



Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Centro Acadêmico de Vitória – CAV

Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica – PPGNAFPF

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA BIOENERGÉTICA
MITOCONDRIAL E ESTADO REDOX EM TECIDO
HEPÁTICO DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À
RESTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL**

REGINALDO CORREIA DA SILVA FILHO

Vitória de Santo Antão, 2017



Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Centro Acadêmico de Vitória – CAV

Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica – PPGNAFPF

AVALIAÇÃO DA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E ESTADO REDOX EM TECIDO HEPÁTICO DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL

REGINALDO CORREIA DA SILVA FILHO

Orientadora: Dr. Mariana Pinheiro Fernandes

Co-orientador: Dr. Leonardo dos Reis Silveira

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica, área de concentração em Bases Experimentais e Clínicas da Plasticidade Fenotípica, para a obtenção do título de Mestre.

Vitória de Santo Antão, 2017

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Roseane Souza de Mendonça, CRB4-1148

S586a Silva Filho, Reginaldo Correia da.
Avaliação da bioenergética mitocondrial e estado redox em tecido hepático de ratos adultos submetidos à restrição proteica perinatal / Reginaldo Correia da Silva Filho. Vitória de Santo Antão, 2017.
107f.

Orientadora: Mariana Pinheiro Fernandes.
Coorientador: Leonardo dos Reis Silveira.
Dissertação (Mestrado em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica, 2017.
Inclui Referências e Anexos.

1. Plasticidade fenotípica. 2. Restrição proteica – Ratos. 3. Bioenergética mitocondrial – Ratos - Avaliação. 4. Estado redox – Ratos – Avaliação. I. Fernandes, Mariana Pinheiro (Orientadora). II. Silveira, Leonardo dos Reis (Coorientador). III. Título.

612.3 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-079/2017

REGINALDO CORREIA DA SILVA FILHO

**AVALIAÇÃO DA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E ESTADO REDOX
EM TECIDO HEPÁTICO DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À
RESTRICÇÃO PROTEICA PERINATAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Bases Experimentais e Clínicas da Plasticidade Fenotípica.

Aprovado em: 24/02/2017.

Orientador (a): Dr.^a Mariana Pinheiro Fernandes
Universidade Federal de Pernambuco

Dr.^a Erika Maria Silva Freitas
Universidade Federal de Pernambuco

Dr.^a Carol Virgínia Gois Leandro
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. João Henrique da Costa Silva
Universidade Federal de Pernambuco

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Prof^a Dr^a Mariana Pinheiro Fernandes, que tem sido minha mentora desde a graduação. Esses anos sob sua orientação me proporcionaram experiências fundamentais que contribuíram para me formar como um ser humano melhor. Recebi lições que me ensinaram a agir com conduta e a trilhar o caminho da ciência com ética e discernimento.

Na vida sempre nos dizem que podemos ouvir muitos “não”, mas também que precisamos aproveitar as oportunidades que surgem. Mariana, sem ao menos me conhecer, foi a primeira a me dar oportunidades, quem se dedicou a compartilhar seus conhecimentos e não mediu esforços para abrir portas que me dessem boas escolhas. Com isso, eu aprendi a ser um apaixonado pelo o que faço.

Agradeço principalmente pela amizade. Nem sempre realizamos nossos trabalhos com facilidade. Passamos por circunstâncias difíceis, mas sempre à vi determinada diante dos desafios. Cresci neste laboratório ouvindo dela que “O Nordeste é acima de tudo um forte.” Essa frase resume tudo o que passamos, tudo o que está por vir nesse caminho que escolhemos.

No meio científico conhecemos pessoas incríveis e pessoas de todos os tipos. Agradeço todos os dias por ter uma orientadora com tamanha competência e coerência. Tenho muito respeito por sua capacidade intelectual, pela forma como conduz seu trabalho e por esse motivo eu a vejo com admiração, como o profissional que eu pretendo me tornar. Um modelo de pessoa e líder.

Com todo o meu carinho, dedico este belo trabalho a pessoa que tem me preparado para a vida. Meu mais sincero obrigado.

"O sertanejo é, antes de tudo, um forte. Não tem o raquitismo exaustivo dos mestiços do litoral. A sua aparência, entretanto, no primeiro lance de vista, revela o contrário (...). É desgracioso, desengonçado, torto. Hércules- Quasimodo (...) é o homem permanentemente fatigado (...). Entretanto, toda essa aparência de cansaço ilude (...). No revés o homem transfigura-se. (...) e da figura vulgar do tabaréu canhestro reponta, inesperadamente, o aspecto dominador de um titã acobreado e potente, num desdobramento surpreendente de força e agilidade extraordinárias."

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, pelo apoio, por compreender minha ausência e por acreditar que eu sempre alcançaria grandes conquistas. Agradeço em especial à minha Mãe Maurizete, quem sempre fez um pouco mais para que eu tivesse boas oportunidades. Minha eterna gratidão. Amo vocês.

Agradeço imensamente à minha orientadora e acima de tudo amiga, Dra. Mariana Pinheiro Fernandes, que me acolheu, lutou por minhas oportunidades e tem se dedicado para me moldar como um profissional capacitado e de caráter. Tenho em mim, com muito amor, o melhor de você.

À Dr. Ana Catarina Rezende Leite, que tem sido amiga e um braço forte com suas colaborações. Agradeço por também contribuir com meu aprendizado e por sempre acreditar em minha capacidade.

Ao Grupo de Pesquisa em Bioenergética Mitocondrial, Metabolismo Celular e Plasticidade Fenotípica e aos que já fizeram parte do nosso laboratório, pelos anos de convivência e aprendizados ao lado de todos vocês. Meu obrigado a Dr. Claudia Lagranha, Talitta, Aiany, Luciana, Cristiane, Alessandra, David, Diorginis, Rudá, Cássia, Diêgo, Aline, Anderson, Róger, Shirley e Gizele.

Ao Dr. Leonardo dos Reis Silveira do Instituto de Biologia da UNICAMP, por ter aceitado ser co-orientador deste trabalho e pelas contribuições e aos seus alunos por colaboração e amizade durante minha visita ao seu laboratório. Meus agradecimentos a Michel, Lucas, Eveline, Luciana, Hygor, Carlos, Tanes e as técnicas de laboratório Rafaela e Tamara.

À Dra. Karina Lidianne Alcântara Saraiva e Dra. Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo do Instituto de Pesquisa Ageu Magalhães, pela colaboração nesse trabalho, obrigado.

Aos colegas Gilson, Luís, Adauto e Fernando da UNICAMP que me receberam em sua casa para que eu pudesse realizar meus experimentos.

Ao amigo Fernando Teixeira que sempre torce por mim. Muito obrigado pela amizade.

Aos amigos que fiz durante esse mestrado, Tercya, Deborah, Gustavo, Sávio, Félix, Gabriela, Mayara e Katharine. Nós passamos por muitas coisas juntos. Foi tenso, mas também bom e gratificante.

Aos amigos José Atil, Nilzete de Oliveira, e seus filhos, Joyce, Eduardo e Enzo, e ao Ir. Eduardo D'Amorim, obrigado por todo carinho que tenho recebido. Vocês são minha segunda família.

Aos amigos Édson e Yuri, irmãos de longa data, prezo muito por nossa amizade e por saber que torcem por mim. Espero que vocês também façam grandes conquistas.

Aos meus meninos Neto, Orlando, Adelson, Steve e Xico. Vocês são únicos e tem me ensinado muito sobre amizade. Também são meus irmãos. Obrigado.

À Ricardo, também um dos meus meninos, agradeço por ser meu confidente, por permitir que nossa amizade se tornasse verdadeiramente grandiosa. Obrigado por compartilhar seus momentos comigo, por saber me ouvir e sempre se me manter otimista. Somos IRMÃOS de alma e sei que estaremos sempre juntos para tudo. Obrigado, grande sonhador.

Aos professores que fizeram parte da banca de qualificação, Ana Catarina, Claudia Lagranha e João Henrique. Suas contribuições foram valiosas para enriquecer meu trabalho. Obrigado.

Aos professores que fizeram parte da banca de defesa, Erika Freitas, Carol Leandro e João Henrique. Obrigado por enriquecer meu trabalho.

Ao suporte financeiro da FACEPE e CAPES.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Anatomia bioquímica de uma mitocôndria	26
Figura 2. Cadeia transportadora de elétrons	28
Figura 3. Cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e teoria quimiosmótica	29
Figura 4. Modelo proposto para explicar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) na membrana mitocondrial interna e ação dos sistemas antioxidantes	30
Figura 5. Representação esquemática dos sistemas de transporte de Ca ²⁺ mitocondrial-retículo endoplasmático/sarcoplasmático (ER/SR) e ações da sinalização do Ca ²⁺	32

RESULTADOS

Figura 1. High rate of mitochondrial oxygen consumption by low protein animals without change on respiratory control ratio	72
Figura 2. Mitochondrial calcium resistance prevents against mitochondrial swelling	73
Figura 3. Effect of protein restriction on the $m\Delta\Psi$	74
Figura 4. Ca ²⁺ does not stimulate liver mitochondrial ROS production on maternal protein restriction	75
Figura 5. Biomolecules are preserved against oxidative stress in liver low protein animals	76
Figura 6. Evaluation of liver enzymatic antioxidant system activity	77
Figura 7. The liver redox state presents a positive balance in low protein animals	78
Figura 8. Analysis of the enzyme activity of the metabolism of carbohydrates, lipids and citric acid cycle in the liver	79
Figura 9. In liver mitochondrial biogenesis and metabolic enzymes are downregulated, but mitochondrial fusion is stimulated	80
Figura 10. Expression of proteins in liver	81
Figura 11. Maternal protein restriction alter the liver glycogen content and mitochondrial morphology and mitochondria ER-interaction (Fig. A-D)	82
Figura 11. Maternal protein restriction alter the liver glycogen content and mitochondrial morphology and mitochondria ER-interaction (Fig. E-H)	83

LISTA DE ABREVIATURAS

AT(D)P	adenosina tri (di) – fosfato
Ca ²⁺	cálcio
CCCP	cianeto de carbonila m-clorofenil hidrazona
CsA	ciclosporina A
CTE	cadeia de transporte de elétrons
DNA _{mt}	DNA mitocondrial
EGTA	etileno glico – bis(b-aminoetil éter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético
EROs	espécies reativas de oxigênio
FADH ₂	flavina adenina dinucleotídeo reduzido
Fe ²⁺	ferro
GPx	glutaciona peroxidase
GR	glutaciona redutase
GSH	glutaciona reduzida
GSSG	glutaciona oxidada
H ₂ DCF-DA	diacetato de diclorodihidrofluoresceína
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])
K ⁺	Potássio
MFR	mitocôndria de fígado de rato
Mg	Magnésio
Mfn2	mitofusina 2
MnSOD	superóxido dismutase dependente de manganês
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado oxidado)
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado reduzido)

NADP ⁺	nicotinamida adenina dinuclotídeo fosfato (estado oxidado)
NADPH	nicotinamida adenina dinuclotídeo fosfato (estado reduzido)
NO [•]	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
O ₂ ^{•-}	ânion superóxido
OH [•]	radical hidroxil
ONOO ⁻	peroxinitrito
OPA1	proteína de atrofia óptica 1
Pi	fosfato inorgânico
PTPM	poro de transição de permeabilidade mitocondrial
SNO	S-nitrosotióis
TPM	transição de permeabilidade mitocondrial
UCP	Proteína Desacopladora (Uncoupling Protein)
UQ	ubiquinona (coenzima Q oxidada)
UQH [•]	radical semiquinona
UQH ₂	ubiquinona (coenzima Q reduzida)
ΔpH	gradiente químico de prótons
ΔΨ	potencial elétrico
ΔΨ _m	potencial elétrico de membrana mitocondrial

RESUMO

Plasticidade fenotípica pode ser definida como a propriedade de um genótipo individual gerar diferentes fenótipos, quando exposto a diferentes condições ambientais. O desenvolvimento fetal em mamíferos ocorre de forma complexa e envolve diferentes processos que são regulados por vias de sinalização. No entanto, essas vias de sinalização podem ser influenciadas pela interação entre fatores fetais intrínsecos (por exemplo, genética) e fatores ambientais extrínsecos (por exemplo, nutrição placentária e peso materno antes da gestação), podendo culminar em desenvolvimento anormal de órgãos. Apesar disso, um ambiente fetal inadequado não necessariamente resultará num desenvolvimento deletério e poucos estudos têm mostrado os mecanismos envolvidos na plasticidade do fígado frente ao insulto da restrição proteica perinatal. Este órgão atua como sensor inicial de nutrientes e tem um papel fundamental no metabolismo de carboidratos e lipídeos, além de apresentar uma alta capacidade plástica. Todas as etapas da oxidação de carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos convergem no estágio final da respiração celular, em que a energia da oxidação dirige a síntese de ATP nas mitocôndrias. Além da produção de energia, esta organela tem emergido como mecanismo de sinalização, injúria e morte celular. Neste trabalho, objetivamos avaliar o efeito da restrição proteica materna (na gestação e lactação) na bioenergética mitocondrial e estado redox hepático de ratos machos aos 100 dias de vida. Observamos que em animais desnutridos, as mitocôndrias respiram mais rápido, são mais resistentes ao íon Ca^{2+} , produzem menos EROs e mantêm a integridade de suas membranas. Essas mitocôndrias também apresentaram estrutura fusionada, alongadas, o que confere maior resistência e otimização da homeostase energética. Além do mais, o fígado desses animais possui maior expressão do gene PGC-1 α e da proteína PPAR- γ e metaboliza mais ácidos graxos, poupando glicogênio para órgãos glicolíticos. Por fim, o fígado de animais desnutridos possui estado redox positivo e não apresenta estresse oxidativo. Nossos dados permitem sugerir que a plasticidade do fígado de animais cujas mães receberam dieta hipoprotéica durante a gestação e lactação parece estar associada a um mecanismo sinalizado pela maior eficiência das mitocôndrias para manter a homeostase energética e conseqüentemente a homeostase redox celular hepática.

Palavras-chave: Restrição proteica; plasticidade fenotípica; mitocôndrias; metabolismo bioenergético; estresse oxidativo; fígado.

ABSTRACT

Phenotypic plasticity can be defined as the property of an individual genotype generates different phenotypes when exposed to different environmental conditions. Fetal development in mammals occurs in complex ways and involves different processes that are regulated by signaling pathways. However, these signaling pathways may be influenced by the interaction between intrinsic fetal factors (e.g. genetics) and extrinsic environmental factors (e.g. placental nutrition and maternal weight before gestation), which may culminate in abnormal organ development. However, an inadequate fetal environment will not necessarily result in deleterious development and few studies have shown the mechanisms involved in the liver plasticity versus the insult of perinatal protein restriction. This organ acts as initial nutrient sensor and plays a key role on the metabolism of carbohydrates and lipids, besides presenting a high plastic capacity. All steps of the oxidation of carbohydrates, fatty acids and amino acids converge in the final stage of cellular respiration, in which the energy of oxidation directs the ATP synthesis in the mitochondria. In addition to energy production, this organelle has emerged as a mechanism of signaling, injury and cell death. In this work, we aimed to evaluate the effect of maternal protein restriction (in gestation and lactation) on mitochondrial bioenergetics and hepatic redox status of male rats at 100 days of life. We observed that in low protein animals, mitochondria breathe faster, are more resistant to the Ca^{2+} ion, produce fewer ROS and maintain the integrity of their membranes. These mitochondria also presented a fused structure, elongated, which confers greater resistance and optimizes energy homeostasis. Moreover, the liver of these animals has greater expression of the PGC-1 α gene and the PPAR- γ protein and metabolizes more fatty acids, stores glycogen to glycolytic organs. Finally, the liver of low protein animals has a positive redox state and does not present oxidative stress. Our data suggest that liver plasticity of animals whose mothers received low protein diet during pregnancy and lactation seems to be associated with a mechanism signaled by the greater efficiency of mitochondria to maintaining energy homeostasis and consequently hepatic cellular redox homeostasis.

Keywords: Protein restriction; phenotypic plasticity; liver; mitochondria; energetic metabolism; redox state.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Incidência de casos de desnutrição e risco de doenças metabólicas.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Plasticidade fenotípica e o ambiente nutricional.....	18
2.2 O fígado: breve resumo das funções, metabolismo e efeitos sistêmicos da doença hepática	21
2.3 Efeitos da restrição proteica no fígado	24
2.4 Mitocôndrias: características gerais, transporte de elétrons e fosforilação oxidativa	26
2.5 Geração de espécies reativas de oxigênio e sistemas antioxidantes na mitocôndria	30
2.6 Regulação do cálcio e transição de permeabilidade mitocondrial.....	33
2.7 Biogênese e dinâmica mitocondrial	36
3. HIPÓTESE	39
4. OBJETIVOS	40
4.1 GERAL	40
4.2 ESPECÍFICOS.....	40
5. MATERIAL E MÉTODOS	41
6. RESULTADOS	52
ARTIGO QUE SERÁ SUBMETIDO AO THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY	52
7. CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	88
APÊNDICES	103
APÊNDICE 1 – Artigo publicado em colaboração.	103
APÊNDICE 2 – Artigo publicado em colaboração.	104
APÊNDICE 3 – Esquema proposto para ilustrar o mecanismo envolvido na plasticidade do fígado de ratos machos adultos submetidos à restrição proteica perinatal.....	105
ANEXOS	106
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	106

1. INTRODUÇÃO

1.1 Incidência de casos de desnutrição e risco de doenças metabólicas

Desnutrição pode ser definida como a oferta insuficiente de energia e nutrientes, como proteínas de qualidade que fornecem um balanço adequado de aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais, e uma incapacidade de manter as necessidades corporais para crescimento, manutenção e funções específicas (DE ONIS, MONTEIRO e CLUGSTON, 1993). Em 2015 foi estimado que cerca de 795 milhões de pessoas no mundo se encontram em situação de desnutrição e a prevalência de desnutrição diminuiu de 18,6% em 1990–92 para 10,9% em 2014–16. Apesar desse número estar declinando, a prevalência de desnutrição global permanece inaceitável (FAO, 2014).

Uma das principais consequências atreladas a desnutrição é o baixo peso ao nascer, que ainda continua sendo um problema de saúde global e está correlacionado com consequências a curto e longo prazo. A Organização Mundial de Saúde define baixo peso como peso ao nascer menor que 2.500 g. Baixo peso ao nascer não é apenas um dos maiores preditores de mortalidade pré e neonatal e morbidade, mas os estudos mais recentes mostram que o baixo peso ao nascer influencia o desenvolvimento cognitivo e aumenta os riscos de doenças metabólicas como diabetes e doenças cardiovasculares na vida adulta (RISNES et al., 2011; LARROQUE et al., 2001; WHO, 2014). Indivíduos nascidos com baixo peso (<1.500 g) e estão em fase de lactação, são caracterizados por apresentar perda de peso nos primeiros dias e semanas de vida devido ao estado catabólico e oferta insuficiente de energia proteica (de BOO e HARDING, 2007).

