Genomic DNA was isolated from liver tissues of puppies with 30 days of life, by a kit (ALLPREP DNA/RNA Mini Kit - Cat. No. 80204, QIAGEN). For bisulfite conversion (Epitect Bisulfite Kit, Cat. No. 59104, QIAGEN)  $2\mu\text{g}$  of DNA was used following a PCR. (AmpliTaq Gold™ 360 Master Mix Cat. No. 4398881, Applied Biosystems). The PCR program consisted of an initial heat activation for 10 min at  $95^\circ\text{C}$ , 40 cycles of 30 seconds at  $95^\circ\text{C}$ , 30 seconds at  $54^\circ\text{C}$ , 1 min  $72^\circ\text{C}$ , and a final extension for 7 min at  $72^\circ\text{C}$ . The reaction mix was electrophoresed on a 2% agarose gel, the amplicon (195 nt) excised, the DNA purified and sequenced (Myleus Biotechnology). Sequences were analyzed with the Sequence Scanner Software 2 (Applied Biosystems). The search of CpG islands and the PCR primers FASN-F (GTTTTAGTGGGAGGATAGG) and FASN-R (CAACTAACCTCTCCAACTAA) for the bisulfite converted sequence was designed by Methyl Primer Software v1.0 (Applied Biosystems). The search for CpG island (CGI) was undertaken in the region of 2 kb at the 5' end of the *Fasn* gene, which can be potentially involved in transcription regulation (GenBank\_NC005109).

### *Statistical analysis*

The data are presented as the means  $\pm$  SEM, and the differences were considered significant when  $p < 0.05$ . Comparisons were performed using

Student's T test using the GraphPad Prism Version 5.00 Software® (San Diego, CA, USA).

## Results

### ***Paternal Results***

#### *Features and Serum Parameters*

As stated in Methods, part of 8 weeks old rats start to receive the cafeteria diet, and the body weight was measured weekly. After six weeks of diet, CAF group presented an increased body weight, compared with CTL group (Supplementary Figure S1 -  $346.4 \pm 8.8$  vs  $372.5 \pm 6.6$ ;  $p < 0.05$ ), and this difference remained until the day of surgical procedure.

After the surgery, the weight of the rats was still measured weekly, and after 4 weeks of postoperative, the RYGB group displayed lower body and retroperitoneal and perigonadal fat pads weights, as well as food intake, compared to CAF-SHAM ( $P < 0.05$ ). On the other hand, the rats of CAF-RYGB group excreted more feces than the CAF-SHAM group (Table 2).

After three months of postoperative, blood samples were collected from 8 hours fasting rats. As expected, the RYGB in obese rats reduced the fasting glucose, insulin, blood triglycerides and cholesterol, compared with SHAM rats ( $P < 0.01$ ; table 2).

#### *TG and CHOL liver content*

The TG and CHOL liver contents were decreased in CAF-RYGB compared with CAF-SHAM rats, whereas the liver weight was similar in both groups (Figure 1 D, E and F). To confirm TG increase in liver we performed tissue histology. In figure 1A, the cytoplasm of hepatocytes of CAF-SHAM group presented vacuolar aspect due to the increase in number and volume of lipids drops, with the nucleus displaced to the periphery of the cell, confirming steatosis. At the contrary, Figure 1B showed a normalization of the cytoplasmic aspects indicating reversion of hepatic steatosis in BCAF-RYGB. These results are confirmed by Brunt's classification (Figure 1C).



### *Gene expression*

The hepatic expression of the lipogenic genes, *Lpk*, *Acc*, *Fasn* and *Scd-1* was lower in CAF-RYGB, compared with CAF-SHAM rats. However, the gene expressions of *Aco*, involved in the  $\beta$ -oxidation process, was higher in rats submitted to bariatric procedure, compared to SHAM group ( $P < 0.001$ , Figure 1G). Furthermore, the mRNA levels of carbohydrate-responsive element-binding protein (*Chrebp*) was 33% higher in the liver of CAF-RYGB, compared with CAF-SHAM rats ( $P < 0.001$ ; Figure 1H). Nevertheless, no alterations in microsomal triglyceride transfer protein (*Mttp*), peroxisome proliferator-activated receptor (*Ppar*) $\alpha$  and  $\gamma$ , sterol regulatory element-binding protein (*Srebp*)-1c, farnesoid X receptor (*Fxr*) mRNA expressions, were noticed in the livers of the CAF-SHAM and CAF-RYGB rats.

### **Offspring (F1) Results**

#### *Animal Features and Serum Parameters*

Body weight of offspring rats was measure once a week, from 4 days of life until the end of the experimental period. The body weight of offspring at 4<sup>th</sup> day of life was not different between groups. However, at 30<sup>th</sup> day of life, the body weight of CAF-RYGB-F1 was significantly higher than CAF-SHAM-F1 rats (Figure 2A). In addition, retroperitoneal fat pad weight was similar between groups, but perigonadal fat pad weight was 60% higher in CAF-RYGB-F1, compared with CAF-SHAM-F1 group (Figure 2B).

Despite their higher body weight, the pups from CAF-RYGB-F1 group presented a decrease of 8%, 60%, 25% and 23% in fasting serum glucose, insulin, triglycerides and cholesterol, respectively, compared to pups from CAF-SHAM-F1 group (Table 3).

#### *TG and CHOL liver content and gene expression*

The liver TG and CHOL content was decreased in CAF-RYGB-F1, compared with CAF-SHAM-F1 rats with 30 days of life (Figure 3 C and D;  $P < 0.002$ ).

