

O papel do Espermatozoide na Transmissão à Descendência do Risco para Diabetes Mellitus*

The Role of Sperm in the Transmission to the Offspring of the Risk for Diabetes Mellitus

P.F. Oliveira^{1,2,3,4}, L. Crisóstomo^{1,2,3,4}, M. Sousa^{2,3}, M.P. Monteiro^{3,5}, P. Macedo^{6,7}, J. Raposo⁸, M.G. Alves^{2,3}

1 - i3S- Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

2 - Departamento de Microscopia, Laboratório de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar; Universidade do Porto, Porto, Portugal.

3 - Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB); Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar; Universidade do Porto, Porto, Portugal.

4 - Departamento de Genética, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

5 - Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

6 - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova, Lisboa, Portugal.

7 - Centro de Investigação de Doenças Crónicas (CEDOC), Lisboa, Portugal.

8 - Associação Protetora dos Diabéticos de Portugal, Lisboa, Portugal.

Resumo

Fatores genéticos e epigenéticos surgiram como intervenientes principais a serem considerados quando se discutem as estatísticas pandémicas da Diabetes *Mellitus*, e em particular da diabetes tipo 2. É amplamente reconhecido que uma mãe com obesidade ou hiperglicemia sustentada pode induzir uma reprogramação metabólica da descendência, que pode resultar no aumento do risco de desenvolver Diabetes. Pelo contrário, a contribuição de um pai em condições semelhantes não é totalmente clara. O dogma clássico de que os espermatozoides carecem de atividade de transcrição ou que este processo é reprimido foi já ultrapassado. Sabe-se hoje que os espermatozoides maduros contêm elevadas quantidades de RNAs codificantes e não codificantes. Por outro lado, nos homens com diabetes tipo 2, ocorre uma reprogramação do perfil metabólico do esperma, alterando a assinatura epigenética que transmite à descendência. Embora existam novas evidências de que o esperma pode transmitir assinaturas transgeracionais, o papel do pai no possível desenvolvimento de doenças metabólicas continua a ser matéria de debate. Aqui, discutimos o conhecimento atual sobre a transmissão transgeracional do risco de Diabetes *Mellitus* através de mecanismos mediados pelo espermatozoide. Também é discutida a identificação de biomarcadores epigenéticos associados ao perfil metabólico do pai e o possível desenvolvimento de doenças metabólicas na descendência. Temos como objetivo discutir se a melhoria do estado metabólico do pai no momento da conceção poderá resultar na melhoria do fenótipo metabólico da sua prole.

Palavras-chave: espermatozoide, transmissão transgeracional, risco de Diabetes *mellitus*, biomarcadores epigenéticos, doenças metabólicas

*Este trabalho foi financiado através da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT): Pedro Fontes Oliveira (IFCT2015 and PTDC/BBBBQB/1368/2014), Luís Crisóstomo (SFRH/BD/128584/2017), Marco G. Alves (IFCT2015 e PTDC/BIM-MET/4712/2014) e UMIB (Pest-OE/SAL/UI02015/2014); por fundos comunitários FEDER: UMIB (POCI/COMPETE2020); e pela Sociedade Portuguesa de Diabetologia: Luís Crisóstomo e Marco G. Alves (Bolsa de Investigação "Nuno Castel-Branco").

CORRESPONDÊNCIA

Marco G. Alves, PhD
Departamento de Microscopia - Laboratório de Biologia Celular
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS)
Rua de Jorge Viterbo Ferreira nº228
4050-313 Porto, Portugal
Tel: +351 220 428 000
E-mail: alvesmarc@gmail.com

Abstract

Genetic and epigenetic factors have emerged as main actors to be considered when discussing the pandemic statistics of Diabetes *Mellitus*, particularly in relation to type 2 diabetes. It is well known and accepted that a maternal obesity or persistent hyperglycemia are associated with a metabolic reprogramming of the offspring leading to increased risk for diabetes. Still, the contribution of similar conditions in the father are unclear. The classic dogma that transcription activity is inexistent or repressed in spermatozoa has been challenged. It is now known that mature spermatozoa contain high amounts of RNAs and non-coding RNAs. Type 2 diabetes in men leads to a reprogramming of the sperm metabolic profile influencing its epigenetic signature. Although there is novel evidence that sperm may transmit transgenerational signatures, the role of the father as a possible conveyor for the risk of development of metabolic diseases remains a matter of debate. Herein we discuss the current knowledge on the transgenerational transmission of the risk for diabetes by spermatozoa-mediated mechanisms. We also discuss the identification of epigenetic biomarkers associated with the metabolic status of the father related with possible development of metabolic diseases in the offspring. Finally, we aim to highlight that improvement of the metabolic status of the father at conception period may result in better offspring metabolic phenotypes.

Keywords: spermatozoa, transgenerational transmission, Diabetes *mellitus* risk, epigenetic biomarkers, metabolic diseases

> INTRODUÇÃO

Os números pandémicos da diabetes *mellitus* tipo 2 têm sido essencialmente associados aos hábitos nutricionais e de estilo de vida, os quais evoluíram num sentido negativo, associado ao aparecimento de disfunções metabólicas. Na verdade, é certo que o aumento crescente do consumo de comidas ricas em açúcares e gorduras saturadas, que têm palato mais atrativo e são mais económicas, contribui para elevar o risco de desenvolver uma desregulação no metabolismo da glucose e insulina. Outra estatística importante releva que o número de crianças, adolescentes e jovens adultos com diabetes tipo 2 ou obesidade está a aumentar, o que significa que há uma tendência para que estas pessoas vivam com mais tempo sob o efeito da doença. Muitos problemas silenciosos e não tão discutidos pela comunidade científica, como a fertilidade destes indivíduos ou as consequências da desregulação nos níveis de insulina e glucose na qualidade do espermatozoide, enquanto veículo para a transmissão de informação genética, podem encontrar-se exacerbados. Dietas de elevado valor calórico ou ricas em gorduras propiciam não só um ganho de peso, mas também promovem a hiperglicemia, hiperinsulinemia e dislipidemia em indivíduos predispostos. Cada uma destas condições per se conduz a um estado inflamatório crónico e a um aumento das taxas metabólicas na tentativa de atingir um ponto de homeostasia metabólica corporal, e que por sua vez pode ser exacerbada se houver uma combinação dos mesmos fatores. A taxas metabólicas elevadas está associado um aumento da produção de espécies reativas de oxigénio, que provocam danos no DNA e proteínas, e que podem comprometer irremediavelmente as membranas celulares. Isto é particularmente importante no caso do homem uma vez que a qualidade e fisiologia dos espermatozoides produzidos depende em particular do ambiente

metabólico e do estado redox. As espécies reativas de oxigénio são de extrema importância para que o espermatozoide desempenhe as suas funções, participando em processos essenciais como a capacitação, hiperativação ou mesmo a reação acrossómica.