No Brasil, alguns estudos epidemiológicos demonstraram a estreita relação entre desordens nutricionais no período perinatal e desenvolvimento de doenças na fase adulta (SAWAYA et al., 2003). O índice de desnutrição se encontra em 1,6% (2007-2014) (WHO, 2015). Na região Nordeste do Brasil, este quadro é particularmente preocupante visto a prevalência elevada de desnutrição e anemia em períodos precoces da vida, e de síndrome metabólica na vida adulta. Os dados da III Pesquisa Estadual de Saúde e

Nutrição – IIPESN/2006, Estado de Pernambuco, apontam 8,7% de prevalência de baixo “peso ao nascer” em crianças menores de cinco anos. No Nordeste, um estudo realizado no estado do Ceará, verificou que a prevalência de desnutrição em crianças abaixo dos três anos de idade reduziu de 12,6% em 1987 para 4,7% em 2007 (CORREIA et al, 2014).

Estudos mostram que o baixo peso ao nascer está relacionado com o risco de desenvolvimento de fenótipos metabólicos anormais como obesidade e diabetes na vida adulta, tanto em ratos quanto em humanos e uma associação com o desenvolvimento de resistência à insulina em músculo esquelético e fígado, além de diminuição da secreção de insulina (OZZANE et al., 2005; VAAG et al., 2006; HALES; BARKER, 2001; JENSEN et al., 2008; OZZANE et al., 2008; BRONS et al., 2008).

Atualmente, cerca de 45% das causas de morte de crianças abaixo dos cinco anos de idade se deve a desnutrição (BLACK et al., 2013). Segundo a Organização Mundial de Saúde, a taxa global de desnutrição infantil declinou de 25% em 1990 para 15% em 2013. Em 2014 aproximadamente 50 milhões de crianças abaixo dos cinco anos apresentam algum quadro de desnutrição, das quais 16 milhões se encontram em desnutrição severa (WHO, 2014).

Nota-se que, além da diminuição do nível global de desnutrição, também ocorre uma transição do estado nutricional, que está refletindo na prevalência de sobrepeso/obesidade em crianças menores de cinco anos de idade.

A obesidade é caracterizada como uma doença comum, onde a quantidade de massa gorda é desproporcional em relação a estatura corporal (IAN; ASHISH, 2016). Esse excesso de peso pode ser resultante de um desbalanço energético, no qual a ingesta alimentar é maior que o gasto calórico, e/ou também pode ser causada por desordens nos sistemas de regulação do balanço energético (JEQUIER, 2002; REYNOLDS et al, 2015).

Nos dias atuais, com o desenvolvimento econômico, mudanças nos padrões de dieta e estilo de vida sedentário, tem-se aumentado o índice de obesidade e doenças crônicas correlatas. Com isso, as estratégias para o combate às doenças crônico-degenerativas devem ser priorizadas desde as fases iniciais da vida (BHUTTA et al, 2013; IFPRI, 2014). De acordo com os dados mais recentes da Organização Mundial da

Saúde, UNICEF e *Word Bank Group*, estima-se que de 1990 a 2014 o índice global de sobrepeso em crianças com menos de cinco anos de idade subiu de 31 milhões para 41 milhões (UNICEF; WHO; WBG, 2015).

Nas últimas décadas o estado nutricional do Brasil também tem se modificado. Apesar da diminuição do número de casos de desnutrição, o estado nutricional da população ainda é preocupante. Em 2008-2009, a cada dois brasileiros adultos, um apresentou sobrepeso e a cada seis homens, um apresentou obesidade, enquanto que entre as mulheres, uma a cada oito se encontram no mesmo quadro (CONDE; MONTEIRO, 2014). Em 2010 a prevalência da desnutrição na população brasileira atingiu 2,7%, enquanto a obesidade chegou a 14,8% da população (IBGE, 2010). Se a tendência do aumento de casos de obesidade se mantiver, estima-se que em 2050 o índice de pessoas com sobrepeso/obesidade em brasileiros adultos chegue a 70% (RTVELADZE et al., 2013).

A desnutrição vem sendo apontada como um dos principais fatores não genéticos implicados na etiologia de doenças metabólicas associadas à obesidade (BARKER, 2007). O mecanismo subjacente parece estar associado aos efeitos irreversíveis da desnutrição no período crítico do desenvolvimento alterando o padrão de eventos celulares, com consequências deletérias tanto na aquisição de padrões fisiológicos maduros do organismo quanto para a ocorrência de eventos metabólicos (LUCAS, 2000).

Apesar de alguns estudos epidemiológicos mostrarem a relação entre plasticidade fenotípica fetal e doenças crônico-degenerativas, pouco se sabe dos mecanismos bioquímicos e moleculares indutores dessas doenças. Neste contexto, parece acontecer um paradoxo entre desnutrição e sobrepeso/obesidade.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Plasticidade fenotípica e o ambiente nutricional

Plasticidade fenotípica pode ser definida como a propriedade de um genótipo individual gerar diferentes fenótipos, quando exposto a diferentes condições ambientais. A plasticidade pode ser expressa nos aspectos bioquímicos, fisiológicos, em diferentes níveis comportamentais ou de desenvolvimento (PIGLIUCCI; MURREN; SCHLICHTING, 2006).

O desenvolvimento fetal em mamíferos ocorre de forma complexa e envolve diferentes processos que inclui a morulação, gastrulação e organogênese e cada etapa é modulada por processos de diferenciação celular, migração, proliferação e apoptose, que são regulados por vias de sinalização. No entanto, essas vias de sinalização podem ser influenciadas pela interação entre fatores fetais intrínsecos (por exemplo, genética) e fatores ambientais extrínsecos (por exemplo, nutrição placentária e peso materno antes da gestação), podendo culminar em desenvolvimento anormal de órgãos (KOMIYA; HABAS, 2008; HYATT; BUDGE; SYMONDS, 2008; KOOPMAN, 2010).

Apesar disso, um ambiente fetal inadequado não necessariamente resultará num desenvolvimento deletério. Sasaki, Nakagawa e Kajimoto (1982) demonstraram que a prole de fêmeas alimentadas durante a gestação e lactação, com dieta contendo um teor de proteína baixo (10%), médio (18%) e alto (35%), tiveram uma grande taxa de sobrevivência, mesmo quando alimentados, pós-desmame, com dieta igual a de suas mães. Alterações no ambiente ou novas condições ambientais são capazes de gerar adaptações (plasticidade) no organismo (MERILÄ, 2015).

Durante as fases de desenvolvimento de um indivíduo, condições específicas, dentre elas a desnutrição materna, diabetes gestacional e obesidade durante o período crítico do desenvolvimento, que compreende a gestação e lactação, podem contribuir para o surgimento de patologias como a obesidade, na prole, decorrente de alterações metabólicas (LEVIN, 2006). Em revisão, Barua e Junaid (2015) descrevem a relação

entre a exposição materna a diferentes condições ambientais durante a gestação e o desenvolvimento de doenças na vida adulta.

Um dos primeiros dados relacionados com plasticidade surgem de um estudo realizado por Ravelli et al. (1976), onde verificou-se que jovens aos 19 anos, cujas mães foram expostas à fome durante o período de gestação nos anos 1944-1945, se tornaram obesos. Este tipo de evidência foi reforçado em um estudo geográfico realizado na Inglaterra em 1911, associando a taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares com o baixo peso ao nascer (BARKER et al., 1986; BARKER et al., 1989). Outros estudos revelaram a presença de diabetes em homens com baixo peso ao nascer e no primeiro ano de vida (HALLES et al., 1991). Hales e Barker (2001) propuseram então, a “hipótese do fenótipo poupador” para relacionar o baixo peso ao nascer com o desenvolvimento de síndrome metabólica. Essa hipótese sugere que em situação de mal nutrição fetal, o organismo preserva o crescimento de órgãos vitais, como cérebro, e órgãos como o músculo, tende a adaptar seu metabolismo as condições de baixo nutrientes. Dessa forma órgãos que adquirem disfunção podem contribuir para o surgimento de doenças de fórum metabólico na vida adulta (HALES; BARKER 2001; JONES; OZANNE, 2009; VAAG et al., 2012; HALES; BARKER, 2013)

Além disso, registros epidemiológicos correlacionaram o retardo do crescimento intrauterino (IUGR), que é uma anormalidade da gestação e causa baixo peso em neonatos, como estresse oxidativo, mostrando em neonatos uma menor atividade de enzimas antioxidantes e baixos níveis de antioxidantes não-enzimáticos, alto nível de peroxidação lipídica e danos em proteínas e DNA (HRACSKO et al., 2008). Mal nutrição pode levar à um estado pró-oxidante através da formação de proteínas e micronutrientes deficientes. O fato é que proteínas fornecem os aminoácidos necessários para a síntese de antioxidantes, como a glutathiona e albumina, assim como os micronutrientes, como as vitaminas A, C e E, atuam como antioxidantes (WILLCOX; ASH; CATIGNANI, 2004; LUO et al., 2006).

Assim como vários estudos com humanos relatam a correlação entre exposição a diferentes condições ambientais durante a gestação e disfunções no organismo, a pesquisa com modelos animais tem sido utilizada para enfatizar e tentar explicar os diversos mecanismos existentes entre estímulos ou insultos ambientais e o surgimento de doenças.

Um fator importante a respeito da plasticidade fenotípica, parece estar relacionado com o “*mismatch*”, ou seja, quando um indivíduo adaptado à um ambiente específico se depara com um ambiente diferente (BATESON, 2004). Uma recente pesquisa mostrou que a obesidade materna, causou prejuízo na tolerância e sensibilidade à glicose e regulou negativamente a biogênese mitocondrial na prole de ratos. Os mesmos autores ainda mostraram que a desnutrição materna causou na prole um menor efeito desses parâmetros e somente quando essa prole foi alimentada com uma dieta hipercalórica, o prejuízo foi mais intenso apenas quando os animais se tornaram mais velhos que a prole de mães obesas. Isso mostra que insultos nutricionais diferentes podem causar o mesmo efeito, porém, em intensidades diferentes (KAMEL et al., 2014)

A plasticidade fenotípica além de mostrar os efeitos dos insultos perinatais, também demonstra que estímulos podem atenuar algumas consequências deletérias. Geralmente o período da gestação apresenta atividade física mínima, assim como na primeira infância. Dessa forma, todo o investimento materno é direcionado para o metabolismo basal e desenvolvimento somático (WELLS; DAVIES, 1998; WELL, 2003). Corroborando com essa ideia, estudos com animais experimentais mostrou que a atividade física antes e durante a gestação atenuou os efeitos da restrição proteica perinatal, em relação a secreção de insulina em ratos, sugerindo um provável papel compensatório para resistência à insulina e prevenção do diabetes mellitus gestacional (LEANDRO et al., 2012).

Durante anos, os estudos que envolvem plasticidade fenotípica, nutrição e período crítico do desenvolvimento, tem mostrado diversos efeitos fisiológicos envolvendo essas três vertentes. Mas além dos efeitos fisiológicos, as pesquisas vêm tentando explicar as alterações decorrentes de um insulto nesta fase por meio de mecanismos moleculares e bioquímicos.

Considerando o período crítico do desenvolvimento uma fase altamente influenciada pelo ambiente, um estudo realizado por dos Santos Perez et al. (2015), mostrou que uma dieta rica em gordura durante a gestação e lactação causou esteatose hepática e hipercolesterolemia na prole. Já foi mostrado que o músculo da prole adulta de ratos machos, cujas mães foram submetidas a restrição proteica durante a gestação e lactação, apresentaram uma inflexibilidade metabólica, visto que em jejum, a expressão de genes que regula o metabolismo de ácidos graxos está diminuída (DA SILVA

ARAGÃO et al., 2014). No hipotálamo de ratos adultos, filhotes de mães também alimentadas com modelo de restrição proteica durante a gestação e lactação, a expressão de neuropeptídios orexigênicos está aumentada. Aos oito meses de vida, esses animais apresentaram ainda, mais gordura corporal e maior nível de triglicerídeos no plasma que os animais controles (OROZCO-SÓLIS et al, 2014). Em animais pequenos para a idade ao nascer, o fígado apresenta altos níveis de triglicerídeos na terceira semana de vida. Esses animais, no entanto, são filhotes de mães que passaram por restrição calórica durante o período gestacional. O mecanismo parece estar relacionado com alterações transcricionais e regulação epigenética de genes da lipase lipoproteica hepática (ZHU et al., 2016).

A literatura também tem demonstrado prejuízo da fosforilação oxidativa em músculos esqueléticos de ratos que apresentaram um retardo no crescimento intrauterino (SELAK et al., 2003). Estudos recentes de nosso grupo de pesquisa, realizado no Centro Acadêmico de Vitória da UFPE, mostraram que em relação a função mitocondrial, os efeitos da desnutrição perinatal parecem estar ligados ao elevado estresse oxidativo ou associados a disfunção mitocondrial, onde em ratos machos aos 100 dias de vida, cujas mães foram submetidas a restrição proteica perinatal, possuem alteração na função mitocondrial, com aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuição na atividade de enzimas antioxidantes, resultando num desbalanço oxidativo no coração (NASCIMENTO et al., 2014). Em tronco encefálico de ratos adultos submetidos ao mesmo modelo experimental, nosso grupo mostrou mudança no balanço oxidativo, havendo redução da atividade antioxidante (FERREIA et al., 2015), como também prejuízo da bioenergética mitocondrial e alteração do metabolismo oxidativo em tronco de ratos imediatamente após o desmame (FERREIRA et al., 2016). Com isso, podemos sugerir que a desnutrição proteica durante o período crítico do desenvolvimento, pode modular a bioenergética mitocondrial e o estado redox em vários tipos celulares e, possivelmente, também nas células hepáticas.

2.2 O fígado: breve resumo das funções, metabolismo e efeitos sistêmicos da doença hepática

O fígado é um grande órgão e representa aproximadamente 2% da massa corporal de um indivíduo adulto. Anatomicamente o fígado se interpõe entre os sistemas venosos sistêmico e esplênico, o que garante que sua função metabólica seja facilitada. Após circular por capilares do estômago, pâncreas, baço e intestinos, o sangue que chega no fígado através da veia porta, apresenta uma elevada concentração de nutrientes (DHILLON; RANDOLPH, 2012).

Praticamente 80% do tecido hepático é composto de hepatócitos, o restante é constituído de *células de Kupffer* (um tipo de macrófago) e *células estreladas*, que se encontram no espaço de Disse (o qual é composto por fibras reticulares) e, em condições de saúde, podem armazenar lipídeos e vitamina A. Quando em condições de injúria, as células estreladas podem se transformar em fibroblastos e produzirem colágeno, um caso que parece estar relacionado com o desenvolvimento de fibrose e cirrose hepática (DHILLON; RANDOLPH, 2012).

Este órgão apresenta uma alta capacidade plástica. Suas diversas linhagens celulares podem se manter em processo de plasticidade pelo menos até 12 meses após o nascimento e também o fígado tem um importante papel na manutenção de uma unidade feto-placentária, como em situações de restrição do crescimento intrauterino, onde se tem redução dos fatores de crescimento.

O fígado, é capaz de providenciar substratos energéticos de acordo com a demanda do corpo, a partir da modulação neural e reguladores endócrinos. Diferentes sistemas de estoques energéticos são utilizados em momentos de oscilação da ingesta de nutrientes e demanda energética (DHILLON; RANDOLPH, 2012). Recém-nascidos não estocam muito glicogênio, mas um dos primeiros sinais gerados quando estão em um estado alimentado, é o de um elevado aumento dos níveis de insulina para que a glicose entre nas células e seja armazenada na forma de glicogênio e triglicerídeos, principalmente no fígado. Os ácidos graxos livres podem ser convertidos em corpos cetônicos, quando em situação de jejum, ou armazenados como triglicerídeos após alimentação. Já os aminoácidos, esses são transportados via sistema porta e rapidamente sofrem transaminação, desaminação e entram no ciclo da uréia. Como alternativa, esses aminoácidos são utilizados para síntese de quase praticamente todas as proteínas plasmáticas, exceto as imunoglobulinas (DEN BOER et al., 2002; BEATH, 2003).

Alguns tipos celulares dependem exclusivamente de glicose como fonte de energia (por exemplo, eritrócitos, rins e células da retina), outros órgãos, como o cérebro, utilizam a glicose preferencialmente. Em casos de jejum prolongado, o cérebro muda transitoriamente a dependência de glicose para o metabolismo cetogênico. O fígado tem uma alta capacidade de estocar glicogênio e liberar a glicose através da glicogenólise. O estoque de glicogênio é capaz de manter a glicemia adequada por 24 a 48 horas, representando cerca de 250 a 500 mg de glicose. A depender da demanda energética e estado nutricional, o fígado pode mudar rapidamente o metabolismo da quebra do glicogênio para a síntese do glicogênio (glicogênese) ou ainda em casos de déficit energético, produzir glicose a partir de intermediários como o lactato, piruvato e aminoácidos, através de reações anapleróticas (DHILLON; RANDOLPH, 2012). Prematuros apresentam um grande risco de hipoglicemia devido aos pequenos estoques de glicogênio e tecido adiposo e outro fator de grande importância, é sua ineficiência em fazer gliconeogênese. (BEATH, 2003).

O fígado desempenha um papel importante no metabolismo lipídico que consiste na regulação da conversão do excesso de carboidratos em ácidos graxos, esterificação dos ácidos graxos para formar triglicerídeos de transporte e armazenamento, e sintetizar proteínas de transporte (lipoproteínas). Em condições normais, o fígado capta uma quantidade fixa de ácidos graxos livres (não esterificados) da dieta que proporciona a maior fonte de energia para o fígado e o balanço entre a síntese e a esterificação desses ácidos graxos é determinado pelo estado nutricional, em situação de estado alimentado versus estado de oxidação (DHILLON; RANDOLPH, 2012).

O metabolismo de carboidratos e lipídios é orquestrado principalmente pelo fígado, que também tem participação importante no metabolismo das proteínas. Esse órgão é capaz de produzir uma variedade de proteínas que inclui, proteínas de coagulação e proteínas ligantes envolvidas no transporte no plasma (albumina, transferrina, lipoproteínas e haptoglobina, uma proteína de fase aguda que se liga irreversivelmente às hemoglobinas após hemólise). Essas proteínas possuem características diferentes de substratos, modulação e cinética, apesar de partilharem vias de síntese comum e também podem explicar clinicamente respostas à injúrias e doenças. Os níveis de albumina no soro refletem não apenas a produção de aminoácidos disponíveis, mas também o volume de distribuição, as perdas anormais (por exemplo, em casos de ascite, derrame pleural, proteinúria). O fígado é o único produtor de

albumina, o estado nutricional e pressão osmótica do plasma afetam a taxa de produção de albumina (DHILLON; RANDOLPH, 2012). Durante o desenvolvimento fetal, as proteínas do soro do feto atingem um pico no final do primeiro trimestre de gestação e a produção de albumina se inicia por volta da 16ª semana de gestação, se igualando a de um adulto (30–35 g/l) no momento do nascimento (MOWAT, 1994; para revisão ver BEATH, 2003).