We performed liver histology of pups with 30 days of life that demonstrated TG accumulation in hepatocytes of CAF-SHAM-F1, but not, in

CAF-RYGB-F1 pups. The expression of the genes studied in the fathers were also analyzed in pups and we verified that the CAF-RYGB-F1 group showed a decrease in *Acc*, *Fasn*, *Chrebp* and *Ppar-γ*, and an increase of *Aco* and *Mttp* expression, compared with CAF-SHAM-F1 pups aged 30 days (Figure 4 A and B).

#### *DNA Methylation*

DNA methylation is the addition of a methyl group in a cytosine in a clusters of CpGs, called CpG islands, which are often found in association with genes, most often in the promoters and first exons (Jones e Takai, 2001). Methylation of these CpG islands prevents gene transcription through different mechanisms in mammals, process called gene silencing. In our study we analyzed a region of *Fasn* gene that contained two CpG sites (Figure 5A). Methylation levels were higher in CAF-RYGB-F1 pups compared to CAF-SHAM-F1 group with 30 days of life (Figure 5B).

#### **Discussion**

The transgenerational inheritance of acquired metabolic disorders by fathers as well as mothers may contribute to recent obesity pandemic (Shi *et al.*, 2017). In the last years bariatric surgery, besides decrease body weight, was consider a metabolic procedure, due to the improvement of metabolic parameters such as, glycemia, fatty liver, blood pressure and others (Buchwald *et al.*, 2004). Here, we demonstrated that RYGB is an efficient procedure to decrease body weight, serum glucose, triglycerides, cholesterol and insulin, and to improve the lipid accumulation on liver of fathers, corroborating with data from literature (Stylopoulos e Aguirre, 2009; Hao *et al.*, 2017).

Studies in rodents and epidemiological analysis point out that paternal nutritional status can directly affect offspring health. This happens through germ cells, which can propagate in future generations, increasing the risk of disease development in the offspring (Cropley *et al.*, 2016). This is not associated with mutations, but with epigenetic modifications, due to alteration in DNA methylation, histone pattern, and microRNAs. It has been shown that a reprogramming of *let-7c* sperm expression may constitute a mechanism by

which the fat diet can alter the offspring metabolism (De Castro Barbosa *et al.*, 2016).

In this way, it was demonstrated that bariatric surgery in the father alters the epigenetic profiles in spermatozoa of moderately obese men and sperm methylation is altered after DGYR surgery in humans with morbid obesity (Donkin *et al.*, 2016). Pups of mothers submitted to GV presented lower birth weight compared to offspring of obese mothers (Grayson *et al.*, 2013). These results are different from what we found in our study (Figure 2A), indicating that, maybe, the surgery in the father may not influence this parameter. The offspring body weight was measured weekly, and from the fourth week on, CAF-RYGB-F1 pups presented higher body weight than CAF-SHAM-F1 rats.

Recent studies have shown that paternal obesity can significantly alter metabolic outcomes of offspring, making them more susceptible to obesity, diabetes, and fatty liver disease (Ng *et al.*, 2010; Fullston *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2014; Cropley *et al.*, 2016). However, until now there is only one study demonstrating that bariatric surgery can alter the sperm methylation in obese humans (Donkin *et al.*, 2016). In this way we will discuss the pups data based on research wherein the mothers underwent the bariatric procedure.

We demonstrated that CAF-RYGB-F1 group presented a decrease in fasting TG and CHOL levels compared to CAF-SHAM-F1 pups, the same results found to by Grayson *et al* (2013) in pups with 22 days of life. However, this effect was lost at 90 days of age (Figure S2 A and B). Furthermore, in our study we demonstrated a reduction on liver TG accumulation on pups of fathers underwent to the bariatric procedure, compared to pups of SHAM group (Figure 3D).

NAFLD is characterized by an upregulation of hepatic lipogenic enzymes (Grayson *et al.*, 2013) or a reduction in the expression/activity of enzymes involved in  $\beta$ -oxidation or VLDL assembling (Ren *et al.*, 2013; Berlanga *et al.*, 2014; Fukunishi *et al.*, 2014). Father's RYGB surgery led to a reduction in the expressions of the *Acc*, *Fasn* and *Mttp* genes, in pups' liver (Figure 4A). In addition, these pups presented a lower hepatic mRNA content of *Chrebp* and *Ppar- $\gamma$* , transcriptions factors that mediates the transcriptional effect of glucose upon *Lpk* and lipogenic genes. Therefore, the downregulation in *Acc* and *Fasn* mRNAs, induced by the father's RYGB operation, may be linked to a reduction

in *Chrebp* and *Ppar-γ* mRNA. Additionally, father's RYGB surgery was efficient to the *Aco* upregulation, a gene involved in  $\beta$ -oxidation (Figure 4A). All of these modifications may have contributed to the improvement of fat accumulation on liver of CAF-RYGB-F1 pups.

It is well known that DNA methylation controls the transcription of different genes. This process is environmentally flexible and can be altered by specific diets, drugs, age, disease, and other factors (Nowacka-Woszuik *et al.*, 2017). Studies have demonstrated that *Fasn* methylation suggests that this gene is highly susceptible to alterations by diet (Chaplin *et al.*, 2017). In our study we demonstrated that *Fasn gene* could have an important role in the hepatic improvement seen in pups from father underwent bariatric procedure.