Alterações no estado metabólico do indivíduo interferem com a composição da membrana do espermatozoide. As membranas destas células germinativas são muito ricas em ácidos gordos polinsaturados, o que os torna muito vulneráveis a espécies reativas de oxigénio. Assim, em condições de desregulação do metabolismo da glucose que conduzam a um aumento na quantidade de espécies reativas de oxigénio produzidas, ocorre a oxidação das membranas dos espermatozoides, o que compromete o seu funcionamento e a informação genética que pode ser transmitida para a geração seguinte. Durante muito tempo este último tópico foi pouco discutido. No entanto, nas últimas décadas este paradigma mudou e, para além dos hábitos alimentais e comportamentais, tem sido demonstrado que existe uma contribuição importante da genética e, particularmente, de fatores epigenéticos, os quais podem mesmo ser transmitidos além de uma geração, no desenvolvimento de doenças metabólicas.

> EPIGENÉTICA: UMA DISCIPLINA EMERGENTE

De um modo simplista, embora conciso, é possível definir epigenética como um mecanismo de controlo molecular que resulta de mudanças na estrutura da cromatina, sem que ocorram alterações na sequência do DNA. Estes mecanismos medeiam a resposta genómica a estímulos externos, regulando o silenciamento ou ativação de genes. Alterações epigenéticas podem induzir condições patológicas em resposta a fatores externos, onde se incluem o estilo de vida e o ambiente. Um dos mecanismos epigenéticos mais relevantes é a metilação do

DNA, que altera a acessibilidade aos promotores dos genes, e é mediado pelas DNA metiltransferases e demetilases, entre outros.

Alterações epigenéticas podem ocorrer igualmente nas histonas. As modificações pós-translacionais das histonas podem ser de ordem diversa, incluindo acetilação, metilação, fosforilação entre outras. Essas modificações resultam na alteração da cromatina e, como tal, na ativação ou silenciamento de genes. Estes processos, embora distintos, podem ocorrer simultaneamente. Assim, sabe-se, por exemplo, que a acetilação de resíduos de lisina das histonas aumenta a acessibilidade da cromatina, ativando a expressão de genes. Contudo, o efeito final da metilação de uma histona varia de acordo com o resíduo específico metilado e o número de grupos metilo adicionados. Estes processos de acetilação e desacetilação das histonas são mediados por duas classes de enzimas denominadas de histonas acetil-transferases e desacetilases, respetivamente. Conclui-se então que a regulação dessas classes de enzimas controla o nível de acetilação das histonas e, por isso, regula a expressão génica.

Para além das alterações bioquímicas que medeiam a modificação do DNA e histonas, os RNAs não codificantes regulam também a expressão de genes. Estes RNAs não codificantes podem modificar a maquinaria de biossíntese, quer ao nível pré como pós-translacional. Embora o RNA tenha sido descoberto há praticamente 150 anos, só em 2001 foi descrito que RNAs não codificantes podem alterar a expressão de genes ⁽¹⁾. Estes RNAs não codificantes não são mais do que pequenas sequências de RNA que silenciam a expressão de genes quando se ligam às sequências correspondentes. No espermatozoide estão descritos 3 tipos de pequenos RNAs não codificantes: os microRNAs (miRNAs), os piwiRNAs (piRNAs) e pequenos RNAs de interferência (siRNAs). Esses tipos de RNAs são capazes de mediar características metabólicas dos indivíduos. Por exemplo, miRNAs, e também alguns RNAs não codificantes longos (lncRNAs), tipicamente com menos de 200 nucleótidos, já mostraram estar envolvidos no desenvolvimento das células β -pancreáticas, assim como na secreção e biossíntese de insulina ⁽²⁾, sendo por isso sugerido que estes RNAs possam ter um papel importante na definição do perfil metabólico. No entanto, é de referir que muitos genes podem ser alvos da ação de um único miRNA, e um único gene pode ser alvo da ação de vários miRNAs. De facto, os miRNAs são expressos diferencialmente no tempo e em cada tecido, originando diferentes tipos de RNAs funcionais. Eles recrutam DNA metiltransferases e modificadores de histonas para os seus genes alvo e facilitam o looping entre promotor e acentuassomo

(enhancer), o que promove a expressão dos genes ⁽³⁾. Estes processos têm sido alvo de especial atenção nos últimos anos, sendo que foi demonstrado o seu envolvimento em diversas patologias. De facto, foi demonstrado que mecanismos epigenéticos estão envolvidos na expressão de genes associados à resistência à insulina ou de insuficiência da mesma. Estes processos epigenéticos não são exclusivos para a diabetes tipo 2. Foi, por exemplo, reportado que a diabetes tipo 1 tem uma taxa de concordância de 40% em gémeos monozigóticos, o que sugere um papel relevante para os fatores ambientais e/ou modificações epigenéticas ⁽⁴⁾. Recentemente, um estudo em linhas de linfócitos de gémeos monozigóticos, composto por 3 pares discordantes e outros 6 pares concordantes para a diabetes tipo 1, sugeriu que anormalidades nos padrões de metilação do DNA que controlam a transcrição de genes estão envolvidas na patogénese da doença ⁽⁵⁾. Foram já descritos genes herdados pelo pai que aumentam a predisposição para a diabetes tipo 1. A transmissão do alelo classe I de insulina VNTR por parte do pai aumenta o risco de desenvolver obesidade num fator de 1.8, enquanto que a transmissão por parte da mãe não apresenta esse efeito ⁽⁶⁾. A análise da transmissão desses alelos em 1316 famílias demonstrou que a prevenção pode ser conseguida num efeito mediado apenas pela transmissão através do pai e não da mãe ⁽⁷⁾, o que veio consolidar o possível envolvimento do pai na transmissão de suscetibilidade ao desenvolvimento da doença (Figura 1). Quando se consideram os efeitos ambientais, torna-se imperativo diferenciar aqueles que são diretos, resultantes da paternidade, e que afetam a primeira geração, dos que se possam designar como multigeracionais ou transgeracionais. Um verdadeiro efeito transgeracional paternal tem de se manifestar após várias gerações, sendo que apenas a geração original é sujeita ao stress que induziu a alteração ⁽⁸⁾. Ou seja, a segunda geração, embora apresente o efeito em estudo, tem de resultar de esperma não exposto ao stress. A título de exemplo, estamos perante um efeito transgeracional se um indivíduo manifestar efeitos resultantes do stress ao qual o seu avô foi exposto, mas cujo pai não foi exposto (Figura 1).