A função hepática é de extrema importância para a manutenção do funcionamento de outros órgãos e sua disfunção acarreta em um efeito deletério sistêmico como, cardiomiopatias e encefalopatia hepática. (GROSE; NOLAN; DILLO, 1995; BLEI; OLAFSSON; THERRIEN, 1994; MOLLER; HENRIKSEN, 2008; SOOKOIAN; PIROLA, 2008; BLEI; MAZHAR; DAVIDSON, 2008; DHILLON; RANDOLPH, 2012).

2.3 Efeitos da restrição proteica no fígado

Proteínas desempenham um importante papel na composição estrutural de órgãos e tecidos, assim como na síntese de hormônios proteicos e enzimas, e, sua carência crônica ou ausência de outros substratos pode alterar o equilíbrio dinâmico do metabolismo (TRINDADE et al., 1986).

O fígado desempenha um papel importante como órgão central do metabolismo de nutrientes e uma deficiência de proteína, muitas vezes associada a doenças hepáticas, pode ser consequência de diversos fatores como diminuição da ingestão, diminuição da absorção, anormalidades no metabolismo ou necessidades aumentadas de proteínas. Além disso, a deficiência de outros nutrientes, como carboidratos e vitaminas, em pacientes com doenças no fígado, também acarreta em efeitos negativos no metabolismo de proteínas (MEZEY, 1982).

Algumas disfunções no fígado podem ser decorrentes de alterações no metabolismo como, doença hepática gordurosa não alcoólica, fibrose, cirrose e esteatose hepática, sendo esta última relacionada com diferentes fatores de predisposição, tais como a obesidade, diabetes, dislipidemia, e nutrição parenteral (MATTEONI et al., 1999; FALCK-YTTER et al., 2001).

Em ratos machos da linhagem *Sprague-Dawley*, (QASEM et al., 2015) puderam verificar que dieta materna hipoproteica (8% de proteína) durante o período crítico do desenvolvimento, reduziu o conteúdo de triglicerídeo hepático, acompanhado de uma tendência de alta atividade da carnitina palmitoiltransferase-1, sugerindo um aumento do transporte de ácidos graxos para a matriz mitocondrial. Segundo PETRY et al., (2000), a maior quantidade de catecolaminas circulantes em animais de mães alimentadas com dieta hipoproteica, parece ser responsável pela mobilização de ácidos graxos e com isso se tenha uma maior utilização dos mesmos, em vez de sua síntese. Em exposição pós-natal, a uma dieta rica em gordura durante oito semanas, a prole de camundongos de mães alimentadas com dieta hipoproteica durante a gestação e a lactação, desenvolveu diversos fenótipos, como obesidade, intolerância à glicose e aumento da liberação de glicose hepática. Quando suplementados com taurina, esses animais preservaram o controle da glicose hepática (BATISTA et al., 2012).

Alterações na estrutura do fígado também tem sido reportada, onde o fígado de ratos que passaram por uma restrição proteica apresentou aumento no volume dos lóbulos comparados com os controles. Hipertrofia hepática pode ser desenvolvida por fatores severos que inclui estado oxidativo alterado, metabolismo de ácido graxo, morfologia nuclear e produção de energia e utilização (para revisão ver PRUI et al., 2014).

Estudos relacionados com disfunção hepática têm mostrado que injúrias no fígado podem ser medidas por estresse oxidativo (CHITTURI & FARRELL, 2001; MEHTA et al., 2002, OLIVEIRA et al., 2006). Acredita-se que estresse oxidativo seja a segunda causa de esteatose (YOON e CHA, 2014). Animais alimentados com dieta pobre em metionina e colina apresentaram diminuição de antioxidantes e aumento de produção de EROs e estresse oxidativo no fígado. Os níveis de ATP, GSH e expressão de superóxido dismutase 2 foram menores (FREITAS et al., 2016). Quando associado com crescimento acelerado, restrição proteica provocou no fígado de ratos adultos fibrose, alto nível de estresse oxidativo e inflamação. Esses animais também apresentaram hiperinsulinemia e quando suplementados com coenzima Q10 (ubiquinona) os efeitos deletérios foram atenuados (TARRY-ADKINS et al., 2016).

Relacionando todos esses dados da literatura e de acordo com VEGA et al. (2016), restrição proteica materna durante a gestação é responsável por gerar estresse oxidativo

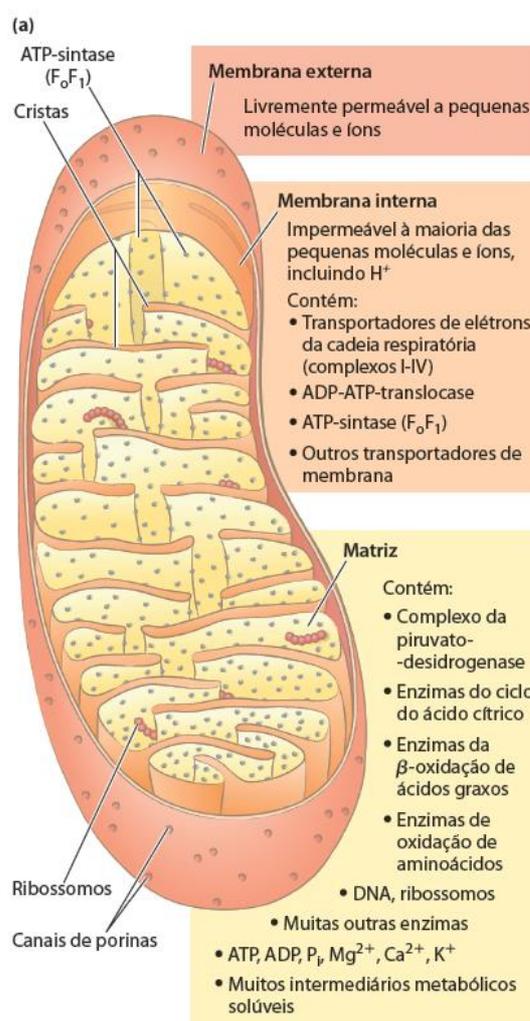
e causa disfunção metabólica tanto na mãe quanto na prole, podendo ser a causa de diversas disfunções hepáticas posteriores.

2.4 Mitocôndrias: características gerais, transporte de elétrons e fosforilação oxidativa

O processo de respiração celular é a forma com que organismos eucarióticos obtém a maior parte de energia para fins metabólicos. Nas células eucarióticas, a respiração ocorre nas mitocôndrias, organelas originadas a partir da endossimbiose de bactérias com respiração proto-eucariotas (FIGUEIRA et al., 2013). As mitocôndrias são organelas que estão presentes em muitas células eucarióticas e desempenham a importante função de converter a energia de óxido-redução em energia química na forma de adenosina trifosfato (ATP), utilizada nos eventos celulares. Todas as etapas da oxidação de carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos convergem no estágio final da respiração celular, em que a energia da oxidação dirige a síntese de ATP (NELSON; COX, 2014).

Duas membranas, uma externa e outra interna, e a matriz, caracterizam anatomicamente a mitocôndria (Figura 1). A membrana externa é lisa, envolve completamente a organela e é permeável a pequenas moléculas e íons que circulam livremente através de canais transmembranas formados por uma família de proteínas integrais de membranas chamadas porinas. A membrana interna é praticamente impermeável e seletiva a maioria de moléculas e íons, incluindo prótons (H^+). Suas circunvoluções formam as cristas mitocondriais. Apenas moléculas que possuem transportadores específicos atravessam a membrana interna. Além disso, na membrana interna encontram-se complexos enzimáticos responsáveis pelo transporte de elétrons, translocases de ATP e ADP, a ATP sintase e outros transportadores de membrana (UCP, canais de Ca^{2+} , canais de K^+ , canais de Pi). Na matriz mitocondrial há enzimas da β -oxidação de ácidos graxos, enzimas da oxidação de aminoácidos, o complexo piruvato desidrogenase, enzimas do ciclo do ácido cítrico, DNA mitocondrial, ribossomos, ATP, ADP, Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Pi e muitos intermediários metabólicos solúveis (NELSON; COX, 2014).

Em 1948, a descoberta feita por KENNEDY e LEHNINGER (1949), de que as mitocôndrias são sítios catalíticos para síntese de ATP nos eucariotos, foi o marco que iniciou a fase moderna dos estudos da transdução de energia em sistemas biológicos (NELSON e COX, 2014). O pesquisador Peter Mitchell, em 1961, introduziu a teoria quimiosmótica para explicar como a diferença de prótons entre as membranas mitocondriais está diretamente ligada a síntese de ATP a partir de processos de oxidação biológica.



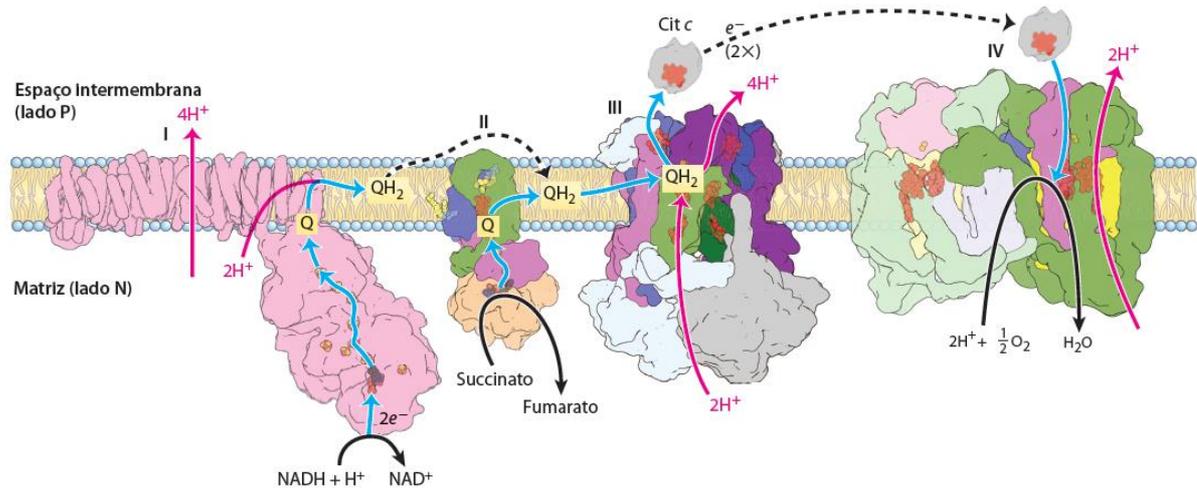
Fonte: NELSON; COX, 2014.

Figura 1 - Anatomia bioquímica de uma mitocôndria. As mitocôndrias variam de tamanho, formato, quantidade e localização, dependendo do tipo e função celular. As circunvoluções da membrana interna (cristas) proporcionam uma superfície muito grande. A membrana interna de uma única mitocôndria de fígado pode ter mais de 10.000 conjuntos de sistemas de transportes de elétrons (cadeias respiratórias) e moléculas de ATP sintase, distribuídas por toda a superfície da membrana (NELSON; COX, 2014).

O mecanismo de transporte de elétrons (Figura 2) ocorre por intermédio de uma série de complexos proteicos denominados de cadeia transportadora de elétrons que agem sequencialmente. Estes, em sua maioria, são compostos por proteínas integrais de membranas (Complexos) que apresentam grupos prostéticos capazes de aceitar ou doar um ou dois elétrons. A entrada de elétrons na cadeia respiratória, ocorre sob a ação de aceptores universais de elétrons – nucleotídeos de nicotinamida (NAD^+ ou NADP^+) ou nucleotídeos de flavina (FMN ou FAD), que captam elétrons de vias catabólicas e os canalizam para desidrogenases (NELSON; COX, 2014).

O Complexo I, também chamado de NADH desidrogenase é capaz de catalisar a transferência de elétrons provenientes da coenzima reduzida NADH, para a ubiquinona (UQ) forma oxidada da coenzima Q, gerando a ubiquinona (UQH_2), forma reduzida da coenzima Q. O Complexo II, succinato desidrogenase, também transfere os elétrons provenientes da coenzima reduzida FADH_2 para a UQ. Sequencialmente, a ubiquinona transfere os elétrons dos complexos I e II para o Complexo III, conhecido como citocromo c oxidoreductase. Em seguida a ubiquinona é desprotonada para a forma semiquinona ($\text{UQH}\cdot$) e os elétrons são transferidos do Complexo III para o Citocromo c, que flui livremente no espaço intermembranas e doa os elétrons para o Complexo IV (citocromo c oxidase). Por fim, o Complexo IV transfere elétrons para o oxigênio, reduzindo este a H_2O (NICHOLLS; FERGUSON, 2002).

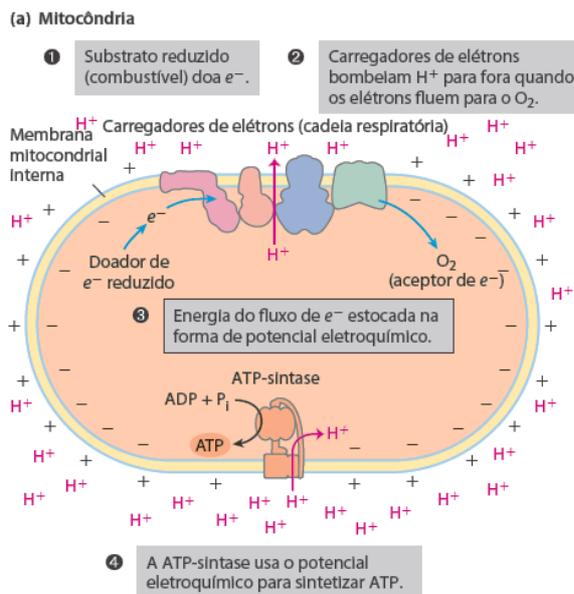
Ao passo que os elétrons são transferidos do Complexo I para a UQ, 4 prótons de H^+ são bombeados para o espaço intermembranas. O mesmo ocorre quando elétrons são transferidos do Complexo III para o citocromo c e 2 prótons de H^+ são bombeados quando os elétrons são transferidos do Complexo IV para o oxigênio (NELSON; COX, 2014).



Fonte: NELSON; COX (2014)

Figura 2 - Cadeia transportadora de elétrons. Os números romanos indicam os quatro complexos respiratórios. Os elétrons do $\text{NADH} + \text{H}^+$ e de outros substratos oxidáveis passam através de uma cadeia de transportadores arranjados assimetricamente na membrana (NELSON; COX, 2014).

A teoria quimiosmótica de Mitchell é o paradigma que explica quimicamente o acoplamento do fluxo de prótons com a fosforilação oxidativa (NELSON; COX, 2014). Para ocorrer a fosforilação oxidativa (**Figura 3**), é fundamental que seja formado um potencial eletroquímico de prótons gerado pela cadeia transportadora de elétrons, responsável pela redução do O_2 à H_2O . Os elétrons ao passar pelos complexos da cadeia respiratória permitem um fluxo de H^+ desde a matriz até o espaço intermembranas, contra um gradiente de concentração. O componente elétrico ($\Delta\psi$) gerado atinge valores aproximados de -180 mV em estado de repouso, enquanto o componente químico (ΔpH) oscila entre 0 e 1 unidade de pH. A cadeia transportadora de elétrons converte a energia de óxido-redução em potencial elétrico de membrana mitocondrial. Conseqüentemente, a favor do gradiente de concentração, os prótons de H^+ retornam à matriz através da FoF1-ATP sintase gerando uma força motriz, cuja energia é então utilizada pela ATP sintase para fosforilar ADP à ATP (MITCHELL, 1961). A geração do gradiente eletroquímico transmembrânico de prótons é um elemento central no aproveitamento de energia em sistemas biológicos. Evolutivamente, este mecanismo é fundamental, sendo usado tanto na fosforilação oxidativa em mitocôndrias quanto na fotossíntese em cloroplastos (NICHOLLS; FERGUSON, 2002).



Fonte: NELSON; COX (2014)

Figura 3 - Cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e teoria quimiosmótica. O fluxo de elétrons é acompanhado pela transferência de prótons através da membrana mitocondrial, produzindo tanto um gradiente químico (ΔpH) quanto elétrico ($\Delta \psi$). A membrana mitocondrial interna é impermeável aos prótons, os quais podem reentrar na matriz através de canais específicos (NELSON; COX, 2014).

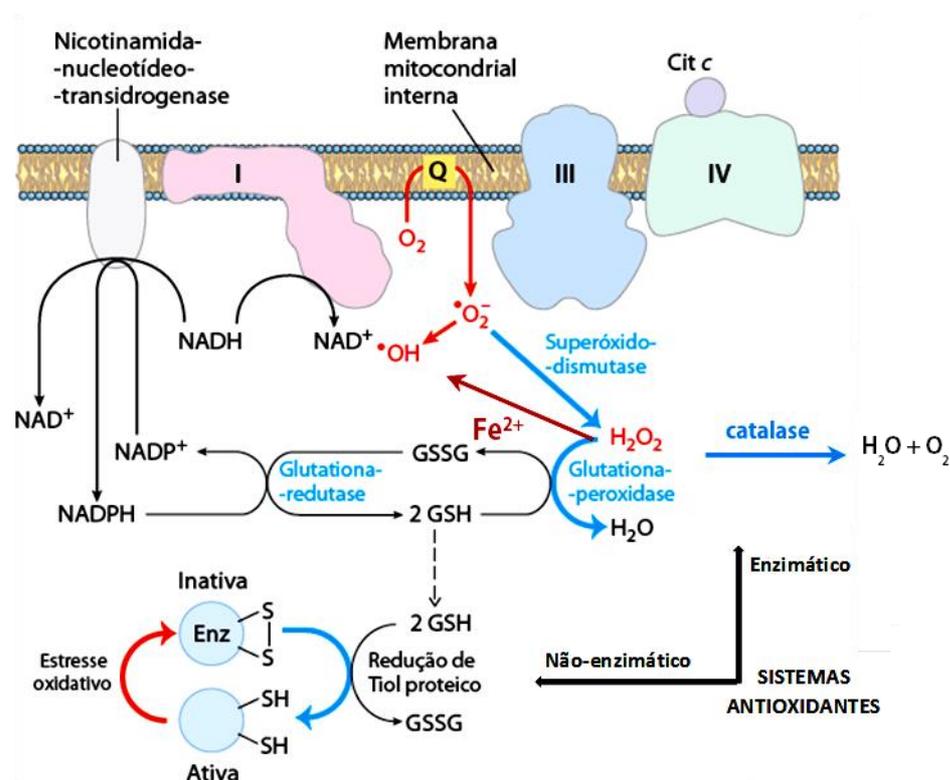
2.5 Geração de espécies reativas de oxigênio e sistemas antioxidantes na mitocôndria

Espécies reativas de oxigênio (EROs) é um termo utilizado para definir diversas moléculas e radicais livres (substâncias químicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados) capazes de causar danos celulares quando em excesso (TURRENS, 2003). Na mitocôndria a geração de EROs é um processo contínuo, fisiológico e necessário para a regulação de diversos processos na célula (HAMANAKA; CHANDEL, 2010; DIKALOV, 2011; TOCCHETTI *et al*, 2011, visto em FIGUEIRA *et al*, 2013).