In conclusion, we demonstrated for the first time that paternal bariatric surgery is efficient to improve liver parameters in offspring with 30 days of life.

**Table 1** – Primer sequences for real-time qPCR assays.

<b>Gene</b>	<b>Proteína</b>	<b>Forward (5' – 3')</b>	<b>Reverse (5' – 3')</b>
Acac	ACC	AGGAAGATGGTGTCCCGCTCTG	GGGGAGATGTGCTGGGTCAT
Acox1	ACO	CCCAAGACCCAAGAGTTCATTC	TCACGGATAGGGACAACAAAGG
Mlxipl	ChREBP	GAAGACCCAAAGACCAAGATGC	TCTGACAACAAAGCAGGAGGTG
Fasn	FASN	AGGTGCTAGAGGCCCTGCTA	GTGCACAGACACCTTCCCAT
Nr1h4	FxR	GCAACTGCGTGATGGATATG	TTCGCTGTCCTCATTCACTG
Pklr	LPK	GACCCGAAGTTCCAGACAAGG	ATGAGCCCGTCGTCAATGTAG
Mttp	MTTP	CTTCTGCCTACACTGGCTACG	GTTCTCCTCTCCCTCATCTGG
Ppara	PPAR- $\alpha$	GTACGGTGTGTATGAAGCCATCTT	GCCGTACGCGATCAGCAT
Pparg	PPAR- $\gamma$	GCCCTTTGGTGACTTTATGGAG	GCAGCAGGTTGTCTTGGATGT
Scd1	SCD-1	CAGTTCCTACACGACCACCACTA	GGACGGATGTCTTCTTCCAGAT
Srebf1	SREBP-1c	GGAGCCATGGATTGCACATT	AGGAAGGCTTCCAGAGAG
Rps29	RPS-29	TTTTTCCTCCTTGGGCGTCTG	GGTAGACAGTGCAATCATCCATTCA

**Table 2:** Body features and fasting serum parameter of CAF-SHAM and CAF-RYGB rat fathers with 90 days of postoperative.

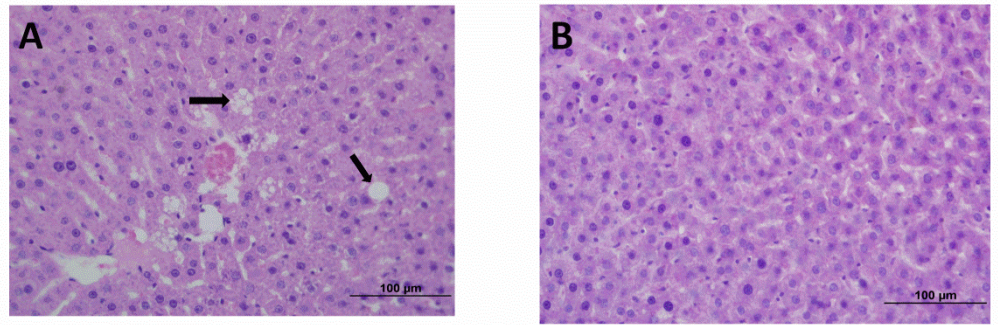
	CAF-SHAM	CAF-RYGB
AUC of body weight	5936,0±105,6	5368,0±154,7*
Final weight (g)	513,0±13,8	446,5±12,6*
Retroperitoneal fat pad (% BW)	2,6±0,1	1,8±0,2*
Perigonadal fat pad (% BW)	2,6±0,2	1,7±0,1*
Food intake(g)/24h	47,4±3,7	30,1±2,3*
Feces production(g)/24h	1,4±0,2	3,5±0,1*
Glucose (mg/dl)	107,3±2,3	88,2±1,3*
Insulin (ng/dl)	2,1±0,2	1,2±0,2*
Triglycerides (mg/dl)	192,2±15,8	74,3±6,4*
Cholesterol (mg/dl)	109,1±7,9	53,3±9,7*

Data are mean ± SEM (n =6-12). The \* symbol indicates significant difference between groups. T student test (P < 0.05).

**Table 3:** Fasting serum parameters of CAF-SHAM-F1 and CAF-RYGB-F1 rats with 30 days of life.

	CAF-SHAM-F1	CAF-RYGB-F1
Glucose (mg/dl)	97,8±2,9	89,4±2,8*
Insulin (ng/dl)	1,5±0,1	0,6±0,1*
Triglycerides (mg/dl)	99,2±8,7	74,9±5,6*
Cholesterol (mg/dl)	92,3±4,0	71,1±3,7*