A epigenética transgeracional, que se refere à transferência de marcas epigenéticas de uma geração para outra ou outras, é uma área de investigação em rápida expansão e extremamente relevante para o estudo do estabelecimento de diabetes *mellitus*, particularmente a diabetes tipo 2. Inicialmente as assinaturas epigenéticas eram descritas como sendo herdadas pelas células-filhas durante a mitose, mas já foi demonstrado que também ocorrem quando os gâmetas se formam. O primei-

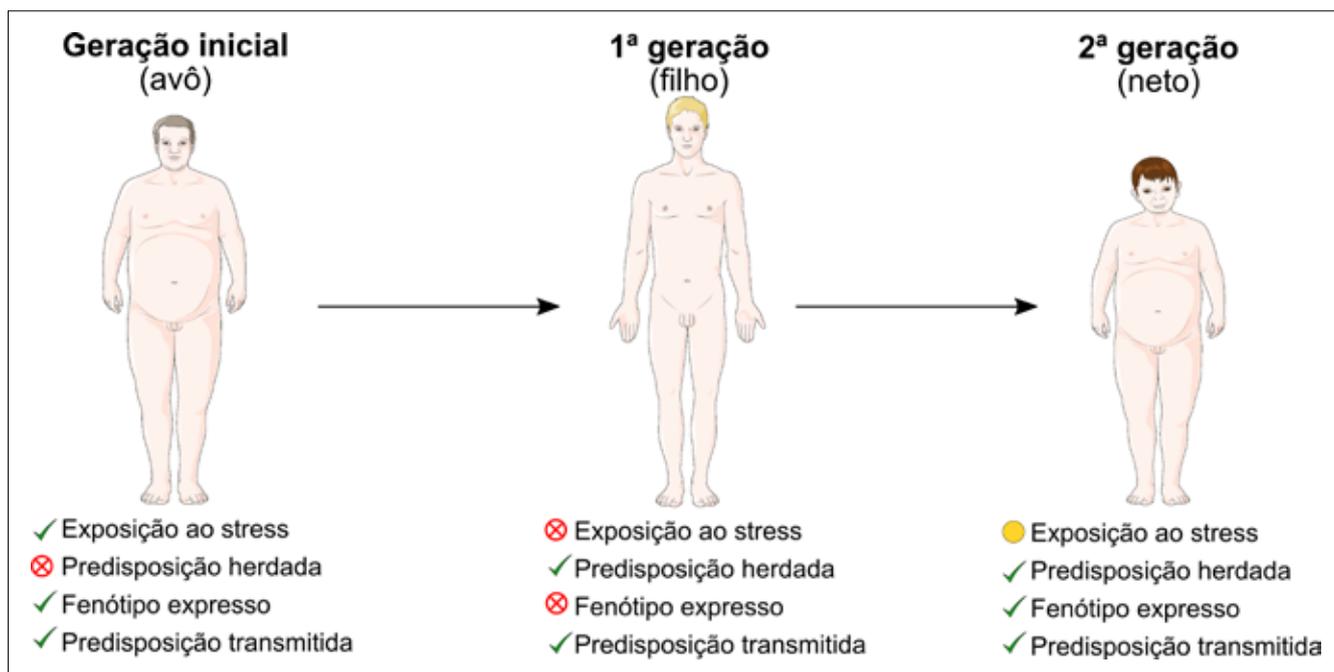


Figura 1 - Transmissão epigenética transgeracional paterna. Na geração original, o avô, o estilo de vida pode levar a uma condição de desordem metabólica, o que numa idade fértil refletirá esse stress sobre o esperma produzido gravado no perfil epigenético. Na descendência direta (filho), resultante do esperma que contém um perfil epigenético de predisposição a desordem metabólica, essa predisposição pode não se verificar se não ocorrer um ambiente propício ao seu desenvolvimento. Ainda assim, a geração seguinte (neto), poderá herdar a assinatura epigenética do seu avô, por via paterna, e face a um ambiente com um estímulo associado à doença do avô, ainda que de menor intensidade ou frequência, pode manifestar a predisposição e desenvolver a doença.

ro mecanismo define a herança epigenética, enquanto o segundo permite uma transmissão epigenética transgeracional ⁽⁹⁾. O impacto da condição metabólica materna durante a pré-concepção e a gravidez está já bem estudado. De facto, sabe-se que a diabetes gestacional é um fator muito importante para a descendência. Foi já descrito que o risco de desenvolver diabetes tipo 2 numa criança cuja mãe desenvolveu diabetes gestacional é sete a oito vezes superior, e que isso está associado a alterações epigenéticas ^(10,11). No entanto, o modo como os gâmetas transmitem a informação epigenética ainda permanece desconhecido.

> GÂMETAS E EPIGENÉTICA

Nos gâmetas, o genoma é quase completamente desmetilado durante a gametogénese e a metilação só é restabelecida nos gâmetas maduros. Nos gâmetas masculinos ocorrem ainda processos que fazem com que 90% das histonas sejam substituídas por protaminas. Para além disso, após a fecundação, os pró-núcleos são fortemente desmetilados e as marcas epigenéticas reintegradas novamente durante a primeira divisão pós-zigoto. Estes processos de reprogramação são essenciais para

que o zigoto mantenha a sua pluripotência e para o desenvolvimento embrionário. Por outro lado, surgem ainda como mecanismos que previnem que modificações epigenéticas induzidas nos gâmetas possam passar facilmente através desta redefinição epigenómica, o que de algum modo previne que a geração seguinte sofra o efeito da maioria da informação epigenómica vinda dos gâmetas, quer masculino, quer do feminino. Há, no entanto, diversas evidências que demonstram que imprinting parental ocorre. Nesse processo, um pequeno grupo de genes de origem num alelo parental é passado à geração seguinte, servindo de prova inequívoca de que certas regiões genómicas sobrevivem ao reset e aos mecanismos acima descritos. Por outro lado, após a fertilização, durante o início do desenvolvimento embrionário, ocorrem diversas alterações no epigenoma que fica vulnerável, abrindo uma janela temporal em que o fica exposto mais facilmente a condições passíveis de o alterar. Para além disso, a programação epigenética da linha germinal ocorre também durante o desenvolvimento de células germinais primordiais e ainda no início do processo de determinação do sexo ⁽⁶⁾. Há assim, diversos momentos em que é possível gravar informação no epigenoma que condicionará a descendência.