Durante a transferência de elétrons, pelos complexos da cadeia transportadora, uma pequena porcentagem do oxigênio (2-5%) pode ser naturalmente convertida no radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) (BOVERIS *et al.*, 1973). A partir do ânion superóxido outras espécies reativas são geradas na mitocôndria. Essas espécies, por sua vez, são reguladas por diferentes sistemas antioxidantes, enzimático e não enzimático. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por exemplo, é um produto secundário da dismutação catalisada pela

enzima superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) (CADENAS *et al.*, 1977). Na presença de ferro (Fe^{2+}) o H_2O_2 é convertido no radical hidroxil (HO^\bullet), que possui o tempo de meia vida curto, mas é altamente reativo e é capaz de causar peroxidação lipídica, assim como danificar proteínas (alterando grupamentos tióis presentes nas proteínas) e DNA (visto em HALLIWELL, 2012).

Para manter a geração mitocondrial de O_2^\bullet à nível fisiológico, a mitocôndria utiliza eficientes sistemas antioxidantes, como enzimas tiólicas, MnSOD, glutatona, NADH, NADPH, vitaminas E e C (SUTTON; WINTERBOURN, 1989; WATABE *et al.*, 1997; NETTO *et al.*, 2002). Em situações onde ocorre um desequilíbrio oxidativo e a formação de EROs é maior que a capacidade de detoxificação dos sistemas antioxidantes, gera-se um estado de estresse oxidativo, que pode causar danos mitocondriais. Tanto os lipídios, como as proteínas de membrana e o DNA mitocondrial são alvos de ação de EROs (MEHROTRA *et al.*, 1991; VERCESI 1993; VERCESI; HOFFMANN, 1993; CASTILHO *et al.*, 1994; MERTENS *et al.*, 1995; KOWALTOWSKI *et al.*, 2009).



Fonte: Adaptado de NELSON E COX (2014)

Figura 4 - Modelo proposto para explicar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) na membrana mitocondrial interna e ação dos sistemas antioxidantes (KOWALTOWSKI *et al.*, 2001; adaptado de NELSON; COX, 2014). A cadeia respiratória, inserida na membrana mitocondrial interna,

constantemente gera pequenas quantidades de radicais $O_2^{\cdot-}$. Estes radicais são normalmente removidos pela Mn-superóxido dismutase (MnSOD), que promove a geração de H_2O_2 . O H_2O_2 é então reduzido à H_2O pela glutathione peroxidase (GPx) ou catalase (em mitocôndria de coração). GSH, oxidado pela GPx é recuperado pelo sistema enzimático glutathione redutases (GR), que usa NADPH como doador de elétrons. NADH, que está presente em quantidades reguladas pela respiração, reduz então $NADP^+$ usando a NAD(P) transidrogenase. OH^{\cdot} oxida grupos tiólicos (-SH) do complexo do poro de TPM, levando à formação e abertura do poro. Alternativamente, OH^{\cdot} pode promover permeabilização da membrana através da peroxidação lipídica, um processo fortemente estimulado por P_i .

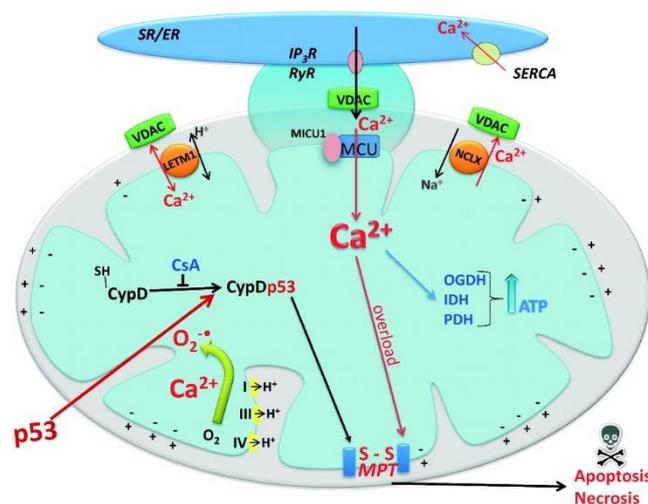
Uma das principais defesas antioxidantes ocorre por ação do sistema antioxidante das glutathionas. Por exemplo, a glutathione peroxidase (GPx) tem um papel determinante nos mamíferos e nos processos de neutralização das EROs (BANERJEE et al., 2003; MOTA, FIGUEIREDO; DUARTE, 2004), já que converte H_2O_2 em água. Quando na presença de alguns metais como Fe^{2+} , Cu^+ e Cu^{2+} , as espécies reativas, por exemplo o H_2O_2 , podem reagir e desencadear uma cascata que sinaliza para a formação de mais espécies reativas. Uma carga desses metais parece comprometer a ação antioxidante de grupos tióis (SH) e atividade de enzimas antioxidantes (MUSACCO-SEBIO et al., 2014). As glutathionas estão presentes nas células em concentrações milimolar e constitui uma base importante da homeostase redox pelo qual tióis de proteínas pode manter seu estado redox ou tióis de proteínas oxidadas pode ser revertido ao seu estado reduzido. Além de atuar como sistema redox, as glutathionas também atuam como doadoras de elétrons, tanto para eliminação de oxigênio reativo, gerado durante a respiração celular e as reações metabólicas, como a redução de hidroperóxidos e peróxidos lipídicos (MEYER; HELL, 2005).

EROs são geradas por respiração nas mitocôndrias e a depender do substrato que a mitocôndria utiliza como fonte de elétrons, mais EROs são geradas. EROs podem ser formadas quando substratos ligados ao NAD são oxidados (STARKOV; FISKUM, 1957; BOVERIS; OSHINO; CHANCE, 1972; TURRENS; ALEXANDRE; LEHNINGER, 1985).

2.6 Regulação do cálcio e transição de permeabilidade mitocondrial

O cálcio (Ca^{2+}) desempenha um importante papel como segundo mensageiro regulando diferentes processos biológicos como, crescimento e diferenciação, motilidade e contração, endocitose, exocitose e secreção, e regulação do metabolismo intermediário (CAMPBELL et al., 1983; PUTNEY; BIRD, 1993; MORENO et al., 1994). Para funcionar apropriadamente, a célula deve manter essa concentração a níveis baixos. Em células de mamíferos, a concentração de Ca^{2+} livre no citosol, em condições de repouso, é mantida na ordem de $0,1 \mu\text{M}$, muito abaixo da concentração do Ca^{2+} extracelular, de 1mM (CARAFOLI, 1987; REED, 1990; NICOTERA et al., 1992).

A Figura 5 demonstra as diferentes sinalizações do Ca^{2+} na mitocôndria. Dentro da matriz mitocondrial, o aumento dos níveis de Ca^{2+} atua como importante ativador da piruvato desidrogenase, enzimas do ciclo do ácido cítrico e componentes da cadeia respiratória (revisado de GUNTER et al, 1994; GUNTER et al., 2000).



Fonte: FIGUEIRA et al., (2013)

Figura 5 - Representação esquemática dos sistemas de transporte de Ca^{2+} mitocondrial-retículo endoplasmático/sarcoplasmático (ER/SR) e ações da sinalização do Ca^{2+} na matriz: O ER/SR gera suficiente $[\text{Ca}^{2+}]$ ($>1 \mu\text{M}$) permitindo uma rápida acumulação de Ca^{2+} pela mitocôndria. Em baixas concentrações, esse cátion estimula a produção de ATP capaz de ativar desidrogenases na matriz, enquanto que uma carga de Ca^{2+} mitocondrial promove TPM estimulado por produção de EROs. Sob condições de desequilíbrio oxidativo mitocondrial, p53 acumula na matriz mitocondrial e desencadeia MPT por interação física com o regulador de poro ciclofilina D (CypD) (FIGUEIRA et al., 2013). Essa

figura foi parcialmente adaptada de HAJNOCZKY e CSORDAS e os conceitos baseados nos seguintes trabalhos: (CSORDAS et al., 2010, GRIJALBA, VERCESI e SCHREIER, 1999, HAJNOCZKY e CSORDAS, 2010, KOWALTOWSKI, CASTILHO, VERCESI, 2001).

Já está bem estabelecido que o influxo de Ca^{2+} mitocondrial serve como mecanismo de sinalização para controle da fosforilação oxidativa e também da geração de EROs. Além disso, desregulação nos níveis de Ca^{2+} na célula leva a um aumento dos níveis de Ca^{2+} no ambiente mitocondrial, que pode conduzir à morte celular por desregulação de ATP e da homeostase redox (GLEICHMANN et al, 2011; GLANCY et al, 2012; HIDALGO et al, 2008; KOWALTOWSKI, 2009; VASEVA et al., 2012; YAN et al.; 2008, visto em FIGUEIRA et al, 2013). O movimento do Ca^{2+} é diretamente ou indiretamente conduzido pela hidrólise do ATP, onde suas funções de sinalização são dependentes do estado energético da célula (GLANCY; BALABAN, 2012). Quando há uma deficiência nos mecanismos que mantem a oferta de ATP na célula, pode ocorrer uma desregulação na sinalização do cálcio comprometendo a função e sobrevivência da célula (HIDALGO e DONOSO 2012). Sob condições fisiológicas, o cálcio internalizado pela mitocôndria é capaz de ativar o ciclo do ácido tricarboxílico, reduzindo equivalentes para a cadeia respiratória em resposta da demanda de ATP.

Já é conhecido que a cadeia respiratória pode sofrer uma alteração ultraestrutural quando o Ca^{2+} intramitocondrial liga-se a cardiolipina na face interna da membrana mitocondrial interna, facilitando a produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e conseqüentemente de H_2O_2 (GRIJALBA et al., 1999). Este lipídeo possui cabeça polar eletronegativa e está presente em altas concentrações (14-23%) na membrana mitocondrial interna, em uma grande variedade de tecidos. Simultaneamente, o Ca^{2+} mobiliza Fe^{2+} na matriz mitocondrial que estimula a reação de Fenton e a produção de radical hidroxil que ataca tióis de proteínas, lipídeos e DNA mitocondrial (MERRYFIELD; LARDY, 1982; CASTILHO et al., 1995; VERCESI et al., 1997).

Alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial interna induzidas por Ca^{2+} podem ocorrer em consequência da ação de EROs geradas na mitocôndria (VERCESI et al., 1993; VERCESI; HOFFMANN, 1993). EROs mitocondrial foram amplamente implicados numa grande variedade de doenças humanas e condições degenerativas, como o envelhecimento (CADENAS; DAVIES, 2000; ANDERSEN, 2004; FUKUI;

MORAES, 2008; BALLINGER, 2005). A homeostase do cálcio, também está relacionada com a integridade da organela por induzir o fenômeno de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM). Sabe-se que a TPM pode ser desencadeada por ação conjunta de altas concentrações de Ca^{2+} na matriz mitocondrial e desbalanço oxidativo (KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001). A TPM é uma permeabilização não seletiva da membrana mitocondrial interna que ocorre em diversos processos fisiopatológicos que pode preceder a morte celular por necrose ou por apoptose. Fortes evidências indicam que a TPM não é uma consequência da abertura de um poro pré-formado, mas sim dos danos oxidativos de proteínas de membrana mitocondrial (SKULACHEV, 1998; KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999).

Nos anos 70, HUNTER e HAWORTH caracterizaram este fenômeno e assim foi sugerido ser o resultado da abertura de um poro de tamanho discreto, capaz de permitir a passagem de moléculas com aproximadamente 1,5 kDa, na membrana mitocondrial interna (HAWORTH E HUNTER, 1979). A respeito da constituição do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM), a literatura demonstra que este é composto por proteínas da membrana interna e externa, como o translocador de nucleotídeos de adenina (ANT) e o canal aniônico voltagem dependente (VDAC) e a ciclofilina-D (CyD), um membro de uma família de isomerases de alta homologia cis-trans peptil-prolil que provavelmente contribui para a abertura desse poro causando modificações estruturais em proteínas da membrana interna (HAWORTH; HUNTER, 1979; ZORATTI; SZABÒ, 1995; BRUSTOVETSKY; KLINGENBERG, 1996; GREEN e REED, 1998; WOODFIELD et al., 1998; CROMPTON, 1999; SCHEFFLER, 2001).

A TPM pode ser estimada de várias maneiras, tais como através da medida de inchamento das organelas, da perda do potencial elétrico de membrana ou ainda da perda da capacidade da mitocôndria em transportar cálcio captado do meio externo (FERNANDES et al., 2014). As mitocôndrias possuem o volume de sua matriz cerca de 1-15% do volume do citosol de uma célula e grandes mudanças na concentração de cálcio pode alterar o espaço da matriz mitocondrial (GLANCY; BALABAN, 2012). As primeiras evidências experimentais relacionadas com a perda da capacidade mitocondrial de reter Ca^{2+} , mostraram que esse processo era estimulado pela oxidação dos nucleotídeos de piridina das mitocôndrias e inibido ou revertido pela redução do NAD(P)^+ (LEHNINGER, et al., 1978).

2.7 Biogênese e dinâmica mitocondrial

Biogênese mitocondrial pode ser definida como o processo pelo qual a célula aumenta individualmente a massa de mitocôndrias, podendo ocorrer por crescimento ou divisão de uma organela pré-existente e é temporariamente controlada por eventuais ciclos celulares, assim como pode ser produzida em resposta a um estímulo oxidativo, a um aumento das necessidades energéticas da célula, pelo treinamento físico, durante o desenvolvimento e em casos de algumas doenças mitocondriais (MULLINS, 2005; ONYANGO et al., 2010; SCARPULLA, 2011). A biogênese mitocondrial é controlada pelos níveis de Ca^{2+} , NO^{\bullet} , tensão de oxigênio e metabolismo energético, todas as condições que estão relacionadas com a mudança no estado redox (DIAZ; MORAES, 2008). Em situações de disfunção mitocondrial, alguns fatores podem ser desencadeados como mecanismo compensatório. Isso inclui aumento da expressão de enzimas antioxidantes, biogênese mitocondrial, expressão de complexos respiratórios, bem como mudança do metabolismo para glicólise (WU; WU; WEI, 2014).

As mitocôndrias são as únicas organelas celulares capazes de replicar o próprio genoma. Seu DNA (mDNA), codifica 13 componentes essenciais da cadeia transportadora de elétrons, assim como RNAs necessários para codificação de proteínas via mDNA, enquanto que a maioria das proteínas mitocondriais são codificadas pelo genoma nuclear (PAGLIARINI et al. 2008; SCARPULLA et al., 2012; LOTZ et al. 2014).

Dentre os principais reguladores da biogênese mitocondrial se destaca o PGC-1 α , um membro da família dos co-reguladores transcricionais que foi primeiramente identificado em tecido adiposo marrom como um ativador do PPAR- γ (PUIGSERVER et al. 1998, DORN, VEJA; KELLY, 2015). O PPAR- γ está envolvido no controle do metabolismo lipídico no fígado e no músculo e sua ativação parece melhorar a β -oxidação de lipídeos (KAWADA et al., 2008). O PGC-1 α potencializa a transcrição ao interagir com outros fatores nucleares que estão dentro da cascata, como o já citado PPAR- γ e o fator respiratório nuclear-1 (NRF-1). O NRF-1 é responsável por regular a expressão da maioria dos complexos da cadeia transportadora de elétrons. Especificamente, o NRF-1 é capaz de ativar um fator de transcrição do genoma

mitocondrial, o fator de transcrição A mitocondrial (TFAM) (GLEYZER et al. 2005; SCARPULLA 2008; SATOH et al. 2013). O TFAM se desloca para a matriz mitocondrial e estimula a replicação do DNAm e de genes da biogênese mitocondrial (TANG, 2016).

Alguns estudos conduzidos em camundongos transgênicos e superexpressão do PGC-1 α tem mostrado que este coativador é importante para dirigir aspectos importantes envolvendo biogênese mitocondrial, incluindo ativação de genes da oxidação de ácidos graxos e cadeia respiratória, aumentando o número de mitocôndrias e aumentando a capacidade respiratória. (PUIGSERVER et al., 1998, LEHMAN et al., 2000; RUSSEL et al., 2004).

As mitocôndrias desempenham uma importante função na bioenergética e no metabolismo de lipídeos e aminoácidos e algumas evidências indicam a ligação entre a bioenergética mitocondrial e sua arquitetura. Ambiente enriquecido está associado com fragmentação das mitocôndrias, enquanto que em situação de fome ou ainda privação nutricional, as mitocôndrias tendem a se alongar. As mitocôndrias possuem uma alta capacidade plástica para modificar sua morfologia. Quando o ambiente nutricional, em que as mitocôndrias se encontram, é pobre, o alongamento dessas organelas permite a manutenção da síntese de ATP para manutenção da viabilidade celular (para revisão ver SCHREPFER; SCORRANO, 2016). A função mitocondrial também sofre grandes influências do estado nutricional. Um ambiente mitocondrial em que há deficiência de nutrientes parece gerar mais EROs e estresse oxidativo, enquanto mitocôndrias cuja oferta de nutrientes é adequada, apresenta, diminuição de danos, assim como diminuição dos riscos de desenvolvimento de síndrome metabólica (para revisão ver LIU et al., 2009).

Para que mitocôndrias se alonguem, um processo denominado de fusão mitocondrial, é necessário a atuação de três proteínas fusogênicas específicas, que atuam em dois passos distintos. Primeiramente as mitofusinas 1 e 2 (Mfn 1e Mfn 2), localizadas na membrana mitocondrial externa, realizam a fusão das membranas externas. Em seguida, a proteína de atrofia óptica 1 (OPA 1) ligada a membrana mitocondrial interna, realiza a fusão das membranas internas (para revisão ver SCHREPFER; SCORRANO, 2016).

Estudos importantes, *in vivo*, com camundongos nocautes para *Mfn1* e *Mfn2*, tem demonstrado que estas proteínas são extremamente importantes para o desenvolvimento desses animais ainda no ambiente intrauterino (CHEN et al., 2007), assim como a deleção da *Mfn2* após a placentação, prejudica o desenvolvimento cerebral e a morte em poucos dias após o nascimento (CHEN et al., 2007). Já a superexpressão da *Mfn2* parece aumentar o potencial de membrana mitocondrial e a oxidação da glicose.

Vários indícios e relatos da literatura apontam os possíveis efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre a fisiologia hepática. Apesar disso, até o presente momento não está esclarecido qual o papel da mitocôndria e estado redox hepático em ratos adultos que sofreram restrição proteica no período da gestação e lactação.

3. HIPÓTESE

A restrição proteica materna durante a gestação e lactação causa alterações na bioenergética mitocondrial e no estado redox em fígado de ratos machos adultos.

4. OBJETIVOS

4.1 GERAL: Avaliar o efeito da restrição proteica perinatal na bioenergética mitocondrial e no estado redox hepático de ratos machos adultos.