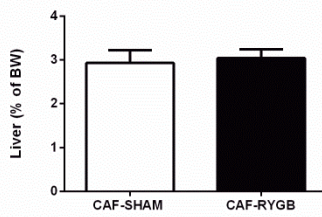
Figure 1



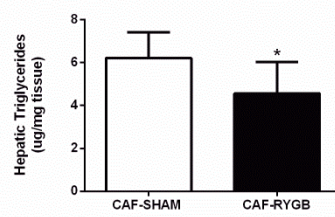
C

GROUPS	LEVEL	LEVEL	LEVEL	LEVEL
	0	1	2	3
CAF-SHAM (n=9)	0	78%	22%	0
CAF-RYGB (n=6)	83%	17%	0	0

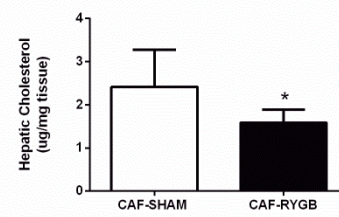
D



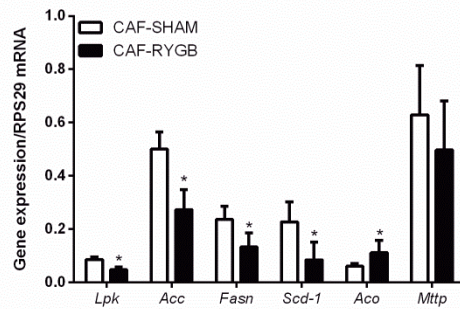
E



F



G



H

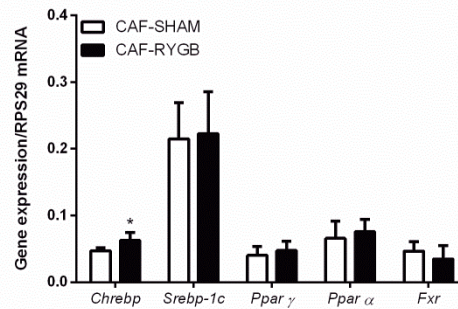




Figure 2

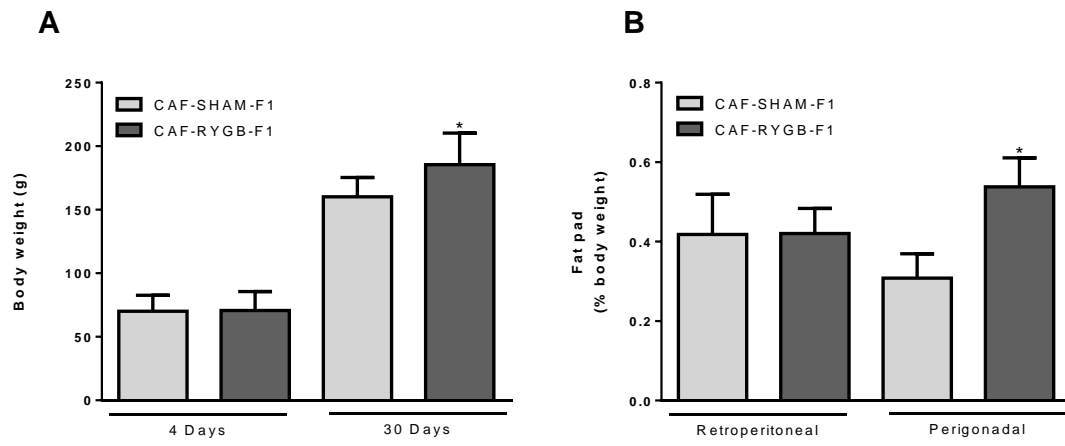
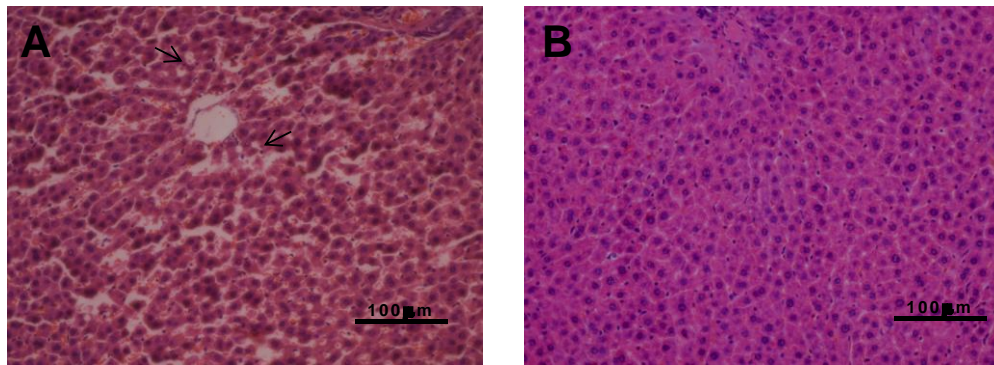