É bem conhecido que os oócitos apresentam grandes quantidades de RNA de todas as classes ⁽¹²⁾, sendo que muitos dos RNAs não codificantes são estáveis e contribuem para a regulação de genes durante o desenvolvimento inicial ⁽¹³⁾. Por seu lado, os espermatozoides apresentam características muito diferentes uma vez que têm um núcleo altamente condensado, transcrição quase ausente e pouco citoplasma. No entanto, o espermatozoide contém RNA e alguns desses RNAs foram mesmo detetados em embriões após fertilização ⁽¹⁴⁾, o que vem demonstrar que o espermatozoide tem transcrição e que transmite RNAs importantes para a descendência. De facto, sabe-se que muitos tipos de RNAs não codificantes, como os microRNAs, pequenos RNAs de interferência ou piwiRNAs, medeiam os efeitos do meio ambiente na herança epigenética. Embora os estudos que se focaram em doenças metabólicas não sejam assim tão conclusivos sobre a transmissão desses RNAs não codificantes para a descendência e sobre o efeito deles na saúde da mesma, alguns estudos em outras patologias têm sido mais conclusivos e assertivos. Por exemplo, o stress durante os primeiros anos de vida promove o aumento da expressão de cinco miRNAs específicos nos espermatozoides de ratinhos, sendo que o miRNA-375 foi associado ao stress, mas também à regulação metabólica (metabolismo da glucose) da descendência ⁽¹⁵⁾. Também bastante interessante foi um estudo que demonstrou que homens fumadores apresentavam alterações não em um ou cinco miRNAs, mas sim em 28, e que os padrões de alterações detetadas se mantinham através de várias gerações ⁽¹⁶⁾. Mais recentemente, a herança epigenética de doença metabólica através dos gâmetas foi sugerida num estudo em que ratinhos obesos apresentavam uma expressão anormal de 11 miRNAs, os quais foram demonstrados como sendo responsáveis pela transmissão da resistência à insulina nas duas gerações subsequentes ⁽¹⁷⁾. Embora esta área de estudo seja ainda recente, há já fortes evidências que suportam a hipótese de os gâmetas transportarem informação que está na base do desenvolvimento de doenças metabólicas na descendência.

Os espermatozoides apresentam várias outras características distintas da maioria das células, incluindo na cromatina. Durante muito tempo foi sugerido que as histonas da cromatina eram eliminadas e substituídas por protaminas no espermatozoide maduro, porém, mais recentemente, novos dados demonstraram que aproximadamente 4% do genoma das células haploides humanas permanece empacotado em nucleossomas ^(18, 19). Isto sugere, junto com outras evidências, que as histonas podem também desempenhar papel importante na he-

rança epigenética através dos gâmetas. Sendo a epigenética uma área emergente e em clara expansão, à medida que novos avanços vão sendo feitos é necessário ajustar o que se sabe sobre a importância dos gâmetas na transmissão de informação relevante para o desenvolvimento de patologias na descendência.

> HERANÇA EPIGENÉTICA TRANSMITIDA ATRAVÉS DOS GÂMETAS

Existem então estudos que suportam o facto de informação relacionada com o estilo de vida e o perfil metabólico dos pais poder ser transmitida ao longo das gerações através do epigenoma dos gâmetas podendo, posteriormente, afetar a descendência. É possível sumarizar essas evidências em 3 grandes descobertas: 1) os perfis de metilação dos gâmetas são alterados por fatores ambientais e alguns padrões de metilação nos gâmetas são hereditários; 2) os fenótipos da descendência são afetados por moléculas de RNA que estão presentes nos gâmetas e 3) existe uma parte de estruturas da cromatina dos gâmetas que transportam informações epigenéticas (Figura 2). No entanto, para que as alterações epigenéticas persistam, elas devem ultrapassar a reprogramação da linha germinal, durante a qual a metilação do DNA, modificação de histona e pequenos RNAs são restabelecidos. Nos mamíferos essa reprogramação ocorre na linha germinativa e no zigoto imediatamente após a fertilização ^(20, 21), conforme discutido acima.

É conhecido que os tóxicos ambientais têm efeitos que se propagam nas gerações futuras muito após a exposição. Alguns estudos com moléculas têm demonstrado que mesmo que seja a mãe a passar para a primeira geração a informação, há a possibilidade de a mesma se propagar via gâmetas masculinos. Por exemplo, a exposição de fêmeas ao disruptor endócrino Vinclozolin (que é utilizado na agricultura como fungicida e mesmo na manutenção de campos de golf) durante a gravidez resulta em problemas de fertilidade para a descendência durante pelo menos 4 gerações ⁽⁷⁾, sendo que o fenótipo é também herdado através da linha germinal masculina. Muitos outros compostos têm mostrado mecanismos semelhantes. Entre esses casos, podemos evidenciar a exposição durante a gestação a Bisfenol A ou toxinas, ambos promovendo alterações que se propagam até à geração F3, sendo que os machos apresentam epimutações no seu esperma ⁽⁸⁾. Só recentemente se demonstrou inequivocamente, usando fertilização *in vitro*, que as células germinativas de ratinhos expostos a diferentes estímulos nutricionais, como dietas com baixo teor em gordura, normais ou ricas em gorduras, transmitem

informações cruciais para a geração seguinte com impacto no seu perfil metabólico ⁽¹⁶⁾. Em modelos animais tem sido descrito um risco aumentado de desenvolver doença metabólica quando há um ambiente intrauterino adverso, sendo possível detetar alterações epigenéticas nos tecidos do feto ⁽¹¹⁾. A exposição intrauterina a níveis elevados de glicose, afeta a metilação do DNA em vários locais, o que pode prejudicar a secreção de insulina e resultar num aumento de peso corporal e do risco de desenvolver a doença na vida pós-natal ⁽²²⁾. Estudos recentes identificaram ainda alterações a nível do epigenoma e regiões diferencialmente metiladas após a exposição intrauterina a diabetes ^(23, 24).