4.2 ESPECÍFICOS: Avaliar o efeito da restrição proteica perinatal na (o):

- Função mitocondrial (consumo de oxigênio);
- Bioenergética mitocondrial (inchamento mitocondrial, potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), produção de espécies reativas de oxigênio mitocondrial);
- Estado redox hepático (biomarcadores de estresse oxidativo (malondialdeído, carbonilas e sulfidrilas), conteúdo de glutatonas (GSH e GSSG), atividade de enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx);
- Atividade das enzimas metabólicas (Fosfofrutocinase 1 (PFK1), β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (β -HAD) e Citrato sintase (CS));
- Expressão de proteínas relacionadas com a função mitocondrial (PGC-1 α , PPAR- γ , TFAM, Citocromo c, OXPHOS);
- Expressão de genes relacionados à biogênese e dinâmica mitocondrial e metabolismo (PGC-1 α , NRF-1, TFAM, Mfn2, OPA1, Succinato desidrogenase, Citrato sintase, Citocromo c, COX 5A, Piruvato carboxilase, Fosfoenolpiruvato carboxiquinase, β -hidroxiacil-CoA desidrogenase);
- Morfologia das mitocôndrias (microscopia eletrônica de transmissão).

5. MATERIAL E MÉTODOS

Animais e Dieta: O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências Biológicas (Protocolo nº 23076.004262 / 2010-88), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. Ratas Wistar albinas (*Rattus norvegicus*) tinham 80-90 dias de idade quando foram acasaladas. As ratas prenhas foram então transferidas para gaiolas individuais e mantidas a uma temperatura ambiente de 22 ± 1 ° C com um ciclo de claro-escuro controlado (claro 18:00-06:00 h). Ratas prenhas foram divididas aleatoriamente em dois grupos de acordo com a dieta: grupo controle (alimentado com uma dieta de 17% de proteína) e grupo com baixa em proteína (alimentado com uma dieta de 8% de proteína). As dietas foram isoenergéticas e as ratas foram alimentadas durante a gestação e lactação (NASCIMENTO et al., 2014). As dietas foram preparadas no Laboratório de Nutrição Experimental-Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão, Universidade Federal de Pernambuco, de acordo com o Instituto Americano de Nutrição-AIN-93 (REEVES et al., 1993). No dia 1 pós-natal, as ninhadas foram reduzidas para oito filhotes por mãe, garantindo apenas machos por mãe quando possível. No desmame (21 dias de idade), os filhotes machos (1-2 de cada mãe) permaneceram no experimento e receberam dieta comercial de laboratório (63% de carboidratos, 26% de proteínas e 1% de lipídios; Labina® (Purina Brasil) até o final dos experimentos (100 dias) (NASCIMENTO et al., 2014). Os animais de ambos os grupos (~8) foram eutanasiados por decapitação, o fígado imediatamente removido e as mitocôndrias isoladas.

Figura 1: Desenho experimental do presente projeto. G: gestação; L: lactação.



Tabela 1. Composição das dietas experimentais (g/100 g de dieta)

<i>INGREDIENTES</i>	<i>DIETA NORMOPROTEICA (17 %)</i>	<i>DIETA HIPOPROTEICA (8 %)</i>
Caseína (85 %)	20 g	9,41 g
Amido de milho dextrinizado	13 g	13,2 g
Celulose	5 g	5 g
Sacarose	10 g	10 g
Amido de milho	39,74 g	50,34 g
Óleo de soja	7 mL	7 mL
Bitartarato de colina	0,25 g	0,25 g
Metionina	0,3 g	0,3 g
Mix Vitamínico*	1 g	1 g
Mix Mineral**	3,5 g	3,5 g
Densidade energética (kJ/g)	16,26 g	16,26 g

*O Mix Vitamínico é composto pelos seguintes reagentes (em mg/Kg de dieta): retinol, 12; colecalciferol, 0,125; tiamina, 40; riboflavina, 30; ácido pantotênico 140; piridoxina, 20; inositol, 300; cianocobalamina, 0,1; menadiona, 80; ácido nicotínico, 200; colina, 2720; ácido fólico, 10; ácido p-aminobenzoico, 100 e biotina, 0,6. **O Mix Mineral é composto pelos seguintes reagentes (em mg/Kg de dieta): CaHPO₄, 17.200; KCl, 4000; NaCl, 4000; MgO, 420; MgSO₄, 2000; Fe₂O₂, 120; FeSO₄.7H₂O, 200. Fonte: REEVES et al., 1993; REEVES, 1997.

Tabela 2. Composição da dieta LABINA (Purina Brasil) utilizada após o desmame

INGREDIENTES*	QUANTIDADE (G)	CALORIAS (KCAL)
Proteína	23,0	92,0
Carboidrato	74,5	288,0
Gordura	2,5	22,5
TOTAL	100,0	402,5

**Composição básica: milho, farelo de trigo, farelo de soja, farinha de carne, farelo de arroz cru, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, sal, pré-mix. Fonte: Purina Brasil.

Preparo do homogeneizado do tecido hepático para utilização nas técnicas

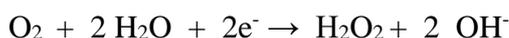
bioquímicas: O tecido hepático foi homogeneizado em tampão de extração (Tris base 50 mM, pH 7,4; EDTA 1 mM; ortovanadato de sódio 1 mM; PMSF 2 mM). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 1180g, a 4° C, por 10 minutos e os sobrenadantes foram submetidos à quantificação de proteínas totais.

Isolamento de mitocôndrias: As mitocôndrias foram isoladas de fígado de ratos, controles e submetidos a restrição proteica, utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial, segundo SCHNEIDER e HOGBOOM (1951). O fígado foi lavado em solução de sacarose 250 mM contendo tampão 10 mM de HEPES (pH 7,2) e 0,5 mM de EGTA, picado com tesoura e homogeneizado em tubo Potter-Elvehjem conectado a um triturador de tecidos IKA® (RW 20). O material foi centrifugado a 461g por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado durante 10 minutos a 4722g sendo a fase lipídica superior retirada. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensa em 250 mM de sacarose, 5 mM de HEPES (pH 7,2) e 0,3 mM de EGTA, e novamente centrifugado como na condição anterior. A fração mitocondrial foi ressuspensa na mesma solução, porém isenta de EGTA.

Dosagem de proteína: A concentração de proteína foi determinada pelo método de BRADFORD et al. (1976). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorbância do complexo proteína-corante. Este complexo absorve em comprimento de onda de 595 nm. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA (2 mg/ml) foi utilizada como padrão.

Condições experimentais: Os experimentos foram realizados a 28 °C em meio de reação padrão contendo 125 mM de sacarose, 10 mM de HEPES (pH 7,2), 65 mM de cloreto de potássio, 2 mM de fosfato de potássio e 1 mM de cloreto de magnésio. Como substrato respiratório foi utilizada uma mistura de substratos para o complexo I da cadeia respiratória (2 mM de malato, 1 mM de piruvato, 1 mM de α -cetoglutarato e 1 mM de glutamato), substrato para o complexo II (5 mM de succinato) + Rotenona (2 μ M) e TMPD (0,1mM) + ascorbato (1 mM) + Antimicina A (2 μ M) para complexo IV. Os experimentos foram feitos na presença e/ou ausência de 500 μ M de EGTA ou 1 μ M de ciclosporina A (CsA).

Medida do consumo de oxigênio mitocondrial: O consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas foi medido polarograficamente utilizando-se um eletrodo do tipo OXIGY conectado a um oxígrafo (Hansatech Instruments), em uma câmara de vidro fechada (1 mL) e termostalizada (28 °C), equipada com agitador magnético (ROBINSON E COOPER, 1970). Esse tipo de eletrodo compreende um cátodo de platina e um ânodo de prata, imersos numa solução eletrolítica (KCl). A superfície do cátodo é revestida por uma fina membrana de teflon ou polietileno, que são permeáveis ao oxigênio. Quando uma pequena voltagem é aplicada entre os eletrodos, a platina torna-se negativa em relação à prata, tornando-se polarizada. O oxigênio é então reduzido a peróxido de hidrogênio na superfície da platina, funcionando como acceptor de elétrons, segundo as reações:



Na superfície do ânodo a prata é oxidada, gerando cloreto de prata, segundo as reações:



A corrente gerada pela diferença dos eletrodos é relacionada estequiometricamente à concentração de O₂ na superfície do cátodo. Os impulsos elétricos são transmitidos ao oxígrafo, o qual é conectado a um computador onde é feita a leitura.

Inchamento mitocondrial: As suspensões mitocondriais são turvas e espalham a luz incidente. A luz espalhada é uma função da diferença entre o índice de refração da matriz e do meio, e, qualquer processo que diminua esta diferença irá diminuir a luz espalhada e aumentar a transmitância (NICHOLLS e ÅKERMAN, 1982). Assim, um aumento no volume da matriz mitocondrial, associado com a entrada de solutos permeáveis, resulta numa aproximação entre o índice de refração da matriz e do meio de reação com a consequente diminuição da luz espalhada. O acompanhamento espectrofotométrico da redução da absorbância a 520 nm foi feito em um

espectrofotômetro SmartSpec Plus – Bio Rad utilizando mitocôndrias isoladas (0,5 mg de proteína/mL) (VERCESI et al, 1988).

Potencial Elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$): A estimativa do potencial elétrico de membrana mitocondrial foi avaliada através do indicador safranina O (5 μ M), que apresenta um deslocamento no espectro visível associado à sua ligação à membrana de mitocôndrias energizadas. Esta adsorção foi seguida de alteração de espectro de absorbância da safranina na faixa de 500 a 600 nm. Nestas condições as diferenças de absorbância nos comprimentos 511-533 são diretamente proporcionais à amplitude do potencial até valores de aproximadamente 170 mV (ÅKERMAN & WIKSTRÖM, 1976; VERCESI et al, 1991). As mudanças na fluorescência da safranina foram monitoradas em um espectrofluorímetro JASCO (FP-6300) com temperatura controlada (28° C), nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 495 e 586 nm, respectivamente, com largura de fenda de 2,5 nm. Os resultados foram expressos em unidades de fluorescência (U.F.).

Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio: A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelas mitocôndrias isoladas foi determinada fluorimetricamente através da oxidação do H₂DCF-DA (diacetato de diclorodihidrofluoresceína, 5 μ M) (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA). A fluorescência foi monitorada ao longo do tempo em um espectrofluorímetro (Fluostar Omega, USA) usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 525 nm, respectivamente, com largura da fenda de 5 nm (LEBEL *et al*, 1992; GARCIA-RUIZ *et al*, 1997). Os resultados foram expressos em unidades de fluorescência (U.F.).

Peroxidação lipídica: Para a dosagem de TBARS foi utilizada a técnica colorimétrica de BUEGE e AUST (1978), sendo uma técnica muito utilizada para avaliar a lipoperoxidação, pois o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da LPO, entre eles o malondialdeído e outros aldeídos. Foram adicionados 300 μ g de proteína do homogenato de fígado à 200 μ l de ácido tricloroacético (TCA) a 30% e agitado por 1 min. 200 μ l de TRIS-HCl 10 mM, pH 7,4, foi adicionado ao material, agitado por 1 min e então centrifugado a 1180 g durante 10 minutos, 4 °C. O sobrenadante coletado (450 μ l) foi misturado ao ácido tiobarbitúrico a 0,73% (450 μ l) que reage com os produtos da lipoperoxidação formando um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada

por 15 minutos a 100°C e em seguida resfriada. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro GENESYS 10S UV-VIS (Thermo Scientific) a 535nm. Os resultados foram expressos em mmol/mg de proteína.

Conteúdo de grupos Sulfidrilas: O conteúdo de sulfidrilas foi determinado a partir da reação com o composto DTNB (5,5'-ditiobis (2 ácido nitrobenzoílo). Alíquota do homogenato (200 µg de proteína) foi incubada no escuro com 30 µL de DTNB 10mM e completado o volume final de 1 mL com tampão de extração. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro (LIBRA S12 UV/ VISIBLE) a 412 nm (ELLMAN, 1959). Os resultados foram expressos em mol/mg de proteína.

Conteúdo de proteínas oxidadas (Carbonilas): A avaliação da oxidação de proteínas se dá através da reação com o composto 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) descrito por ZANATTA et al., (2013). As proteínas (200 µg) foram precipitadas em TCA 30% e o *pellet*, após centrifugação, ressuspenso em DNPH 10 mM dissolvido em HCl 2,5 M e incubados no escuro a temperatura ambiente durante uma hora. Posteriormente, as proteínas precipitadas em adição ao TCA foram centrifugadas e o precipitado ressuspenso em guanidina 6 M, incubado à 37°C em banho maria por 5 minutos e levado ao espectrofotômetro (LIBRA S12 UV/ VISIBLE) para leitura em um comprimento de onda a 370 nm. Os resultados foram expressos em µmol/mg de proteína.

Quantificação do balanço redox (razão GSH/GSSG): A razão GSH/GSSG foi avaliada através da quantificação dos níveis de GSH e GSSG segundo o método de HISSIN E HILF (1976). Foi adicionado 100 µg do homogenato do fígado e o fluorescente ortoftaldeído (1mg/mL) e lido em espectrofluorímetro (FLUOstar Omega, USA) utilizando os comprimentos de onda de 350nm de excitação e 420nm de emissão.

Avaliação da atividade enzimática da Superóxido dismutase (SOD): A determinação da atividade de SOD foi feita de acordo com MISRA e FRIDOVICH (1972). Homogenato de fígado (80 µg de proteína) foi incubado no tampão carbonato de sódio (50 mM, pH 10,2, + 0,1 mM de EDTA) em banho-maria a 37 °C. A reação teve início pela adição de 20 µl de epinefrina (150 mM), em ácido acético (0,05 %), num volume final de 1 mL. A absorbância foi lida a 480nm por 3 min em espectrofotômetro (GENESYS 10S UV-VIS, Thermo Scientific). Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de proteína requerida para inibir a autooxidação de 1 µmol de epinefrina por minuto. Os resultados foram expressos em U / mg protein.

Avaliação da atividade enzimática da Catalase: A atividade da catalase foi monitorada de acordo com AEBI (1984). O princípio do ensaio é baseado na determinação da constante k de decomposição de H_2O_2 . Foi adicionado 80 μ g de proteína em tampão fosfato 50 mM (fosfato de sódio monobásico monohidratado + fosfato de sódio dibásico), pH 7,0, 30 °C. Em seguida, a reação foi iniciada com adição de 0,3 M de H_2O_2 , num volume final de 1 mL. O decaimento da absorbância foi monitorizado a 240 nm em espectrofotômetro (GENESYS 10S UV-VIS, Thermo Scientific) por 1 min. Uma unidade da CAT foi definida como a quantidade de proteína requerida para converter 1 μ mol de H_2O_2 por minuto para H_2O . A atividade da catalase foi expressa em U/mg de proteína.

Glutathione Peroxidase (GPx): A atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) foi monitorada pela diminuição de absorbância do NADPH a 340 nm em espectrofotômetro (LIBRA S12 UV/ VISIBLE), durante 4 minutos, a 20°C, em um meio contendo: 100 μ g de proteínas, tampão fosfato 0,05M (pH 7,0) e EDTA 0,005 M, NADPH 0,0084 M, Azida sódica 1,125 M, GSH 0,15 M, Glutathione redutase (GR) 3 mM e peróxido de hidrogênio 0,0022 M (PAGLIA e VALENTINE, 1967). A atividade da GPx foi expressa em U/mg de proteína.

Determinação da atividade da Fosfofrutoquinase 1 (PFK1): A fosfofrutoquinase 1 é a enzima que catalisa a fosforilação da frutose-6-fosfato gerando frutose-1,6-bifosfato, a terceira reação da via glicolítica. A atividade máxima da enzima foi determinada segundo método descrito por OPIE & NEWSHOLME (1967) e MANSUR (1963). O sistema de reação consistiu de Tris-HCl 50 mM pH8.0, $MgCl_2$ 5 mM, EDTA 1,0 mM, mercaptoetanol 5 mM, $NADH^+$ 13 mM, ATP 20mM, AMP 10 mM, aldolase 5 mM, glicose-6-fosfato desidrogenase 5 mM e triose-fosfato-isomerase 5mM, ao qual foi adicionada a amostra em um volume final de 0,25 mL. O ensaio teve início pela adição do substrato (frutose-6-fosfato 1mM) e as determinações enzimáticas foram realizadas a 25°C, por 10 min, a 340 nm em espectrofluorímetro (FLUOstar Omega, USA). A atividade da PFK1 foi expressa em mol/mg de proteína.

Determinação da atividade da β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (β -HAD): A atividade da β -HAD foi determinada segundo ITO et al., (2010). Essa enzima possui especificidade absoluta para o isômero L do substrato com a hidroxiacila, converte a hidroxila em C-3 em uma cetona e gera NADH. Sua atividade foi avaliada em

espectrofluorímetro (FLUOstar Omega, USA) a um comprimento de onda de 340 nm, volume final de 0,25 mL. Preparou-se uma solução de Imidazol a 50 mM, depois um mix de reação (Imidazol 50 mM + EDTA 12 mM + NADH 0,18 mM). Incubou-se por um minuto o mix de reação com 80 µg proteína de cada amostra e 0,1 mM de Acetoacetil-CoA foi adicionado para iniciar a reação. A leitura da absorbância em espectrofluorímetro foi realizada a 340 nm. A atividade da β-HAD foi expressa em mol/mg de proteína.

Determinação da atividade da Citrato sintase: A citrato sintase é uma enzima importante do ciclo de Krebs, pois catalisa a entrada de carbono neste ciclo. A enzima catalisa a reação: oxaloacetato + acetil-CoA + H₂O gerando citrato + CoA + H⁺. A atividade máxima da enzima foi determinada segundo ALP et al. (1976) a partir da quantificação do complexo formado entre a CoA liberada com o DTNB do meio. O tampão de ensaio conteve Tris-HCl 50 mM (pH 8,1), EDTA 1 mM, DTNB 0,2 mM, acetil-CoA 0,1 mM, oxaloacetato 0,5 mM e Triton X-100 0,05% (v/v). A reação foi iniciada pela adição de oxaloacetato ao meio e a atividade enzimática foi realizada a 25°C, por 10 min, a 412 nm em espectrofotômetro (FLUOstar Omega, USA). A atividade da citrato sintase foi expressa em mol/mg de proteína.

Expressão gênica por PCR em tempo real:

I. Extração de RNA em Trizol

O tecido hepático (100 mg) foi lisado em Trizol (1 mL), acrescido de clorofórmio (200 µl) e centrifugado (12000g). A fase aquosa foi transferida e adicionado isopropanol. O RNA formado foi lavado com etanol (75%) e centrifugado a 7000 g por 5 minutos. O sedimento de RNA secado à temperatura ambiente, ressuspense em água livre de RNase e armazenado a -80°C. A quantificação do RNA foi realizada por espectrofotometria (260/280 nm).