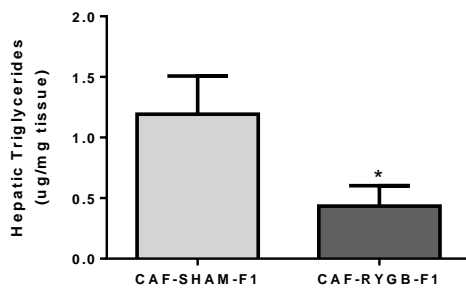
Figure 3



C

GROUPS	LEVEL 0	LEVEL 1	LEVEL 2	LEVEL 3
CAF-SHAM-F1 (n=5)	0	83%	17%	0
CAF-RYGB-F1 (n=5)	77%	23%	0	0

D



E

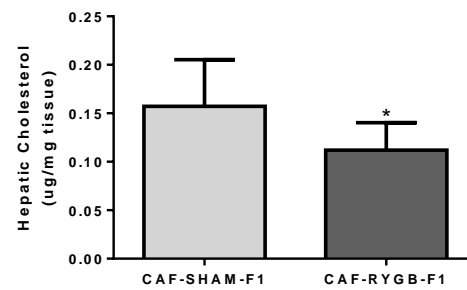


Figure 4

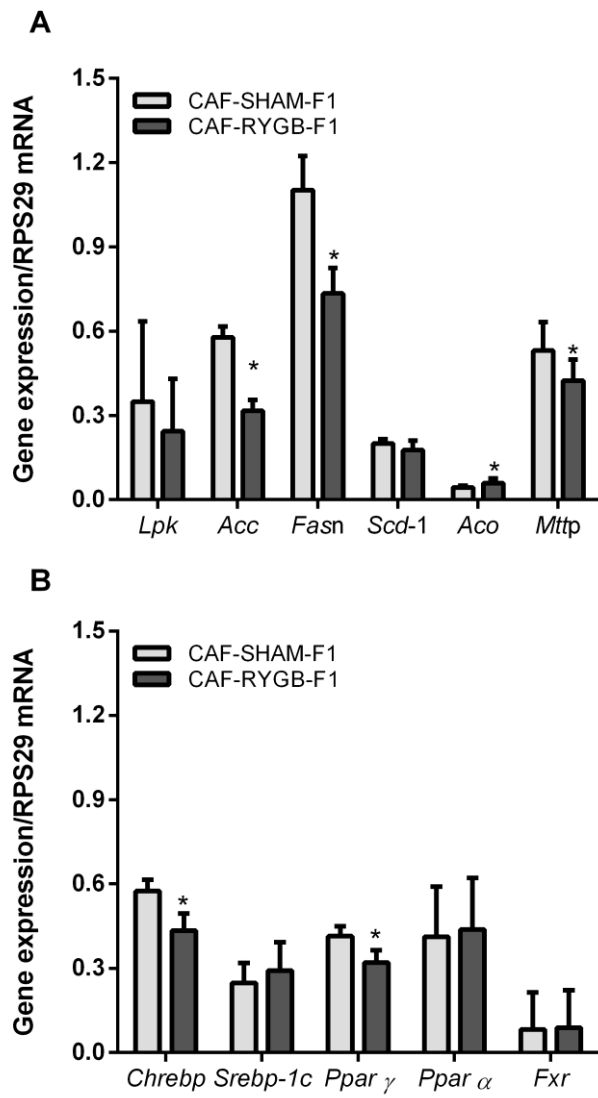


Figure 5

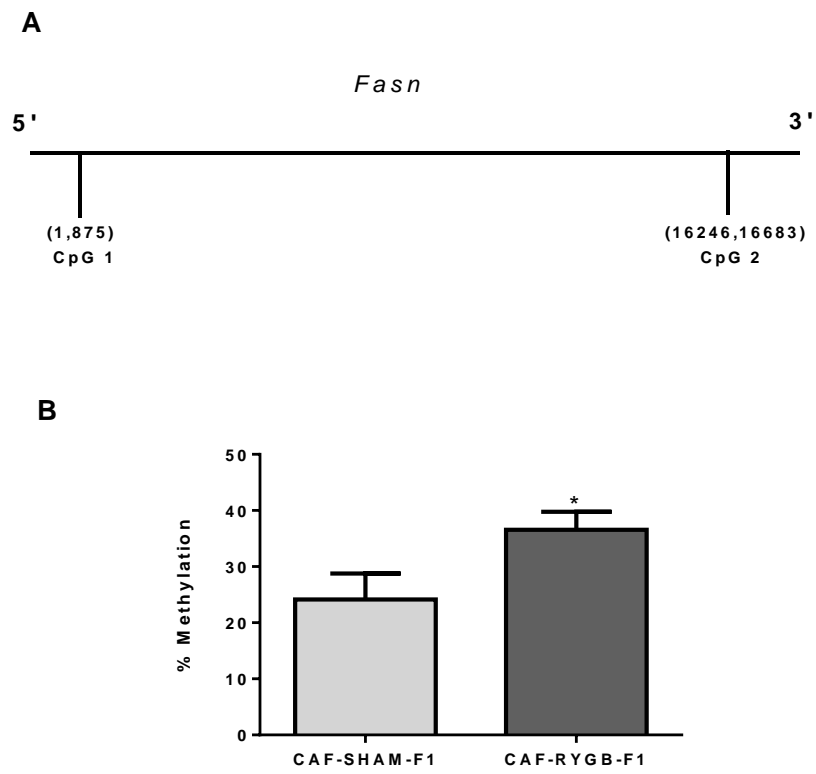
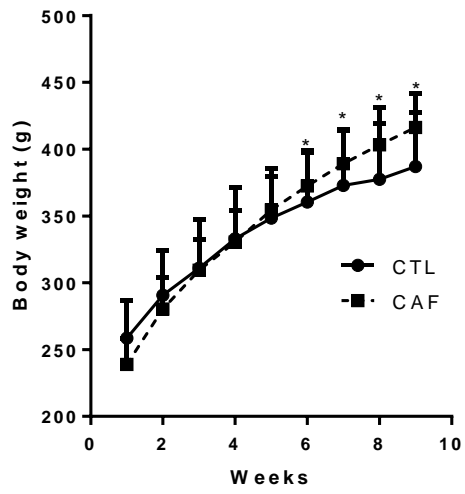


Figure S1



#### 4. Conclusão

- a) Como já demonstrado anteriormente, reafirmamos que a cirurgia bariátrica é eficaz em diminuir o peso corporal, o acúmulo de gordura corporal e hepática em ratos obesos.
- b) Pela primeira vez, demonstramos que a cirurgia bariátrica melhora o acúmulo de gordura hepática nos filhotes aos 30 dias.
- c) A Fasn é uma enzima relacionada com o processo de lipogênese *de novo* hepática, e existem vários estudos demonstrando que a metilação desse gene pode ser modulado por diferentes tipos de dieta, pela primeira vez demonstramos que a cirurgia bariátrica paterna também pode alterar sua modulação epigenética, via metilação do DNA.