É também importante salientar que para além dos espermatozoides, outros componentes do sémen podem contribuir para alterar o fenótipo metabólico da descendência (Figura 2). De facto, a descendência masculina de ratinhos sem fluido seminal devido a excisão das vesículas seminais têm fertilidade comprometida e desenvolvem um perfil metabólico de hipertensão e intolerância à glucose, assim como obesidade entre outros problemas ⁽¹⁾. Para além da modulação negativa de genes relacionados com fatores embriotróficos e da modulação positiva de fatores apoptóticos, a ausência de fluido seminal remove também alguns componentes importantes como proteínas e exossomas, que desempenham um papel importante na transmissão intergeracional ou transgeracional paterna. Esta hipótese não deve ser descartada. Por exemplo, quer em humanos quer em ratinhos já foi descrito que os exossomas possuem pequenos RNAs não codificantes no fluido seminal ^(25, 26), sendo por isso possível que transmitam informação epigenética para a descendência. Assim, são necessários muitos cuidados quando se interpretam os resultados neste tipo de estudos em que se pretende estudar o papel dos gametas na transmissão de doenças uma vez que fluidos acessórios, como o fluido seminal, podem mascarar os resultados ou ter um papel preponderante (Figura 2).

> ESTADO NUTRICIONAL E METABÓLICO DO PAI E RISCO PARA A DESCENDÊNCIA

Existem evidências inequívocas sobre a ocorrência de modificações epigenéticas mediadas por fatores nutricionais que alteram a estabilidade do genoma, assim como a expressão de mRNA e de proteínas, contribuindo significativamente para o desenvolvimento de doenças metabólicas na descendência. Estudos desenvolvidos em roedores sugerem claramente que o estado metabólico paterno tem um efeito sobre o metabo-

lismo da descendência. Por exemplo, o jejum pré-acoplamento dos machos foi descrito como capaz de alterar os níveis de glicose plasmática na descendência ⁽²⁷⁾. Ratos machos alimentados com uma dieta rica em gordura deram também origem a fêmeas com menor número de ilhéus de Langerhans e uma menor tolerância à glucose ⁽²⁸⁾. Esse mesmo estudo demonstrou que essa alimentação paterna rica em gordura alterava a expressão de genes associados à regulação da insulina e ao metabolismo da glucose nos ilhéus de Langerhans da descendência. Para além dessas evidências diretas, foram ainda demonstrados alguns mecanismos epigenéticos associados a esse efeito, como a hipometilação no local de início da transcrição do gene para o recetor alfa 2 da interleucina 13 (Il13ra2), sendo que foi ainda demonstrado um aumento em cerca de 2 vezes na expressão desse gene. Este estudo foi feito em apenas uma geração, pelo que não se demonstrou se o efeito desta dieta paterna rica em gordura no perfil metabólico da descendência se propagava a mais gerações. Num outro estudo feito em ratos, foi demonstrado que quando machos consumiam uma dieta pouco rica em proteínas, a descendência apresentava níveis reduzidos de colesterol hepático, enquanto que, quando foi feito um estudo do perfil epigenómico hepático relacionado com o metabolismo dos lípidos e colesterol na descendência, foi concluído que existiam diversas alterações significativas, incluindo na metilação de resíduos de citosina ⁽²⁷⁾. Estes estudos demonstraram claramente que existe um efeito do estado metabólico do pai, na altura da concepção, no estado metabólico da descendência. Mais recentemente, foi efetivamente demonstrado que num casal em que machos têm prediabetes, há um aumento da probabilidade da descendência ter diabetes *mellitus*, sendo que os mecanismos de transmissão são mediados pelas alterações epigenéticas que ocorrem no esperma ⁽²⁹⁾. A descendência de um pai com prediabetes apresentava disfunção na tolerância à glucose e na sensibilidade à insulina, as quais estavam associadas a alterações no epigenoma dos ilhéus de Langerhans, particularmente uma modulação negativa de genes associados ao metabolismo da glucose e às vias de sinalização da insulina. Esse estudo demonstrou que a prediabetes altera o epigenoma do espermatozoide e que muitos genes importantes para a sinalização da insulina herdam alelos metilados do espermatozoide. Para além disso, recentemente foi descrito que pequenos RNA transferência são também influenciados pelo estado nutricional do pai ⁽²⁵⁾. Estes estudos comprovam a transmissão de informação por parte do pai que depois se reflete no perfil metabólico da descendência.