II. Reação de transcrição reversa (RT)

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir do RNA total (2 µg) com a seguinte mistura de reagentes: 146 ng de random primers e 200 U da enzima transcriptase reversa, tampão da enzima (Tris-HCl a 50 mM (pH 8.0), KCl 75 mM, MgCl 3 mM), DTT (5 mM), dNTP (500 µM) no volume final de reação de 20 µl. Esta mistura foi incubada por 2 min a 25°C para permitir a hibridização dos oligonucleotídios randômicos ao RNA.

III. Reação de PCR em tempo real (RT-PCR)

A expressão dos genes (co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 α), fator respiratório nuclear 1 (NRF-1), fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), Mitofusina 2 (MFN2), proteína de atrofia óptica 1 (OPA1), Succinato desidrogenase (SDH), Citrato sintase, Citocromo c, Citocromo c oxidase subunidade 5 A (COX 5A), Piruvato carboxilase (PC), Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), β -hidroxiacil CoA desidrogenase (β -had), RPL39 (proteína ribossomal L39) foi quantificada por PCR em tempo real. As reações foram realizadas em mistura (12 μ L) contendo cDNA da amostra (2 μ L), sequência de *primers sense* e *anti sense* (0,6 μ L/300nM), água DEPC (3,25 μ l) e mix Eva Master Mix (6 μ L) + Rox 50x (0,15 μ L). As condições do PCR foram previamente estabelecidas para o gene de interesse. A sequência de *primers* está listada abaixo, na Tabela 3.

Tabela 3. Lista de primers usados neste estudo.

<i>Gene</i>	<i>Sense primer (5' – 3')</i>	<i>Antisense primer (5' – 3')</i>
PGC-1 α	CAAGCCAAACCAACAACCTTTATCTCT	CACACTTAAGGTTTCGCTCAAAAGT
NRF-1	GCCCAAGTGAATTACTCTGC	TCGTCTGGATGGTCATTTTAC
TFAM	ACCCAGATGCAAACTTTTCAG	CTGCTCTTTATACTTGCTCACAG
Mfn2	CATGTCCATGATGCCCAACC	AGGGGAAGCATTACCTCAG
OPA1	AAAGCCCTTCCCAGTTCAGA	GTGTACCCGCAGTGAAGAAA
SDH	ACCCCTTCTCTGTCTACCG	ACCCCTTCTCTCTCTACCG
Citrato sintase	GTGTCAGATGAGAAGTTACGAGAC	TCCTTAGGCAGATGTTTTAG
Citocromo c	AGGCAAGCATAAGACTGGAC	ACTCCATCAGGGTATCCTCTC
COX 5A	TGTTGGCTATGATCTGGTTCC	TTATGAGGTCCTGCTTTGTCC
PC	GAGCTTATCCCGAACATCCC	TCCATACCATTCTCTTTGGCC
PEPCK	TTTGGTGGCCGTAGACCTGC	GACCTTGCCCTTATGCTCTGCA
β -had	TCTTGACTATGTTGGACTGGATAC	AAGGACTGGGCTGAAATAAGG
RPL39	AATCGTCCCATTCCCCAGTG	CCCAGCTTGGTTCTTCTCCA

Quantificação da expressão de proteínas por Western Blotting:

I. Preparo das proteínas

As amostras coletadas foram processadas em tampão de extração (Tris base 50 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM; triton X-100 1%, Deoxicolato 1%, SDS 0,1%, fluoreto de sódio 100 mM; pirofosfato de sódio 10,09 mM; ortovanadato de sódio 10,28 mM; aprotinina 5 µg/mL, leupeptina 1µg/mL, PMSF 1 mM). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14462g, a 4° C, por 20 minutos e os sobrenadantes foram submetidos à quantificação de proteína.

II. Eletroforese das proteínas no gel de SDS-PAGE

O *Western Blotting* foi realizado segundo Towbin et al (1979). Alíquotas de cada amostra, com a mesma concentração de proteínas totais (60 µg), foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% e 12% (LAEMMLI, 1970).

III. Transferência de proteínas para a membrana de nitrocelulose

A transferência de proteína foi realizada segundo Towbin *et al.* (1979) e Lagranha *et al.* (2007, 2010). As proteínas do gel foram transferidas eletricamente para membranas de nitrocelulose, no sistema semi seco usando *Trans-Blot Turbo Transfer System* da Bio-Rad, a aproximadamente 0,3 A durante 90 min.

IV. Sondagem das proteínas com anticorpos

As membranas, já com as proteínas, foram incubadas em solução bloqueadora (10% de leite desnatado em solução basal - Tris-HCl 20 mM (pH – 7,5), NaCl 160 mM e Tween 20 0,1%), por 1 hora, à temperatura ambiente e lavadas com solução basal por 3 vezes, durante 5 minutos. Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo específico (co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma - PGC-1α (1:1000) – Cell Signalling, receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama - PPAR-γ (1:1000) – Cell Signaling, fator de transcrição mitocondrial A - TFAM (1:1000) - Santa Cruz Biotechnology, Citocromo c – Cell Signaling, fosforilação oxidativa - OXPHOS (1:1000) - Abcam, β-actina (1:1000) - Santa Cruz Biotechnology) em solução basal acrescida de 5% de BSA, *overnight* na geladeira e sob agitação

continua. Após as lavagens (3 x 10 min), foi procedida a incubação com o segundo anticorpo (1:2500) anti-IgG de camundongo ou coelho conjugado com a peroxidase, por 1 hora, em solução basal, à temperatura ambiente e agitação contínua.

V. *Revelação com sistema quimioluminescente*

Após as lavagens (3 x 5 min), as membranas foram incubadas com o substrato para peroxidase (1:1) (ECL *Western Blotting System Kit*, Amersham Pharmacia) por 30 seg e a revelação das membranas foram feitas no fotodocumentador Amersham Imager 600. As intensidades das bandas da fotodocumentação foram quantificadas por densitometria óptica, usando o programa *Image J* (NIH, Bethesda, MD, EUA).

Microscopia eletrônica de transmissão: Para procedimentos de rotina, os fragmentos de fígado e o pellet de mitocôndrias isoladas foram fixados durante a noite numa solução contendo 2,5% de glutaraldeído e paraformaldeído a 4% em tampão de cacodilato 0,1 M. Após a fixação, as amostras foram lavadas duas vezes no mesmo tampão e em seguida, eles foram pós-fixados numa solução contendo 1% de tetróxido de ósmio, cloreto de cálcio 2 mM e ferricianeto de potássio a 0,8% em tampão de cacodilato 0,1 M, pH 7,2, desidratadas em acetona, e embebidas em Embed 812. A polimerização foi realizada a 60 ° C durante 3 dias. Secções ultrafinas foram recolhidos em grades de níquel 300-mesh, contrastadas com 5% de acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas usando um microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN.

Análise estatística: Os dados foram apresentados em média e erro padrão da média. Para comparação entre grupos foi utilizado o teste T de Student não pareado com nível de significância $p \leq 0,05$. Foi utilizado, para tratamento dos dados estatísticos, o software GRAPH PAD PRISM versão 6.0.

6. RESULTADOS

**ARTIGO QUE SERÁ SUBMETIDO AO THE JOURNAL OF
BIOLOGICAL CHEMISTRY**

Fator de Impacto: 4.258

Classificação "A1" na área de Nutrição

Maternal low-protein diet alters liver mitochondrial bioenergetics in adult offspring.

Reginaldo C. Silva Filho¹, Luciana C. Nascimento², Alessandra B. Silva³, Lucas H. Bomfim⁴, Michel B. Araújo⁴, Cristiane M. Freitas², Karina L. A. Saraiva⁵, Regina C. B. Q. de Figueiredo⁵, Cláudia J. Lagranha^{1,2}, Ana Catarina R. Leite⁶, Leonardo R. Silveira⁴, Mariana P. Fernandes¹

¹Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil;

²Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, PE, Brazil, ³Universidade Estadual de Pernambuco, UPE, Recife, PE, Brazil, ⁴Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil; ⁵Núcleo de Plataformas Tecnológicas, Instituto de Pesquisa Ageu Magalhães, CPqAM/FIOCRUZ, Recife, PE, Brazil; ⁶Instituto de Química, Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Maceió, AL, Brazil.

Running title: Effects of perinatal protein restriction in liver of rats

#Mailing address:

Mariana Pinheiro Fernandes

Rua Alto do Reservatório, s/n – CEP: 55608-680 – Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte – Bela Vista – Vitória de Santo Antão, PE – Brasil.

Fone/Fax: (00 55 81) 35233351 **E-mail:** marianapfernandes@yahoo.com

Keywords: Maternal protein restriction, Liver, Mitochondria

ABSTRACT

Phenotypic plasticity can be defined as the property of an individual genotype generating different phenotypes when exposed to different environmental conditions and perinatal insults, such as perinatal nutrition. This has been widely described as one of the most important factors in the etiology of metabolic diseases in adulthood. In this work, we aimed to evaluate the effect of maternal protein restriction (in gestation and lactation) on the mitochondrial bioenergetics and hepatic redox status of male rats at 100 days of life. We observed that in low protein animals, mitochondria breathe faster, are more resistant to the Ca²⁺ ion, produce fewer ROS and maintain the integrity of their membranes. These mitochondria also presented an elongated fused structure, which confers greater resistance and optimizes energy homeostasis. Moreover, the liver of these animals had greater expression of the PGC 1 α gene and the PPAR- γ protein and metabolized more fatty acids, storing glycogen to glycolytic organs. Finally, the liver of the low protein animals presented a positive redox state without oxidative stress. Our data suggest that the plasticity of the liver of low protein animals seems to be associated with a mechanism signaled by the greater efficiency of mitochondria in maintaining energy homeostasis and consequently hepatic cellular redox homeostasis.

INTRODUCTION

Perinatal insults have been widely described as one of the most important factors in the etiology of metabolic diseases in adulthood, depending of the type of stressor, such as perinatal nutrition, as well as intensity and duration, sex, species and duration. Depending on the moment that the stress is suffered, it may or may not be responsible for inducing irreversible changes that can generate deleterious effects on organs and tissues (1-3). The term plasticity may be defined as the ability of an organism to adapt when exposed to different environmental conditions (4). When environmental changes occur, the body is able to adapt (5) in order to ensure the survival of the individual (6). A number of studies have pointed to nutritional status as a major modulatory factor of plasticity, suggesting that in response to malnutrition, metabolic alterations are important to enable survival (7). Studies involving protein restriction during pregnancy and lactation have reported changes in the redox state and antioxidant system in rats (8), as well as injury to the mitochondrial function (9,10).

The metabolism of carbohydrates and lipids is orchestrated mainly by the liver, which also has an important role in protein metabolism (11). There are reports in the literature on various effects of perinatal protein restriction on the liver; these include changing the morphology, metabolic alterations in the content of triglycerides and changes in the activity of fatty acid metabolism enzymes, the production and use of energy. Moreover, hepatic dysfunction-related studies have shown that liver injury can be assessed by oxidative stress (12-14). It is believed that oxidative stress is a major cause of developing metabolic disorders such as hepatic steatosis, non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes, associated with mitochondrial dysfunction (15-17).

The cells are able to respond to various environmental conditions such as the availability of nutrients, and to modulate some mechanisms of fundamental importance for the control of cellular homeostasis. Mitochondria are extremely important for cell homeostasis maintenance including mechanisms such as biogenesis and mitochondrial dynamics (18-20). Mitochondria are catalytic sites for ATP synthesis in eukaryotes (21) and play an important role in bioenergetics and metabolism of carbohydrates, lipids and amino acids. Some evidence indicates a link between mitochondrial bioenergetics and its morphology, which is related to mitochondrial plasticity. In the context of mitochondrial plasticity, it is important to emphasize that the mechanisms involved in the regulation of mitochondrial architecture include remodeling of the crests, regulation of mitochondrial dynamics from fusion and fission and even autophagy mechanisms, resulting from cellular responses (22).

Enriched environment is associated with fragmentation of the mitochondria, whereas in famine or nutritional deprivation, mitochondria tend to elongate (23). Two proteins, known as mitofusin 2 (*Mfn2*) and protein optic atrophy 1 (*OPA1*), are essential to the process of elongation of the mitochondria. *Mfn2* are responsible for the fusion of the outer membrane of mitochondria, while *OPA1* is related to the fusion of the inner membrane of mitochondria. (23). Important studies have demonstrated that these proteins are extremely important to the development of mice while still in the intrauterine environment and appear to contribute to maintenance of mitochondrial membrane potential and glucose oxidation (24-26).

Reports in the literature point to the possible effects of perinatal protein malnutrition on liver physiology (27,28). Nevertheless, up to the present, it has not been clear what is the role of mitochondria and redox state of the liver in adult rats that have

undergone protein restriction during pregnancy and lactation (critical periods of development). Given this, we set out to identify the mechanisms involving phenotypic plasticity and mitochondrial alterations induced by perinatal protein restriction in the hepatic metabolism.

RESULTS

High rate of mitochondrial oxygen consumption by low protein animals without change on respiratory control ratio—A Mitochondrial oxygen consumption study was performed using an oxygraph with an electrode sensitive to variation of oxygen on the standard reaction medium. Figure 1(A, B and C) shows oxygen consumption by isolated mitochondria of animals in the control group (Fig. 1A, black line) and of the group receiving a low protein diet (Fig. 1A, grey line). Oxygen consumption by liver mitochondria (Fig. 1B) in the presence of succinate plus rotenone used as a substrate to maintain the mitochondrial metabolisms was no different in the basal respiratory state for both groups. The ADP-stimulated state (state 3) increased by 39% in the low protein group (Control: 56.96 ± 4.57 nmol O₂/min/mg protein vs Low Protein: 79.4 ± 8.81 nmol O₂/min/mg protein, $p < 0.05$). Oxygen consumption increased 42% and 43% in the resting (state 4, oligomycin presence; Control: 20.07 ± 2.3 nmol O₂/min/mg protein vs Low Protein: 28.45 ± 2.4 nmol O₂/min/mg protein, $p < 0.05$) and uncoupling states, (CCCP presence; Control: 66.18 ± 7.44 nmol O₂/min/mg protein vs Low Protein: 94.83 ± 9.2 nmol O₂/min/mg protein, $p < 0.05$), respectively. However, the respiratory control ratio (RCR, state3/state4; Control: 6.08 ± 0.59 vs Low Protein: 5.85 ± 0.70 , $p > 0.05$) was not different in either group (Fig. 1C).

Those experiments were also performed in the presence of 0.2% BSA (fatty acids chelator) and different substrates and inhibitors, as shown in Table 2. Liver mitochondria of low protein animals consume oxygen rapidly, even in the presence of BSA, indicating that this higher consumption is not an effect of fatty acid-stimulated excess.

Mitochondrial calcium resistance prevents against mitochondrial swelling—The mitochondria can have their membrane integrity impaired by higher Ca²⁺ concentration. We observed that the mitochondria in the low protein animals were more resistant to swelling induced by Ca²⁺ (30 μM) than the mitochondria in the control animals (Control: 0.417 ± 0.037 vs Low Protein: 0.805 ± 0.082 , absorbance at 5 minutes, $p < 0.005$) (Fig. 2). This effect was reverted in presence of cyclosporine A, a classic inhibitor of transition pore of mitochondrial permeability (Control: 0.417 ± 0.038 vs Control + CsA: 1.031 ± 0.206 , $p < 0.05$).

Effect of protein restriction on the $m\Delta\Psi$ —We evaluated the mitochondrial capacity in the maintenance of the electrical membrane potential through monitoring of safranin O fluorescence (Fig. 3). Mitochondria were energized with succinate as a respiratory substrate. This is interesting as the liver mitochondria of the low protein group were more capable of maintaining the safranin O linked to mitochondrial membrane because of the difference in charge, given that that the safranin O time retention was higher in the low protein fed animals when compared with control group (Control: 6.47 ± 0.762 min vs Low Protein: 12.5 ± 0.848 min, $p < 0.0005$).

Ca²⁺ does not stimulate liver mitochondrial ROS production on maternal protein restriction—ROS are produced during mitochondrial electron transport and oxidative stress is generated in presence of high ROS concentration. We found lower ROS production (Fig. 4) by isolated liver mitochondria of low protein animals (Control: 3675 ± 352 U.F. vs Low Protein: 2048 ± 369 U.F, p<0.05). We also observed that in this animal group the ROS was not stimulated by Ca²⁺, different from what happened with the control group when we performed experiments in the presence of EGTA (calcium chelator). When this happened, ROS production was decreased (Control: 3675 ± 352 U.F. vs Control+EGTA: 2218 ± 234 U.F, p<0.05).

Biomolecules are preserved against oxidative stress in the livers of low protein animals—In the liver, the effect of maternal protein restriction on biomarkers of oxidative stress (lipid peroxidation, sulfhydryl content and protein oxidation) showed no significant alteration between groups, the control and low protein groups. Our data showed similar malondialdehyde content (Fig. 5A; Control: 52.5 ± 7.62 mmol/mg protein vs Low Protein: 50.7 ± 7.41 mmol/mg protein, p>0.05), sulfhydryl content (Fig. 5B, Control: 0.144 ± 0.004 mol/mg protein vs Low Protein: 0.146 ± 0.006 mol/mg protein, p>0.05) and carbonyl content (Fig. 5C, Control: 24.0 ± 1.37 μmol/mg protein vs Low Protein: 28.8 ± 1.71 μmol/mg protein, p>0.05). This suggests that lipid and protein biomolecules were being preserved in low protein animals.

Evaluation of liver enzymatic antioxidant system activity—Here we analyzed three enzymes antioxidants of the liver homogenate (Fig 6). The superoxide dismutase activity (Fig. 6A) decreased in low protein group compared to the control group (Control: 14.9 ± 0.75 vs Low Protein: 5.20 ± 0.87 U/mg protein, p<0.0005). No changes in the activity of the two other enzymes were found: catalase (Fig. 6B, Control: 2.88 ± 0.42 U/mg protein vs Low Protein: 2.81 ± 0.10 U/mg protein, p>0.05) and glutathione peroxidase (Fig. 6C, Control: 3244 ± 90.9 U/mg protein vs Low Protein: 3009 ± 69.6 U/mg protein, p>0.05). The data indicate that low protein animals have the capacity to maintain ROS control in the liver.

The liver redox state presents a positive balance in low protein animals—The redox state cell was measured through quantification of glutathione content, as shown in Figure 7. The glutathione reduced (GSH) content was higher in the low protein group than in the control group (Fig. 7A, Control: 96.1 ± 2.45 μmol/mg protein vs Low protein: 124 ± 9.52 μmol/mg protein, p<0.05). The glutathione oxidized (GSSG) content no was different in both groups (Fig. 7B, Control: 135 ± 10.9 μmol/mg protein vs Low Protein: 138 ± 5.80 μmol/mg protein, p>0.05). We tested the GSH/GSSG ratio and in low protein animals this redox balance was positive when compared to control animals (Fig. 7C, Control: 0.697 ± 0.053 vs Low Protein: 1.03 ± 0.124, p<0.05).