Desta forma, a cirurgia bariátrica paterna parece sim, ter um papel fundamental na modulação da homeostase lipídica da prole, através da diminuição do acúmulo de lipídios no fígado da prole.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, L. A. et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. **Gastroenterology**, v. 129, n. 1, p. 113-21, Jul 2005. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16012941> >.

ANDERWALD, C. H. et al. Alterations in gastrointestinal, endocrine, and metabolic processes after bariatric Roux-en-Y gastric bypass surgery. **Diabetes Care**, v. 35, n. 12, p. 2580-7, Dec 2012. ISSN 1935-5548. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22923664> >.

ANSTEE, Q. M.; TARGHER, G.; DAY, C. P. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 10, n. 6, p. 330-44, Jun 2013. ISSN 1759-5053. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23507799> >.

ASHRAFIAN, H. et al. Metabolic surgery: an evolution through bariatric animal models. **Obes Rev**, v. 11, n. 12, p. 907-20, Dec 2010. ISSN 1467-789X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20051020> >.

BAKOS, H. W. et al. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. **Int J Androl**, v. 34, n. 5 Pt 1, p. 402-10, Oct 2011. ISSN 1365-2605. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20649934> >.

BECHMANN, L. P. et al. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. **J Hepatol**, v. 56, n. 4, p. 952-64, Apr 2012. ISSN 1600-0641. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22173168> >.

BERLANGA, A. et al. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. **Clin Exp Gastroenterol**, v. 7, p. 221-39, 2014. ISSN 1178-7023. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25045276> >.

BRANDT, N. et al. Cafeteria diet-induced insulin resistance is not associated with decreased insulin signaling or AMPK activity and is alleviated by physical training in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 299, n. 2, p. E215-24, Aug 2010. ISSN 1522-1555. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20484011> >.

BRAY, G. A.; YORK, D. A. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. **Physiol Rev**, v. 59, n. 3, p. 719-809, Jul 1979. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/379887> >.

BUCHWALD, H. et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. **JAMA**, v. 292, n. 14, p. 1724-37, Oct 2004. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15479938> >.

BUŽGA, M. et al. Effects of sleeve gastrectomy on parameters of lipid and glucose metabolism in obese women - 6 months after operation. **Wideochir Inne Tech Maloinwazyjne**, v. 8, n. 1, p. 22-8, Mar 2013. ISSN 1895-4588. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23630550> >.

CASTELL-AUVÍ, A. et al. The effects of a cafeteria diet on insulin production and clearance in rats. **Br J Nutr**, v. 108, n. 7, p. 1155-62, Oct 2012. ISSN 1475-2662. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22152054> >.

CHAPLIN, A.; PALOU, A.; SERRA, F. Methylation analysis in fatty-acid-related genes reveals their plasticity associated with conjugated linoleic acid and calcium supplementation in adult mice. **Eur J Nutr**, v. 56, n. 2, p. 879-891, Mar 2017. ISSN 1436-6215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26700221> >.

CHRISTOU, N. V. et al. Surgery decreases long-term mortality, morbidity, and health care use in morbidly obese patients. **Ann Surg**, v. 240, n. 3, p. 416-23; discussion 423-4, Sep 2004. ISSN 0003-4932. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15319713> >.

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

COHEN, R. et al. Laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass for BMI < 35 kg/m(2): a tailored approach. **Surg Obes Relat Dis**, v. 2, n. 3, p. 401-4, discussion 404, 2006 May-Jun 2006. ISSN 1550-7289. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16925363> >.

CROPLEY, J. E. et al. Male-lineage transmission of an acquired metabolic phenotype induced by grand-paternal obesity. **Mol Metab**, v. 5, n. 8, p. 699-708, Aug 2016. ISSN 2212-8778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27656407> >.

DANIELZIK, S. et al. Impact of parental BMI on the manifestation of overweight 5-7 year old children. **Eur J Nutr**, v. 41, n. 3, p. 132-8, Jun 2002. ISSN 1436-6207. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12111051> >.

DE CASTRO BARBOSA, T. et al. High-fat diet reprograms the epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring. **Mol Metab**, v. 5, n. 3, p. 184-97, Mar 2016. ISSN 2212-8778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26977389> >.

DIXON, J. B. et al. Bariatric surgery for type 2 diabetes. **Lancet**, v. 379, n. 9833, p. 2300-11, Jun 2012. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22683132> >.

DONKIN, I. et al. Obesity and Bariatric Surgery Drive Epigenetic Variation of Spermatozoa in Humans. **Cell Metab**, v. 23, n. 2, p. 369-78, Feb 2016. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26669700> >.



EBERTZ, C. E. et al. Duodenal jejunal bypass attenuates non-alcoholic fatty liver disease in western diet-obese rats. **Acta Cir Bras**, v. 29, n. 9, p. 609-14, Sep 2014. ISSN 1678-2674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25252208> >.

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

FIGUEROA-COLON, R. et al. Paternal body fat is a longitudinal predictor of changes in body fat in premenarcheal girls. **Am J Clin Nutr**, v. 71, n. 3, p. 829-34, Mar 2000. ISSN 0002-9165. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10702180> >.

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

FUKUNISHI, S. et al. Lipopolysaccharides accelerate hepatic steatosis in the development of nonalcoholic fatty liver disease in Zucker rats. **J Clin Biochem Nutr**, v. 54, n. 1, p. 39-44, Jan 2014. ISSN 0912-0009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24426189> >.