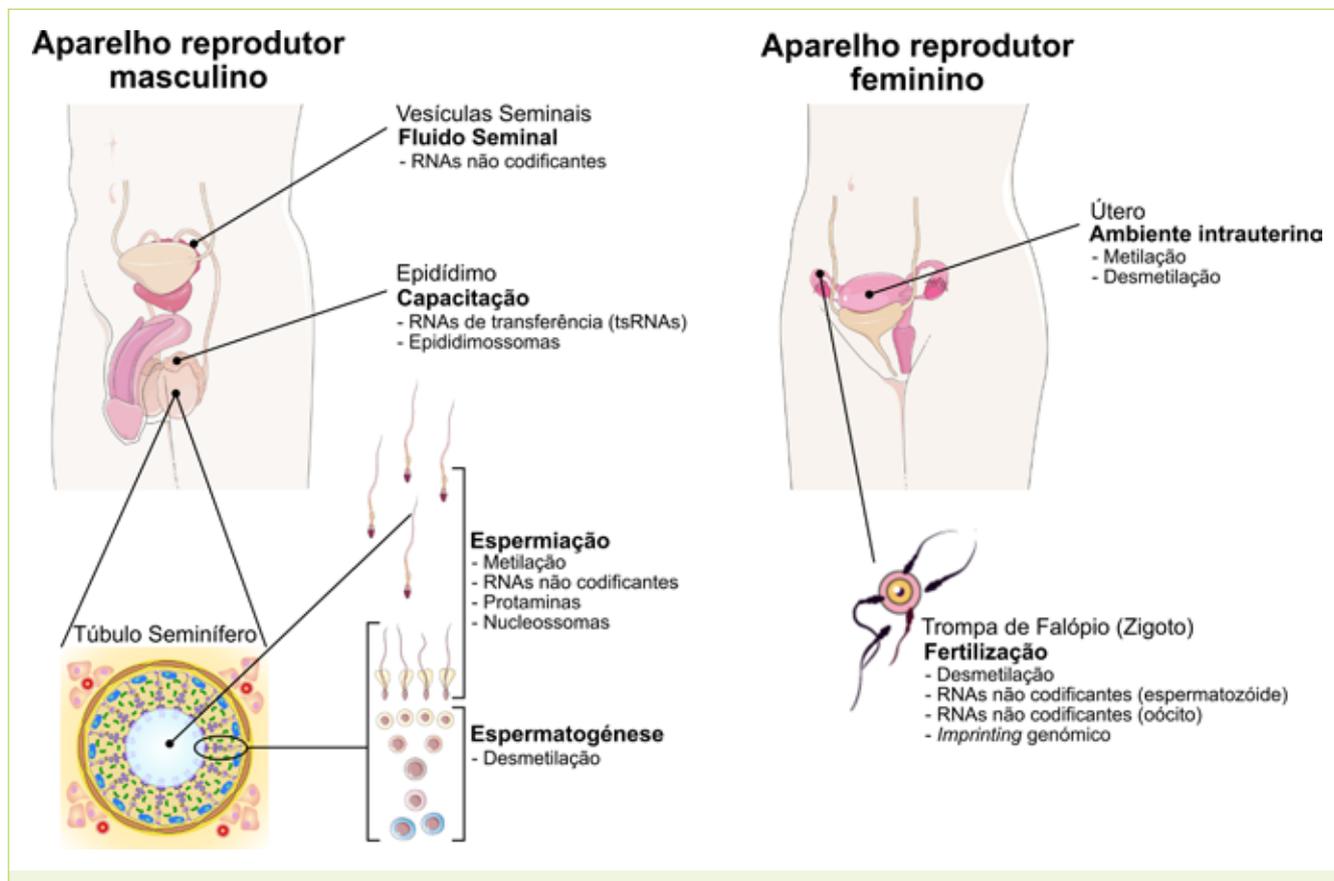


Figura 2 - Mecanismos de transmissão da informação epigenética paterna. A informação epigenética transmitida pelos gametas masculinos é modulada em diversos locais e momentos ao longo de todo o ciclo de vida haploide masculino. Embora a maior parte destes mecanismos ocorra, naturalmente, no aparelho reprodutor masculino, também o aparelho reprodutor feminino exerce uma influência considerável na manutenção desta informação, para que possa ser transmitida à descendência.

Em humanos é muito complicado demonstrar a potencial transmissão transgeracional de alterações no epigenoma. Ainda assim, embora existam poucos estudos moleculares que comprovem efeitos herdados através dos gametas masculinos transgeracionalmente, há estudos de associação e populacionais muito relevantes que permitem uma discussão baseada em factos. Por exemplo, dados recolhidos de 3 coortes de homens nascidos em 1890, 1905 e 1920 numa localidade da Suécia, até à sua morte em 1995, e seguida a sua descendência, sugeriu que a disponibilidade de comida durante o crescimento dos avós (mais do que das avós) estava associado a um aumento da mortalidade por diabetes mellitus ⁽³⁰⁾. Curiosamente, um estudo posterior, nessa mesma população, viria a sugerir que os homens teriam um risco muito mais elevado de mortalidade se os seus avós paternos tivessem tido uma considerável disponibilidade de comida durante o crescimento, enquanto nas mulheres isso verifica-se quando as avós paternas tinham essa boa disponibilidade de comida nesse período

do ⁽³¹⁾. Estes resultados vieram então dar consistência à necessidade de investir em estudos que se foquem nos mecanismos moleculares que possam estar envolvidos na transmissão transgeracional das doenças metabólicas, incluindo a diabetes *mellitus*.

A variação de peso, per se, tem também demonstrado poder ter um efeito sobre a informação que é transmitida à descendência. A perda de peso rápida induzida pela cirurgia bariátrica provocou uma remodelação do epigenoma de esperma, logo após a primeira semana, com alterações significativas na metilação do DNA em regiões do genoma envolvidas no controle do apetite e do peso ⁽³²⁾. A epigenética é assim uma área de investigação relativamente recente, que ganha cada vez mais relevância tendo em conta o maior número de estudos que sustentam as evidências de que as interações gene-ambiente e nutrição existem. A transmissão de características associadas a disfunções metabólicas por fenómenos epigenéticos através de gerações sucessivas é um tópico de investigação em clara expansão.

> ESTADO NUTRICIONAL E METABÓLICO DO PAI E ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS

A dieta do pai tem uma grande relevância para o sucesso reprodutivo e transmite informações epigenéticas decisivas para a descendência. Um estudo recente demonstrou que uma dieta paterna com baixo consumo de folato altera o epigenoma do espermatozoide e a expressão de genes na descendência, sendo sugerido que essas mudanças ocorrem por diferenças na metilação de DNA e histonas⁽³³⁾. Por outro lado, uma dieta com elevado teor em gordura altera a expressão de miRNAs e a hipometilação do DNA de espermatozoides⁽¹⁷⁾. Estudos demonstraram ainda que quando ratinhos machos da estirpe C57BL6 são alimentados com uma dieta rica em gordura, ocorrem problemas de fertilidade em machos e fêmeas da descendência até pelo menos 2 gerações seguintes^(17, 34, 35). As alterações da função reprodutiva foram sugeridas ser transmitidas pela linha parental⁽³⁴⁾, sendo que esses efeitos podem ser revertidos por uma redução de gorduras na dieta juntamente com exercício físico^(28, 35, 36). Há ainda estudos que demonstram que não é necessária uma dieta prolongada para que ocorra transmissão indesejada de informação. Num estudo, o jejum de ratinhos macho durante 24 horas resultou numa desregulação do metabolismo da glucose da descendência, em ambos os sexos, tendo sido registadas alterações na glucose total após 10 semanas, quando comparadas com a condição controlo. Este efeito era exacerbado se a condição de jejum fosse repetida⁽²⁷⁾. Os machos que descendem de ratinhos machos sujeitos a restrição calórica apresentaram também um peso mais reduzido no nascimento e uma tolerância à glucose comprometida devido a disfunções nas células β , sendo que foi comprovado que a via paternal foi exclusivamente responsável pelo baixo peso no nascimento, enquanto que a combinação de fatores transmitidos por ambas as linhas, maternal e paternal, foi responsável pelos restantes efeitos metabólicos⁽³⁰⁾. Estes estudos comprovaram claramente que o estado metabólico do pai aquando da conceção influencia o perfil metabólico da descendência, sendo que alterações comportamentais, ou um controlo mais rigoroso do perfil metabólico do pai, melhoram o perfil metabólico da descendência. A ausência de estudos em humanos que demonstrem inequivocamente este efeito no controlo glicémico é uma lacuna que deverá ser preenchida nos próximos anos, já que as evidências apontam no sentido de um envolvimento do estado metabólico do pai, aquando da conceção, na definição do que será o estado metabólico da descendência. Existe ainda a situação contrária, em que