Analysis of enzyme activity in the metabolism of carbohydrates, lipids and citric acid cycle in the liver—To test the liver metabolic profile we analyzed the enzyme activity of glycolysis, β-oxidation of fatty acids and citric acid cycle (Fig. 8). Our results showed no alteration of phosphofructokinase 1 activity and citrate synthase presented no significant differences between groups (Fig. 8A, PFK activity - Control: 23.8 ± 1.78 vs Low Protein: 28.7 ± 3.16 nmol/mg protein, p>0.05; Fig. 8B, CS activity - Control: 478 ± 48.7 vs Low Protein: 408 ± 25.4 nmol/mg protein, p>0.05). We also evaluated the β-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity, third enzyme of fatty acids β-oxidation and we observed a higher activity in the low protein group compared to the control group

(Fig. 8C, β -HAD activity - Control: 17.5 ± 0.907 vs Low Protein: 28.5 ± 0.606 , $p < 0.0005$).

In liver the mitochondrial biogenesis and metabolic enzymes are downregulated, but the mitochondrial fusion is stimulated—To evaluate the genes expression in the liver we performed the Real Time-PCR (Figure 9, A, B and C). Interestingly, our data indicated that in the low protein group, the mitochondrial biogenesis is downregulated because only the PGC-1 α are upregulated (Fig. 9A, Control: 1.000 ± 0.268 vs Low Protein: 2.013 ± 0.067 , $p < 0.05$). NRF-1 (Control: 1.000 ± 0.065 vs Low Protein: 0.7398 ± 0.050 , $p < 0.05$), TFAM (Control: 1.000 ± 0.111 vs Low Protein: 0.577 ± 0.033 , $p < 0.05$) are downregulated (Fig. 9A). The fusion gene of the outer mitochondrial membrane, Mfn2 (Fig. 9A), is downregulated (Control: 0.823 ± 0.110 vs Low Protein: 0.468 ± 0.074 , $p < 0.05$), while the fusion gene of the inner mitochondrial membrane, OPA1 (Fig. 9A), is upregulated (Control: 1.200 ± 0.049 vs Low Protein: 2.050 ± 0.157 , $p < 0.05$).

We also observed that the genes of mitochondrial function and metabolism were downregulated in the low protein group (Fig. 9B). The data shows a significant decrease in the expression of gene citrate synthase (CS), succinate dehydrogenase (SDH) and cytochrome c (Cyt c) (CS, Control: $1,000 \pm 0,096$ vs Low Protein: 0.629 ± 0.041 , $p < 0.005$); SDH, Control: 1.000 ± 0.107 vs Low Protein: 0.301 ± 0.030 , $p < 0.0005$; Cyt c, Control: 1.000 ± 0.173 vs Low Protein: 0.448 ± 0.042 , $p < 0.05$). We found no significant difference in the gene expression of cytochrome c oxidase subunit 5A (COX 5A) (Control: 1.000 ± 0.126 vs Low Protein: 0.683 ± 0.070 , $p > 0.05$).

Furthermore, the expression of three genes that regulate the metabolism showed no significant difference between groups (Fig. 9C). Pyruvate carboxylase (PC, Control: 1.00 ± 0.065 vs Low Protein: 0.840 ± 0.044 , $p > 0.05$), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK, Control: 1.00 ± 0.065 vs Low Protein: 1.08 ± 0.016 , $p > 0.05$) and β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (β -had, Control: 1.000 ± 0.080 vs Low Protein: 0.773 ± 0.074 , $p > 0.05$).

Expression of proteins in liver—We analyzed the expression of proteins in liver homogenate by Western blotting (Fig. 10, A and C) using antibodies to detect the proteins OXPHOS (electron transport chain), PGC-1 α and TFAM (mitochondrial biogenesis), Cytochrome c (electron transfer) and PPAR- γ (lipid metabolism). Fig. 10A shows the Western blotting of proteins that constitute the complexes of mitochondrial electron transport chain and oxidative phosphorylation (OXPHOS), indicating no increase in expression of those proteins in either group (Fig. 10B, Complex I, Control: 0.440 ± 0.132 vs Low Protein: 0.421 ± 0.126 ; Complex II, Control: 1.19 ± 0.154 vs Low Protein: 1.18 ± 0.0482 ; Complex III, Control: 1.17 ± 0.177 vs Low Protein: 0.744 ± 0.0871 ; Complex V, Control: 0.789 ± 0.212 vs Low Protein: 0.724 ± 0.131 ; $p > 0.05$). Fig. 10C shows the Western blotting of proteins of mitochondrial biogenesis (PGC-1 α and TFAM). The protein PGC-1 α (Fig. 10D) is more express in the low protein group (Control: 1.06 ± 0.098 vs Low Protein: 1.82 ± 0.166 , $p < 0.05$), differently from TFAM (Fig. 10D), where the expression is decreased (Control: 0.978 ± 0.040 vs Low Protein: 0.798 ± 0.049 , $p < 0.05$).

The protein electron carrier, cytochrome c (Fig. 10, C and D), suffered no alteration of expression in either group (Fig. 10D, Control: 1.07 ± 0.109 vs Low Protein: 0.837 ± 0.073 , $p > 0.05$). PPAR- γ (Fig. 10 C and D) showed a higher expression in the low protein group (Control: 1.26 ± 0.587 vs Low Protein: 5.73 ± 1.19 , $p < 0.05$). These results suggest that in 100-day-old low-protein animals there is no indication of mitochondrial biogenesis, but the expression of PGC-1 α and PPAR- γ suggested a possible expression of the lipid metabolism protein.

Maternal protein restriction alters liver glycogen content and mitochondrial morphology and mitochondria ER-interaction—One of our questions was to find out what were the possible alterations that maternal protein restriction generated in liver cells. To answer this question we analyzed the hepatocytes by electronic microscopy transmission as well as the morphology of mitochondria (Fig. 11, A to H). We perceived a high concentration of granules of glycogen (*white arrow*) in the hepatocytes of the low protein group (Fig. 11B), but not in the hepatocytes of the control group (Fig. 11A), indicating that the low protein animals preserved glycogen and used the fatty acids as principal substrate to obtain energy. Interestingly, the livers of the low protein group (Fig. 11D) showed a different organization of the rougher endoplasmic reticulum (RER). These organelle are in intimate contact with the mitochondria. This phenomenon did not happen in the liver cytosol of the control group (Fig. 11C).

In addition, the images show the morphology of the mitochondria (Fig. 11, E to H; *black arrow*). In the control group (Fig. 11E) there was no modification of the mitochondrial structure. We observed modification in the mitochondria of the low protein group (Fig. 11F), which were elongated. Elongated mitochondria were also seen in the microscopy of the mitochondria pellets of the low protein (Fig. 11H) group but not in the control group (Fig. 11G). This data indicates mitoplasticity in the livers of the low protein group.

DISCUSSION

Nutrition is an environment factor that plays an extremely important role in the critical windows of development (29). In this study, we proposed to evaluate how protein restriction, during pregnancy and lactation could modulate the mitochondrial bioenergetics and redox state in livers of male rats, 100 days old.

We evaluated the liver mitochondrial oxygen consumption in animals from dams fed a diet with 8% of protein and saw that these mitochondria had a higher capacity of oxygen consumption, indicating a metabolic adaptation in function of a nutrition insult generated in the critical period of development. The energy necessary for oxidative phosphorylation comes from $\Delta\Psi$ e ΔpH generated by electron transport chain that reduces O_2 to H_2O . This energy is used by ATP-synthase to phosphorylate the ADP to ATP (30). In our animal model, the mitochondria of a low protein group respiring faster in state 3 (ADP-stimulated) suggested higher phosphorylation efficiency. In one study performed with rats from dams fed on a low protein diet only during pregnancy showed

that the liver mitochondria of pups also had a high consumption of oxygen at 45, 60 and 120 days and high ADP/O ratio (31). The experiments that we performed in the presence of BSA shows that none were affected by fatty acids, because the effect in the oxygen consumption was the same as in the experiment with no BSA. Free fatty acids in excess have the capacity of uncoupling the mitochondria, causing lower efficiency in ATP syntheses (32,33).

Our next steps were to analyze mitochondrial integrity, as its function can be impaired by damage to the membranes (34). Mitochondria have many cristae in their matrix due to an inner folding of the mitochondrial membrane. The unfolding of these membranes causes a significant change in the volume of the organelle. In the pathological process, this may be due disruption or permeabilization of the inner mitochondrial membrane, a phenomenon known as transition mitochondrial permeability (35). In cases of mitochondrial swelling, this is due to the mitochondrial permeability transition pore (MPTP), normally induced by Ca^{2+} . Our data shows that liver mitochondria of low protein animals 100 days old have higher resistance to Ca^{2+} because those organelles do not swell in reaction to the high calcium Ca^{2+} concentration. This suggests that the low protein group has more capacity for calcium buffering. The liver seems to acquire resistance, over the long term, and to maintain the metabolic functions for survival.

Furthermore, we observed that the mitochondria of low protein animals were capable of sustaining the mitochondrial membrane potential longer, since the fluorescence of safranin O in the control group was released faster than that in the low protein group. We used the safranin O as a probe because it is a cationic pigment with different charge can bind to the inner membrane of energized mitochondria (36,37). When the electron transport occurs faster, the O_2 tension is reduced in the mitochondrial environment and decreases ROS (38,39). This mechanism was seen in our experiments. The low protein animals produced lower ROS and this seemed to be the mechanism involved in the resistance of the liver mitochondrial of the low protein animals in our study.

The results found with isolated mitochondria made us question the liver redox state in animals in the low protein group. No alterations in the liver were found for lipid peroxidation and protein oxidation, as well as sulfhydryl content, thiol groups that contribute to the maintenance of redox homeostasis. In review, Kowaltowski et al. (2001) reported the importance of these protein thiol groups to protect the mitochondrial permeability transition pore opening. When thiol groups of protein present in the inner mitochondrial membrane are oxidized, a conformational change in these proteins is generated, opening a non-selective pore (40). Additionally, low protein animals showed an increased GSH content and redox state in the liver. The sulfhydryl group (-SH) of cysteine present in the glutathione acts in various antioxidant reactions as an electron donator in the reduction of peroxides (41). The increased mitochondrial activity in low protein animals seems to contribute to the maintenance of redox homeostasis. These findings may justify the reduced superoxide dismutase activity and the non-alteration in the catalase and glutathione peroxidase.

Knowing that mitochondria uses different substrates to generate energy for cell events, we observed through transmission electronic microscopy that the livers of low protein animals had stored a great quantity of glycogen granules. Probably the liver of these animals was using with efficiency the glucose-fatty acid cycle to save the proteins,

since during the critical period of development these animals had suffered protein deprivation. Under the condition of nutritional deprivation, as well as in fasting, triglycerides are mobilized to generate energy through β -oxidation of fatty acids, and the glucose produced in the liver is saved for other organs (nervous system, blood and immunological) (42-45). According to our data, the activity of β -HAD increased in the low protein group, though the expression of this gene had not been increased, nor the gene expression of PC and PEPCK. In contrast, the expression of the PPAR- γ protein was higher in the low protein group. The protein PPAR- γ are associated with lipid oxidation (46).

Investigating the mitochondrial biogenesis and dynamic, we found increased expression of genes and the protein PGC-1 α in the animals in the low protein group. The PGC1- α as well was associated to the expression of fusogenic proteins (47,48), that, according to our data, showed increased expression of the gene OPA1. The fusion process in liver mitochondria of the low protein animals was confirmed in images made by transmission electronic microscopy of the livers and isolated mitochondria. The fusion process is required in situations where mitochondrial bioenergetics need to be improved (49). Although many genes are not upregulated, our results indicate that the mitochondria of the low protein animals needed to be more active in order to maintain the energetic homeostasis. RAMBOLD et al. (2011) reported that in fibroblast cells, the privation of amino acids induces the mitochondria to acquire elongated structure (50). Nutritional privation has been reported as an inductor factor of mitochondrial elongation and a decreased fission process saves the mitochondria under conditions of nutritional privation (51-53).

The final questions considered in this study were related the reorganization of mitochondria in cytosol. In recent decades, mitochondrial dynamics have merged as one of the main regulatory mechanisms of calcium homeostasis, respiration, control of mitochondrial quality and oxidative metabolism (23,54-56). Recent studies have demonstrated the interaction between mitochondria and endoplasmic reticulum as in the mechanism of metabolic diseases (e.g. obesity and type II diabetes). This area of mitochondria ER-interaction allows a metabolic flexibility (57-59), and surprisingly the liver mitochondria of low protein animals are in intimate contact with rough endoplasmic reticulum. This interaction probably is linked to the high metabolic activity in this liver, oxidizing mainly fatty acids and favoring calcium transport, important for the activation of dehydrogenases in the mitochondrial matrix. In a review, THEUREY and RIEUSSET (2016) have suggested that in situations of nutritional privation, the mitochondria-ER interaction increase significantly (60). This favors calcium exchange, as well as mitochondrial elongation and stimulation of mitochondrial activity with consumption of fatty acids, by β -oxidation, as font of energy for oxidative phosphorylation.

To summarize, our study showed that the mechanisms involving the liver plasticity in animals that suffered maternal protein restriction in the critical period of development (pregnancy and lactation), is dependent of mitoplasticity.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals and Diets—The experimental protocol was approved by the Ethics Committee of the Biological Sciences Center (Protocol No. 23076.004262/2010-88), Federal

University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil. Virgin female albino Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were 80-90 days old when they mated. Pregnant rats were then transferred to individual cages and maintained at a room temperature of 22 ± 1 °C with a controlled light–dark cycle (light 18.00–06.00 h). The pregnant rats were randomly divided into two groups according to diet: a control group (fed a 17% protein diet) and a low protein group (fed a 8% protein diet). The diets were isoenergetic and were fed during pregnancy and lactation (9). The diets were mixed at the Laboratory of Experimental Nutrition–Academic Center of Vitoria de Santo Antão, Federal University of Pernambuco, according to the American Institute of Nutrition–AIN-93 (61,62). On postnatal day 1, litters were reduced to eight pups per mother, ensuring only males per litter when possible. At weaning (21 days old), male offspring (1–2 from each mother) remained in the experiment and received commercial laboratory chow (63% carbohydrate, 26% protein, and 1% lipids; Labina® (Purina Brasil) until the end of the experiment (100 days old) (9). The animals from both groups were euthanized by decapitation; the liver immediately removed and the mitochondria isolated.

Mitochondria Liver Isolation and Experimental Conditions—Liver Mitochondria was isolated using the differential centrifugation method according to Schneider and Hogeboom (1951) (63). The liver was washed in solution 250 mM sucrose containing 10 mM HEPES (pH 7.2) and EGTA 0.5 mM, chopped with scissors and homogenized. The material was centrifuged at 2500 rpm, at 4 °C for 10 minutes. The supernatant was centrifuged at 8000 rpm, at 4 °C for 10 minutes and the lipid phase removed. The supernatant was discarded and the pellet resuspended in 250 mM sucrose, 5 mM HEPES (pH 7.2) and 0.3 mM EGTA, and centrifuged as in previous condition. Mitochondrial fraction was resuspended in the same solution, without EGTA. The experiments with isolated mitochondria was realized at 28 °C in reaction medium contained 125 mM sucrose, 10 mM (pH 7.2), 65 mM KCL, 2 mM K_2HPO_4 and 1 mM MgCl. As respiratory substrate, we used a mixture of substrates in the complex I of the respiratory chain (2 mM malate, 1 mM pyruvate, 1 mM α - ketoglutarate and 1mM glutamate), substrate for the complex II (5 mM succinate) + Rotenone (2 μ M) and TMPD (0.1mM) + ascorbate (1 mM) + antimycin A (2 μ M) (for complex IV). Experiments were performed both with and without 500 μ M EGTA or 1 μ M cyclosporine A (CsA).

Protein Measurement—Protein concentration was measurement by the Bradford method (1976) (64). A BSA solution (2mg/mL) was used as standard.

Measurement of Mitochondrial Oxygen Consumption—The rate of oxygen consumption of isolated mitochondria (0.5 mg/mL) was measured polarographically using an OXIGY-type electrode connected to an oxygraph (Hansatech Oxygraph Plus, United Kingdom) in a closed thermostatic glass chamber (1 mL) at 28 °C, equipped with a magnetic stirrer (65). Experiments was performed in the presence of 200 μ M ADP, 1 μ g/mL oligomycin and 1 μ M CCCP.

Mitochondrial Swelling—Mitochondrial swelling (1 mg/mL) was determined as the decrease in the turbidity of the mitochondrial suspension, in presence of 30 μ M calcium, measured at 520 nm using SmartSpec Plus – Bio Rad spectrophotometer. The absorbance was measured at 5 minutes (35,66).

Estimation of Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi_m$)—The $\Delta\Psi_m$ was estimated by following safranin O (5 μ M) added to standard reaction medium (67). The safranin fluorescence was recorded on a FP-6300 JASCO spectrofluorimeter operating at excitation and emission wavelengths of 495 and 586 nm, respectively, and slit of 2.5 nm. Relative changes in membrane potential were expressed as fluorescence units (F.U.).

Reactive Oxygen Species Production—The measurement of reactive species was determined spectrofluorometrically using 5 μ M dichlorodihydrofluorescein diacetate

(H₂DCF-DA) under constant stirring. Fluorescence was determined on a FLUOstar Omega spectrofluorimeter at 488 and 525 nm for excitation and emission wavelengths, respectively, and slit width of 5 nm (68,69). The results were expressed as fluorescence unite (F.U.)

Preparation of Rat Liver Homogenate—After removal and quick-freezing at -80° C freezer, the liver tissue was homogenized in an extraction buffer (50 mM Tris base (pH 7.4); 1 mM EDTA; 1 mM sodium orthovanadate; 2 mM PMSF). After homogenization, the samples were centrifuged at 4,000 rpm at 4 ° C for 10 minutes and the supernatants were subjected to protein quantification.

Sulphydryl group contents—The sulphydryl content was determined from the reaction with DTNB (5,5'-dithiobis (2 nitrobenzoic acid) .The aliquot of the homogenate (200 µg protein) was incubated in the dark with 30 µL of DTNB 10mM and the final volume of 1mL was completed with extraction buffer pH 7.4 and the absorbance reading was made in a spectrophotometer at 412 nm LIBRA S12 UV / VISIBLE (70). The results were expressed as mol/mg protein.

Lipid peroxidation—The colorimetric technique of Buege and Aust (1978) (71) was used for the determination of TBARS. 300 µg proteins of liver homogenate were added to 200 µL of 30% trichloroacetic acid (TCA) and shaken for 1 min. 200 µL of 10 mM TRIS HCl, pH 7.4, was added to the material, stirred for 1 min and then centrifuged at 2500 rpm for 10 minutes at 4 ° C. The collected supernatant (450 µl) was mixed with 0.73% thiobarbituric acid (450 µL) which reacted with the lipoperoxidation products to form a pink colored compound. The mixture was incubated for 15 minutes at 100 ° C and then cooled. The absorbance reading was done on the GENESYS 10S UV-VIS spectrophotometer (Thermo Scientific) at 535nm. The results were expressed as mmol / mg protein.