FULLSTON, T. et al. Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. **FASEB J**, v. 27, n. 10, p. 4226-43, Oct 2013. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23845863> >.

\_\_\_\_\_. Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice. **Hum Reprod**, v. 27, n. 5, p. 1391-400, May 2012. ISSN 1460-2350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22357767> >.

GRAYSON, B. E. et al. Improved rodent maternal metabolism but reduced intrauterine growth after vertical sleeve gastrectomy. **Sci Transl Med**, v. 5, n. 199, p. 199ra112, Aug 2013. ISSN 1946-6242. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23966301> >.

HADY, H. R. et al. Impact of laparoscopic sleeve gastrectomy on body mass index, ghrelin, insulin and lipid levels in 100 obese patients. **Wideochir Inne Tech Maloinwazyjne**, v. 7, n. 4, p. 251-9, Dec 2012. ISSN 1895-4588. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23362424> >.

HAO, Z. et al. RYGB Produces more Sustained Body Weight Loss and Improvement of Glycemic Control Compared with VSG in the Diet-Induced Obese Mouse Model. **Obes Surg**, Apr 2017. ISSN 1708-0428. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28386755> >.

HOLDSTOCK, C. et al. CRP reduction following gastric bypass surgery is most pronounced in insulin-sensitive subjects. **Int J Obes (Lond)**, v. 29, n. 10, p. 1275-80, Oct 2005. ISSN 0307-0565. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16010285> >.

HUSSAIN, M. M.; NIJSTAD, N.; FRANCESCHINI, L. Regulation of microsomal triglyceride transfer protein. **Clin Lipidol**, v. 6, n. 3, p. 293-303, Jun 2011. ISSN 1758-4299. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21808658> >.

JONES, P. A.; TAKAI, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1068-70, Aug 2001. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11498573> >.

KAWANO, Y.; COHEN, D. E. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. **J Gastroenterol**, v. 48, n. 4, p. 434-41, Apr 2013. ISSN 1435-5922. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23397118> >.

KRAL, J. G. et al. Large maternal weight loss from obesity surgery prevents transmission of obesity to children who were followed for 2 to 18 years. **Pediatrics**, v. 118, n. 6, p. e1644-9, Dec 2006. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17142494> >.

LIMA, W. P. et al. Lipid metabolism in trained rats: effect of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation. **Clin Nutr**, v. 24, n. 6, p. 1019-28, Dec 2005. ISSN 0261-5614. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16182414> >.

LIRA, F. S. et al. Exercise training reduces PGE2 levels and induces recovery from steatosis in tumor-bearing rats. **Horm Metab Res**, v. 42, n. 13, p. 944-9, Dec 2010. ISSN 1439-4286. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21064006> >.

MARMO, M. R. et al. Neonatal monosodium glutamate treatment increases epididymal adipose tissue sensitivity to insulin in three-month old rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 27, n. 5, p. 1249-53, May 1994. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8000347> >.

MAYES, J. S.; WATSON, G. H. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. **Obes Rev**, v. 5, n. 4, p. 197-216, Nov 2004. ISSN 1467-7881. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15458395> >.

MITCHELL, M.; BAKOS, H. W.; LANE, M. Paternal diet-induced obesity impairs embryo development and implantation in the mouse. **Fertil Steril**, v. 95, n. 4, p. 1349-53, Mar 2011. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21047633> >.

MURTHY, M. S.; PANDE, S. V. Malonyl-CoA-sensitive and -insensitive carnitine palmitoyltransferase activities of microsomes are due to different proteins. **J Biol Chem**, v. 269, n. 28, p. 18283-6, Jul 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8034571> >.

NG, S. F. et al. Chronic high-fat diet in fathers programs  $\beta$ -cell dysfunction in female rat offspring. **Nature**, v. 467, n. 7318, p. 963-6, Oct 2010. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20962845> >.

NOWACKA-WOSZUK, J.; MADEJA, Z. E.; CHMURZYNSKA, A. Prenatal caloric restriction alters lipid metabolism but not hepatic Fasn gene expression and methylation profiles in rats. **BMC Genet**, v. 18, n. 1, p. 78, 08 2017. ISSN 1471-2156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28810876> >.

PODRINI, C. et al. Redox homeostasis and epigenetics in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Curr Pharm Des**, v. 19, n. 15, p. 2737-46, 2013. ISSN 1873-4286. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23092327> >.

REN, L. P. et al. The chemical chaperon 4-phenylbutyric acid ameliorates hepatic steatosis through inhibition of de novo lipogenesis in high-fructose-fed rats. **Int J Mol Med**, v. 32, n. 5, p. 1029-36, Nov 2013. ISSN 1791-244X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24042997> >.

ROPELLE, E. R. et al. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. **J Physiol**, v. 577, n. Pt 3, p. 997-1007, Dec 2006. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008371> >.

RUBINO, F. et al. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. **Ann Surg**, v. 244, n. 5, p. 741-9, Nov 2006. ISSN 0003-4932. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17060767> >.

RUBINO, F.; GAGNER, M. Potential of surgery for curing type 2 diabetes mellitus. **Ann Surg**, v. 236, n. 5, p. 554-9, Nov 2002. ISSN 0003-4932. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12409659> >.

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

SAMPEY, B. P. et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity (Silver Spring)**, v. 19, n. 6, p. 1109-17, Jun 2011. ISSN 1930-739X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21331068> >.