o nascimento de um filho pode dar indicações sobre o futuro estado metabólico do pai. Por exemplo, um estudo em norte-americanos nativos (Índios Pima) sugeriu que um baixo peso da descendência ao nascimento está associado ao risco de desenvolvimento de diabetes *mellitus* pelos pais e não das mães, quando nenhum dos dois é ainda diabético na altura da conceção⁽³¹⁾. Outro estudo nessa mesma população demonstrou que a descendência resultante de pais com desenvolvimento precoce de diabetes tipo 2, era mais magra do que aquela resultante de mães com desenvolvimento precoce de diabetes tipo 2 ou de casais saudáveis em que nem a mãe nem o pai desenvolveram diabetes até aos 50 anos de idade⁽²⁰⁾. Os casos em humanos mais estudados correspondem ao período de restrição calórica intensa que ocorreu no final da segunda guerra mundial, quando os alemães ocuparam a Holanda. Nesse período verificou-se uma maior predisposição dos indivíduos então gerados para o desenvolvimento de doenças metabólicas, como a diabetes *mellitus* ou obesidade^(12, 13, 21), assim como doenças cardiovasculares e hipertensão⁽²¹⁾. Estas observações foram também consolidadas pelos estudos que se focaram na época de fome ocorrida na China durante 1959 e 1961, em que o risco de doenças metabólicas aumentou devido à restrição alimentar durante a gestação sucedida pelo consumo de uma dieta rica em calorias de estilo ocidental⁽¹⁴⁾. Assim, embora os mecanismos moleculares permaneçam desconhecidos, e apenas estejam a ser dados os primeiros passos na investigação desses processos, é inegável que o estado nutricional e metabólico do pai induz alterações epigenéticas que são posteriormente passadas aos filhos, e podem induzir alterações no perfil metabólico da descendência.

> PERSPETIVAS FUTURAS

Existem então estudos com evidências convincentes de que a exposição dos pais a determinados perfis metabólicos pode ter consequências nas gerações seguintes, sendo que parecem ser os mecanismos epigenéticos os que medeiam a transmissão à descendência desse perfil metabólico desfavorável. No caso da diabetes *mellitus*, apesar de as evidências serem fortes, ainda não foi completamente demonstrada uma herança transgeracional da doença. No entanto, as alterações epigenéticas são de modo geral reversíveis, passíveis de serem prevenidas, ou mesmo revertidas. Como tal, é realista a expectativa de que o seu papel no desenvolvimento da diabetes *mellitus*, particularmente a diabetes tipo 2, possa ser minimizado. Isso contribuiria para, pelo menos, abrandar o

aumento da incidência e prevalência da doença. Num futuro próximo, a identificação de marcadores epigenéticos nos gâmetas pode permitir detetar a suscetibilidade da descendência a determinadas doenças metabólicas e/ou ainda fornecer informação sobre a exposição dos pais a determinados fatores ambientais ou comportamentais. Este tipo de informação pode ser crucial para pais que planeiam a sua gravidez contribuindo para uma decisão informada e mais cuidadosa. Mudanças comportamentais e de estilo de vida, assim como um melhor controlo glicémico aquando da conceção, são recomendações que devem ser sugeridas a ambos os pais e não somente ao elemento feminino do casal, com o argumento de que isso pode diminuir a probabilidade de os filhos virem a desenvolver doenças metabólicas ou complicações relacionadas. Não é, todavia, conveniente a diabolização da herança epigenética, pois esta serve também para transmitir informação relevante à descendência sobre o ambiente que os pais vivenciaram, o que traz vantagens adaptativas óbvias.

A identificação de marcadores epigenéticos nos gâmetas associados a informação deletéria para a descendência pode ser assim uma estratégia importante para prevenir doenças não genéticas. Deve então ser feito um esforço para identificar genes humanos ou marcadores epigenéticos associados a essas doenças, e para isso são necessários mais estudos de sequenciação de genoma de modo a estabelecerem-se perfis epigenéticos. Estudos em gémeos monozigóticos podem também ser uma mais-valia na procura por esses genes e/ou marcadores. O estudo da transmissão epigenética de informação deletéria por parte do pai é complicado pela quantidade de variáveis que podem surgir durante a conceção. Por exemplo, a dieta da mãe durante a gravidez e mesmo a amamentação podem mascarar os efeitos ou exacerbá-los, e até conduzir a conclusões erradas.

Cabe ainda salientar que para além de surgirem do próprio DNA genómico, os RNA transferência também têm origem em vesículas de transporte a partir do epidídimo, designados de epididimossomas, e têm sido por isso sugeridos como um veículo de informação entre as células somáticas e os espermatozoides, transportando particularmente informações sobre o estado nutricional do pai ⁽²⁶⁾. Embora os estudos sobre a interação estado nutricional-célula somática-esperma sejam muito preliminares e os primeiros resultados estejam apenas a surgir agora, é provável que células somáticas testiculares, como as células de Sertoli, responsáveis pelo suporte físico e nutricional da espermatogénese, possam desempenhar um papel preponderante neste processo. Assim,

não serão apenas os gâmetas os responsáveis pela mediação da informação epigenética que passa para a descendência.

Tendo em conta o que foi discutido aqui, é possível concluir que a compreensão dos mecanismos epigenéticos pode ajudar na luta contra a epidemia de diabetes dos tempos modernos. O papel do pai na epigenética da diabetes *mellitus* está a ser investigado e tem sido lenta, mas progressivamente, revelado. <

Conflito de interesses

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses, nem qualquer fonte de financiamento externo na realização deste artigo.

BIBLIOGRAFIA

1. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*. 2001; 106(1): 23-34.
2. Sommese L, Zullo A, Mancini FP, Fabbri R, Soricelli A, Napoli C. Clinical relevance of epigenetics in the onset and management of type 2 diabetes mellitus. *Epigenetics*. 2017; 12(6): 401-15.
3. Arnes L, Sussel L. Epigenetic modifications and long noncoding RNAs influence pancreas development and function. *Trends Genet*. 2015; 31(6): 290-9.
4. Huber A, Menconi F, Corathers S, Jacobson EM, Tomer Y. Joint genetic susceptibility to type 1 diabetes and autoimmune thyroiditis: from epidemiology to mechanisms. *Endocr Rev*. 2008; 29(6): 697-725.
5. Stefan M, Zhang W, Concepcion E, Yi Z, Tomer Y. DNA methylation profiles in type 1 diabetes twins point to strong epigenetic effects on etiology. *J Autoimmun*. 2014; 50: 33-7.
6. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 2001; 293(5532): 1089-93.
7. Anway MD, Leathers C, Skinner MK. Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endocrinology*. 2006; 147(12): 5515-23.
8. Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PloS one*. 2013; 8(1): e55387.
9. Heard E, Martienssen RA. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell*. 2014; 157(1): 95-109.
10. Baz B, Riveline JP, Gautier JF. Endocrinology of Pregnancy: Gestational diabetes mellitus: definition, aetiological and clinical aspects. *Eur J Endocrinol*. 2016; 174(2): R43-51.
11. Ma RC, Tutino GE, Lillycrop KA, Hanson MA, Tam WH. Maternal diabetes, gestational diabetes and the role of epigenetics in

- their long term effects on offspring. *Prog Biophys Mol Biol.* 2015; 118(1-2): 55-68.
12. Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, Kaneda M, Kuramochi-Miyagawa S, Obata Y, et al. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature.* 2008; 453(7194): 539-43.
 13. Suh N, Blelloch R. Small RNAs in early mammalian development: from gametes to gastrulation. *Development.* 2011; 138(9): 1653-61.
 14. Zhao Y, Li Q, Yao C, Wang Z, Zhou Y, Wang Y, et al. Characterization and quantification of mRNA transcripts in ejaculated spermatozoa of fertile men by serial analysis of gene expression. *Hum Reprod.* 2006; 21(6): 1583-90.
 15. Gapp K, Jawaid A, Sarkies P, Bohacek J, Pelczar P, Prados J, et al. Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat Neurosci.* 2014; 17(5): 667-9.
 16. Marczylo EL, Amoako AA, Konje JC, Gant TW, Marczylo TH. Smoking induces differential miRNA expression in human spermatozoa: a potential transgenerational epigenetic concern? *Epigenetics.* 2012; 7(5): 432-9.
 17. Fullston T, Ohlsson Teague EM, Palmer NO, DeBlasio MJ, Mitchell M, Corbett M, 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.* 2013; 27(10): 4226-43.
 18. Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature.* 2009; 460(7254): 473-8.
 19. Brykczynska U, Hisano M, Erkek S, Ramos L, Oakeley EJ, Roloff TC, et al. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol.* 2010; 17(6): 679-87.
 20. Hackett JA, Surani MA. Beyond DNA: programming and inheritance of parental methylomes. *Cell.* 2013; 153(4): 737-9.
 21. Hackett JA, Zyllicz JJ, Surani MA. Parallel mechanisms of epigenetic reprogramming in the germline. *Trends Genet.* 2012; 28(4): 164-74.
 22. Chen P, Piaggi P, Traurig M, Bogardus C, Knowler WC, Baier LJ, et al. Differential methylation of genes in individuals exposed to maternal diabetes in utero. *Diabetologia.* 2017; 60(4): 645-55.
 23. del Rosario MC, Ossowski V, Knowler WC, Bogardus C, Baier LJ, Hanson RL. Potential epigenetic dysregulation of genes associated with MODY and type 2 diabetes in humans exposed to a diabetic intrauterine environment: an analysis of genome-wide DNA methylation. *Metab Clin Exp.* 2014; 63(5): 654-60.
 24. West NA, Kechris K, Dabelea D. Exposure to Maternal Diabetes in Utero and DNA Methylation Patterns in the Offspring. *Immunometabolism.* 2013; 1: 1-9.
 25. Sharma U, Conine CC, Shea JM, Boskovic A, Derr AG, Bing XY, et al. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science.* 2016; 351(6271): 391-6.
 26. Chen Q, Yan M, Cao Z, Li X, Zhang Y, Shi J, et al. Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science.* 2016; 351(6271): 397-400.
 27. Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, et al. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell.* 2010; 143(7): 1084-96.
 28. Ng SF, Lin RC, Laybutt DR, Barres R, Owens JA, Morris MJ. Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature.* 2010; 467(7318): 963-6.
 29. Wei Y, Yang CR, Wei YP, Zhao ZA, Hou Y, Schatten H, et al. Paternally induced transgenerational inheritance of susceptibility to diabetes in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111(5): 1873-8.
 30. Kaati G, Bygren LO, Edvinsson S. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *Eur J Hum Genet.* 2002; 10(11): 682-8.
 31. Pembrey ME, Bygren LO, Kaati G, Edvinsson S, Northstone K, Sjöström M, et al. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur J Hum Genet.* 2006; 14(2): 159-66.
 32. Donkin I, Versteyhe S, Ingerslev LR, Qian K, Mechta M, Nordkap L, et al. Obesity and Bariatric Surgery Drive Epigenetic Variation of Spermatozoa in Humans. *Cell Metab.* 2016; 23(2): 369-78.
 33. Lambrot R, Xu C, Saint-Phar S, Chountalos G, Cohen T, Paquet M, et al. Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes. *Nat Commun.* 2013; 4: 2889.
 34. Fullston T, Palmer NO, Owens JA, Mitchell M, Bakos HW, Lane M. Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice. *Hum Reprod.* 2012; 27(5): 1391-400.
 35. Anderson LM, Riffle L, Wilson R, Travlos GS, Lubomirski MS, Alvord WG. Preconceptional fasting of fathers alters serum glucose in offspring of mice. *Nutrition.* 2006; 22(3): 327-31.
 36. Palmer NO, Bakos HW, Owens JA, Satchell BP, Lane M. Diet and exercise in an obese mouse fed a high-fat diet improve metabolic health and reverse perturbed sperm function. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012; 302(7): E768-80.