SHI, X. et al. Paternal hyperglycemia in rats exacerbates the development of obesity in offspring. **J Endocrinol**, v. 234, n. 2, p. 175-186, Aug 2017. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28533422> >.

SMITH, J. et al. Effects of maternal surgical weight loss in mothers on intergenerational transmission of obesity. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 11, p. 4275-83, Nov 2009. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19820018> >.

SOUBRY, A. et al. Paternal obesity is associated with IGF2 hypomethylation in newborns: results from a Newborn Epigenetics Study (NEST) cohort. **BMC Med**, v. 11, p. 29, 2013. ISSN 1741-7015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23388414> >.

SPARKS, J. D.; SPARKS, C. E. Overindulgence and metabolic syndrome: is FoxO1 a missing link? **J Clin Invest**, v. 118, n. 6, p. 2012-5, Jun 2008. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18497882> >.

STEFATER, M. A. et al. Sleeve gastrectomy in rats improves postprandial lipid clearance by reducing intestinal triglyceride secretion. **Gastroenterology**, v. 141, n. 3, p. 939-949.e1-4, Sep 2011. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21699773> >.

STYLOPOULOS, N.; AGUIRRE, V. Mechanisms of bariatric surgery and implications for the development of endoluminal therapies for obesity. **Gastrointest Endosc**, v. 70, n. 6, p. 1167-75, Dec 2009. ISSN 1097-6779. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19560763> >.

THALER, J. P.; CUMMINGS, D. E. Minireview: Hormonal and metabolic mechanisms of diabetes remission after gastrointestinal surgery. **Endocrinology**, v. 150, n. 6, p. 2518-25, Jun 2009. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19372197> >.

WANDERS, R. J. Peroxisomes, lipid metabolism, and peroxisomal disorders. **Mol Genet Metab**, v. 83, n. 1-2, p. 16-27, 2004 Sep-Oct 2004. ISSN 1096-7192. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15464416> >.

WANG, T. T. et al. Ileal transposition controls diabetes as well as modified duodenal jejunal bypass with better lipid lowering in a nonobese rat model of type II diabetes by increasing GLP-1. **Ann Surg**, v. 247, n. 6, p. 968-75, Jun 2008. ISSN 1528-1140. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18520224> >.

WATERLAND, R. A.; JIRTLE, R. L. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. **Mol Cell Biol**, v. 23, n. 15, p. 5293-300, Aug 2003. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12861015> >.

WEI, Y. et al. Paternally induced transgenerational inheritance of susceptibility to diabetes in mammals. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 5, p. 1873-8, Feb 2014. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24449870> >.

WITTERS, L. A. et al. Insulin stimulates the dephosphorylation and activation of acetyl-CoA carboxylase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 15, p. 5473-7, Aug 1988. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2899891> >.

ZHANG, J. et al. [Influence of high-fat diet in paternal C57BL/6 mice on liver fat deposition in offspring]. **Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi**, v. 25, n. 2, p. 139-144, Feb 2017. ISSN 1007-3418. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28297802> >.

## APÊNDICES

	Valor energético kj/100g	Carboidratos g/100g	Proteínas g/100g	Gord. g/100g	Sódio mg/100g
<b>Cheetos (Pepsico, Brasil)</b>	1948	72	6,4	17,2	676
<b>Salgadinho de Bacon Troféu ( Santa Helena, Brasil)</b>	2200	56	8,8	30	1040
<b>Biscoito de maizena (Zadimel, Brasil)</b>	1793	73	8	10,7	300
<b>Bolo de chocolate (nutrella, Brasil)</b>	1798	55	5	21,7	141,7
<b>Coca- cola (Pepsico, Brasil)</b>	178	11	0	0	5
<b>Guaraná (Antartica, Brasil)</b>	168	10	0	0	5,5
<b>Salame tipo italiano (Sadia, Brasil)</b>	1822	2	22	38	1140
<b>Linguiça (Sadia, Brasil)</b>	1554	1,4	16	34	1342
<b>Bisnaguinha (Nutrella, Brasil)</b>	1328	54	11,2	6,2	300
<b>Waffer de chocolate (Bauducco, Brasil)</b>	2176	63	5	27	113
<b>Mortadela (Frimesa, Brasil)</b>	845	2	12	16	1545
<b>Marshmallow (Fini, Brasil)</b>	1423	80	5	0	46

Tabela 1 – Composição da dieta de cafeteria

## ANEXO 1



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Homeostase glicêmica e lipídica da prole de ratos obesos submetidos à derivação gástrica em Y de Roux" (protocolo nº 3756-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero / Mariana Carla Mendes, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

Este certificado refere-se a etapa do procedimento experimental desenvolvido no âmbito da UNICAMP, não dispensando a obrigatoriedade de submissão de protocolo junto a CEUA/UNIOESTE.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 11 de março de 2015.

Campinas, 11 de março de 2015.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira  
Presidente


Fátima Alonso  
Secretária Executiva


**ANEXO 2**

## Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam em minha tese de doutorado intitulada **Efeito da derivação gástrica em Y de Roux sobre o fígado de filhotes de pais obesos pela dieta de cafeteria**, não infringem os dispositivos da Lei nº 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 17 de abril de 2018.

Assinatura:   
Nome do (a) autor(a): Mariana Carla Mendes Brandão  
RG: 102889150

Assinatura:   
Nome do (a) orientador(a): Antonio Carlos Boschiero  
RG: 29596920