Protein Carbonyls Content—Evaluation of protein oxidation occurs by reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine compound (DNPH) described by Zanatta et al (2013) (72). The protein homogenate (200 µg) were precipitated in 30% TCA and the pellet after centrifugation, resuspended in 10 mM DNPH dissolved in 2.5 M HCl and incubated in the dark at room temperature for one hour. Thereafter, the precipitated proteins in addition to the TCA were centrifuged and the precipitate resuspended in 6 M guanidine, incubated at 37 ° C in a water bath for 5 minutes and the absorbance measured in a LIBRA S12 UV / VISIBLE spectrophotometer at a wavelength of 370 nm. The results were expressed as µmol / mg protein.

Quantification of redox balance (GSH / GSSG ratio)—The GSH / GSSG ratio was evaluated by measuring the content of GSH and GSSG, previously described by HISSIN And HILF (1976) (73). The reaction mixture consisted of phosphate-EDTA buffer (pH 8.0), liver homogenate (100 µg) and fluorescent *o*-phthalaldehyde (OPT) (1mg / mL), and fluorescence and was monitored with a spectrofluorimeter (FLUOStar Omega, USA) with wavelengths of 350nm excitation and 420nm emission.

Superoxide Dismutase Activity (SOD)—Determination of SOD activity was carried out according to Misra and Fridovich (1972) (74). The liver homogenate (80 µg protein) was incubated in sodium carbonate buffer (50 mM, pH 10.2, + 0.1 mM EDTA) in a water bath at 37 ° C. The reaction was initiated by the addition of 20 µL of epinephrine (150 mM) in acetic acid (0.05%) in a final volume of 1 mL. The absorbance was read at 480nm for 3 min on the GENESYS 10S UV-VIS spectrophotometer (Thermo Scientific). One unit of SOD was defined as the amount of protein required to inhibit the autoxidation of 1 µmol de epinephrine per minute. The results were expressed in U / mg protein.

Catalase Activity (CAT)—Catalase activity was monitored according to Aebi (1984) (75). The principle of the test is based on the determination of the decomposition of H_2O_2 . 80 μg of proteins added to a 50 mM phosphate buffer (sodium phosphate monobasic monohydrate + dibasic sodium phosphate), pH 7.0, 30 ° C. The reaction was then started with addition of 0.3 M H_2O_2 in a final volume of 1 mL. The absorbance decay was monitored at 240 nm on a GENESYS 10S UV-VIS spectrophotometer (Thermo Scientific) for 1 min. One unit of CAT was defined as the amount of protein required to convert 1 μmol de H_2O_2 per minute to H_2O . The results were expressed in U / mg protein.

Glutathione Peroxidase Activity (GPx)—The activity of glutathione peroxidase was monitored by the decrease in absorbance of NADPH at 340 nm in a spectrophotometer LIBRA S12 UV / VISIBLE for 4 minutes at 20 °C. The medium contained: 100 μg protein, 0.05 M buffer phosphate (pH 7.0) and 0.005 M EDTA, 0.0084 M NADPH, 1.125 M sodium azide, 0.15 M GSH, 0.003 M Glutathione reductase (GR) and 0.0022 M hydrogen peroxide (76). The results were expressed in U / mg protein.

Phosphofructokinase 1 Activity (PFK1)—The maximum activity of the enzyme was determined according to the method described by (77,78). The reaction system consisted of 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM MgCl_2 , 1.0 mM EDTA, 5 mM mercaptoethanol, 13 mM NADH, 20 mM ATP, 10 mM AMP, 5 mM aldolase, 5mM glucose-6-phosphate dehydrogenase and 5 mM triose-phosphate isomerase, to which the sample was added for a final volume of 0.25 mL. The assay was started by adding the substrate (1mM fructose-6-phosphate) and the enzymatic determinations were performed at 25 ° C for 10 min at 340 nm in a spectrofluorimeter (FLUOStar Omega, USA). The results were expressed in nmol / mg protein.

β -hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Activity (β -HAD) — β -HAD activity was determined according to Ito et al. (2010) (79). This enzyme has absolute specificity for the L-isomer of the substrate with hydroxyacyl, converts the hydroxyl at C-3 to a ketone and generates NADH. Its activity was evaluated in a spectrofluorimeter at a wavelength of 340 nm, for a final volume of 0.25 mL. A 50 mM Imidazole solution was prepared, then a reaction mix (50 mM Imidazole + 12 mM EDTA + 0.18 mM NADH). The reaction mix was incubated for one minute with 80 μg protein from each sample and 0.1 mM Acetyl-CoA was placed to initiate the reaction and the absorbance in spectrofluorimeter (FLUOStar Omega, USA) was read at 340 nm. The results were expressed in nmol / mg protein.

Citrate Synthase Activity (CS)—Citrate synthase is an important enzyme in the Krebs cycle, as it catalyzes the entry of carbon in this cycle. The enzyme catalyzes the reaction: oxaloacetate + acetyl-CoA + H_2O generating citrate + CoA + H^+ . The maximum activity of the enzyme was determined according to Alp et al. (1976) (80) from the quantification of the complex formed between the CoA released with the DTNB of the medium. The assay buffer contained 50 mM Tris-aminomethane, 1 mM EDTA, 0.2 mM DTNB, 0.1 mM acetyl-CoA, 0.5 mM oxaloacetate and 0.05% (v/v) Triton X-100, pH 8.1. The reaction was initiated by adding oxaloacetate to the medium and the enzymatic activity was performed at 25 °C for 10 min at 412 nm in a spectrophotometer (FLUOStar Omega, USA). The results were expressed in nmol / mg protein.

RNA Extraction, cDNA Synthesis and RT-PCR—Total RNA was extracted from the liver (100 μg) using TRIzol (Invitrogen) and treated with RNase-free. The synthesis of complementary DNA (cDNA) was carried out from total RNA (2 μg) using the following reagent mix: 146 ng of random primers and 200 U of the enzyme reverse transcriptase, the enzyme buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2),

5 mM DTT, 500 μ M dNTPs) in final volume of 20 μ L reaction. This mixture was incubated for 2 min at 25 °C to allow hybridization of random oligonucleotides to RNA. Reactions were carried out in a mixture (12 μ L) containing cDNA sample (2 μ L), following sense and antisense primers (0.6 μ L / 300nM) DEPC water (3.25 μ L) and mix Eva Master Mix (6 μ L) 50x + Rox (0.15 μ L). All the primer sequences (Table 1) were obtained from SIGMA and IDT including PGC-1 α , TFAM, NRF-1, mitofusin 2 (Mfn2), optic atrophy 1 (Opa 1), succinate dehydrogenase (SDH), citrate synthase (CS), cytochrome c oxidase subunit 5^a (COX 5^a), cytochrome c (Cyt c), pyruvate carboxylase (PC) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (β -had). Ribosomal protein L39 (RPL39) was used as reference gene. The real-time PCR was performed using the StepOne thermocycler (Applied Biosystems). The PCR conditions were set at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 10 s and 60 °C for 30 s. Real-time PCR data were analyzed using the Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems). The relative amount of mRNA was calculated using $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method (81).

Immunoblotting— Liver (50 mg) was homogenized in RIPA lysis buffer (50 mM Tris base, pH 7.5; 1 mM EDTA; triton X-100 1%, 1% deoxycholate, 0.1% SDS, 100 mM sodium fluoride, 10.09 mM sodium pyrophosphate, 10.28 mM sodium orthovanadate, 5 μ g/mL aprotinin, 1 μ g/mL leupeptin, 1mM PMSF. Then the samples were centrifuged at 14000 rpm at 4° C for 20 minutes and the supernatant was subjected to protein quantification. Proteins were extracted, separated by electrophoresis (60 μ g) on a polyacrylamide gel (10% or 12%) and transference was performed at 0.3 A, for 90 min in a semi dry system (Trans Blot Turbo, BioRad), as previously described (82,83). Nonspecific binding sites were blocked with 10% skimmed milk in TBS-Tween 20 for 1 h at room temperature. Membranes were then incubated with specific antibodies, and remained overnight at 4°C. Membranes were washed three times for 5 minutes with TBS-Tween 20 and incubated with specific secondary antibodies for 1 h at room temperature. Signals were revealed after reaction with enhanced chemiluminescence (Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent Prime), and the images were captured in Amersham Imager 600 (GE Healthcare, USA). The images were quantitated by densitometry using *Image J* software (NIH, Bethesda, MD, USA). Results were normalized by constitutive protein (β -actin). Antibodies were as follows: anti-PGC-1 α , anti-PPAR- γ , anti-Cytochrome c – (1:1000) Cell Signalling, anti-TFAM and anti- β -actin - (1:1000) Santa Cruz Biotechnology, anti-OXPPOS - (1:1000) Abcam, anti-mouse IgG, anti-rabbit IgG – (1:2500) Santa Cruz Biotechnology.

Transmission electronic microscopy—For routine procedures, the fragments of liver were fixed overnight in a solution containing 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer. After fixation, the samples were washed twice in the same buffer and then they were post-fixed in a solution containing 1% osmium tetroxide, 2 mM calcium chloride and 0.8% potassium ferricyanide in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, dehydrated in acetone, and embedded in Embed 812. Polymerization was performed at 60 °C for 3 days. Ultrathin sections were collected on 300-mesh nickel grids, counterstained with 5% uranyl acetate and lead citrate and examined using a FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN transmission electron microscope (84).

Statistical Analyses—The results are shown as representative traces or as the mean \pm S.E.M. of independent experiments. The sample size is indicated in the figure caption. Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism 6.0 software. An unpaired Student t-test was used to assess differences between groups. $p \leq 0.05$ was defined as significant.

Acknowledgments: The acquisition of the reagents used in this work was supported by the financial support from the Foundation to Support and Research from Pernambuco State—Brazil (FACEPE). We are also grateful to CAPES, which provide scholarships for RCSF.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Author contributions: R. C. S. F. performed experiments, analyzed results, interpreted the data, and wrote the paper. L. C. N. performed experiments. A. B. S performed experiments. C. M. F. performed experiments. L. H. B. performed experiments and analyzed results. M. B. A. performed experiments. K. L. A. S. performed experiments with transmission electron microscope. R. C. B. Q. support for using the transmission electron microscope. C. J. L. designed the experiments. A. C. R. L. performed experiments and analyzed results. L. R. S. designed the experiments with RT-PCR and Western Blotting, and interpreted the data. M. P. F. conceived the study, designed the experiments, performed the experiments, interpreted the data, and wrote the paper.

References

1. Vickers, M. H. (2011). Developmental programming of the metabolic syndrome - critical windows for intervention. *World J Diabetes* 2, 137-148
2. Velkoska, E., and Morris, M. J. (2011). Mechanisms behind early life nutrition and adult disease outcome. *World J Diabetes* 2, 127-132
3. Vieau, D. (2011). Perinatal nutritional programming of health and metabolic adult disease. *World J Diabetes* 2, 133-136
4. Pigliucci, M., Murren, C. J., and Schlichting, C. D. (2006). Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *J Exp Biol* 209, 2362-2367
5. Merila, J. (2015). Evolutionary biology: Perplexing effects of phenotypic plasticity. *Nature* 525, 326-327
6. Sasaki, A., Nakagawa, I., and Kajimoto, M. (1982). Effect of protein nutrition throughout gestation and lactation on growth, morbidity and life span of rat progeny. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 28, 543-555
7. Barker, D. J., and Thornburg, K. L. (2013). The obstetric origins of health for a lifetime. *Clin Obstet Gynecol* 56, 511-519
8. Ferreira, D. S., Liu, Y., Fernandes, M. P., and Lagranha, C. J. (2015). Perinatal low-protein diet alters brainstem antioxidant metabolism in adult offspring. *Nutr Neurosci*
9. Nascimento, L., Freitas, C. M., Silva-Filho, R., Leite, A. C., Silva, A. B., da Silva, A. I., Ferreira, D. S., Pedroza, A. A., Maia, M. B., Fernandes, M. P., and Lagranha, C. (2014). The effect of maternal low-protein diet on the heart of adult offspring: role of mitochondria and oxidative stress. *Appl Physiol Nutr Metab* 39, 880-887
10. Ferreira, D. J., da Silva Pedroza, A. A., Braz, G. R., da Silva-Filho, R. C., Lima, T. A., Fernandes, M. P., Doi, S. Q., and Lagranha, C. J. (2016). Mitochondrial bioenergetics and oxidative status disruption in brainstem of weaned rats: Immediate response to maternal protein restriction. *Brain Res* 1642, 553-561
11. Dhillon, A., and Randolph, H. S. (2012) Liver Diseases. in *Anesthesia and Uncommon Diseases*. pp 162-214

12. Pruis, M. G., van Ewijk, P. A., Schrauwen-Hinderling, V. B., and Plosch, T. (2014). Lipotoxicity and the role of maternal nutrition. *Acta Physiol (Oxf)* 210, 296-306
13. Chitturi, S., and Farrell, G. C. (2001). Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 21, 27-41
14. Mehta, K., Van Thiel, D. H., Shah, N., and Mobarhan, S. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutr Rev* 60, 289-293
15. Yoon, H. J., and Cha, B. S. (2014). Pathogenesis and therapeutic approaches for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 6, 800-811
16. Chaurasia, B., and Summers, S. A. (2015). Ceramides - Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders. *Trends Endocrinol Metab* 26, 538-550
17. Rolo, A. P., Teodoro, J. S., and Palmeira, C. M. (2012). Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* 52, 59-69
18. Quiros, P. M., Langer, T., and Lopez-Otin, C. (2015). New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 345-359
19. Labbe, K., Murley, A., and Nunnari, J. (2014). Determinants and functions of mitochondrial behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30, 357-391
20. Scarpulla, R. C., Vega, R. B., and Kelly, D. P. (2012). Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 23, 459-466
21. Kennedy, E. P., and Lehninger, A. L. (1949). Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 179, 957-972
22. Pernas, L., and Scorrano, L. (2016). Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annu Rev Physiol* 78, 505-531
23. Schrepfer, E., and Scorrano, L. (2016). Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism. *Mol Cell* 61, 683-694
24. Chen, H., McCaffery, J. M., and Chan, D. C. (2007). Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* 130, 548-562
25. Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E., and Chan, D. C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160, 189-200
26. Chan, D. C. (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125, 1241-1252
27. Mitchell, S. E., Delville, C., Konstantopoulos, P., Hurst, J., Deros, D., Green, C., Chen, L., Han, J. J., Wang, Y., Promislow, D. E., Lusseau, D., Douglas, A., and Speakman, J. R. (2015). The effects of graded levels of calorie restriction: II. Impact of short term calorie and protein restriction on circulating hormone levels, glucose homeostasis and oxidative stress in male C57BL/6 mice. *Oncotarget* 6, 23213-23237
28. Qasem, R. J., Li, J., Tang, H. M., Browne, V., Mendez-Garcia, C., Yablonski, E., Pontiggia, L., and D'Mello, A. P. (2015). Decreased liver triglyceride content in adult rats exposed to protein restriction during gestation and lactation: role of hepatic triglyceride utilization. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 42, 380-388
29. Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Montaurier, C., Even, P., Launay, J. M., Carraro, V., Maurin, A. C., Averous, J., Chaveroux, C., Bruhat, A., Mallet, J., Morio, B., and Fafournoux, P. (2014). Perinatal protein malnutrition affects

- mitochondrial function in adult and results in a resistance to high fat diet-induced obesity. *PLoS One* 9, e104896
30. Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148
 31. Moraes, C., Rebelato, H. J., Amaral, M. E., Resende, T. M., Silva, E. V., Esquisatto, M. A., and Catisti, R. (2014). Effect of maternal protein restriction on liver metabolism in rat offspring. *J Physiol Sci* 64, 347-355
 32. Borst, P., Loos, J. A., Christ, E. J., and Slater, E. C. (1962). Uncoupling activity of long-chain fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 62, 509-518
 33. Vaartjes, W. J., and van den Bergh, S. G. (1978). The oxidation of long-chain unsaturated fatty acids by isolated rat liver mitochondria as a function of substrate concentration. *Biochim Biophys Acta* 503, 437-449
 34. Gunter, T. E., and Pfeiffer, D. R. (1990). Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* 258, C755-786
 35. Vercesi, A. E., Ferraz, V. L., Macedo, D. V., and Fiskum, G. (1988). Ca²⁺-dependent NAD(P)⁺-induced alterations of rat liver and hepatoma mitochondrial membrane permeability. *Biochem Biophys Res Commun* 154, 934-941
 36. Akerman, K. E., and Wikstrom, M. K. (1976). Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett* 68, 191-197
 37. Figueira, T. R., Melo, D. R., Vercesi, A. E., and Castilho, R. F. (2012). Safranin as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells. *Methods Mol Biol* 810, 103-117
 38. Skulachev, V. P. (1998). Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1363, 100-124
 39. Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417, 1-13
 40. Kowaltowski, A. J., Castilho, R. F., and Vercesi, A. E. (2001). Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 495, 12-15
 41. Appenzeller-Herzog, C. (2011). Glutathione- and non-glutathione-based oxidant control in the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 124, 847-855
 42. Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N., Newsholme, E. A., Denton, R. M., and Pogson, C. I. (1966). Interactions of metabolism and the physiological role of insulin. *Recent Prog Horm Res* 22, 1-48
 43. Owen, O. E., Smalley, K. J., D'Alessio, D. A., Mozzoli, M. A., and Dawson, E. K. (1998). Protein, fat, and carbohydrate requirements during starvation: anaplerosis and cataplerosis. *Am J Clin Nutr* 68, 12-34
 44. Hue, L., and Taegtmeyer, H. (2009). The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E578-591
 45. Silveira, L. R., Pinheiro, C. H., Zoppi, C. C., Hirabara, S. M., Vitzel, K. F., Bassit, R. A., Barbosa, M. R., Sampaio, I. H., Melo, I. H., Fiamoncini, J., Carneiro, E. M., and Curi, R. (2011). [Regulation of glucose and fatty acid metabolism in skeletal muscle during contraction]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 55, 303-313
 46. Kawada, T., Goto, T., Hirai, S., Kang, M. S., Uemura, T., Yu, R., and Takahashi, N. (2008). Dietary regulation of nuclear receptors in obesity-related metabolic syndrome. *Asia Pac J Clin Nutr* 17 Suppl 1, 126-130
 47. Liesa, M., Borda-d'Agua, B., Medina-Gomez, G., Lelliott, C. J., Paz, J. C., Rojo, M., Palacin, M., Vidal-Puig, A., and Zorzano, A. (2008). Mitochondrial fusion is increased by the nuclear coactivator PGC-1beta. *PLoS One* 3, e3613

48. Soriano, F. X., Liesa, M., Bach, D., Chan, D. C., Palacin, M., and Zorzano, A. (2006). Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha, estrogen-related receptor-alpha, and mitofusin 2. *Diabetes* 55, 1783-1791
49. Westermann, B. (2012). Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochim Biophys Acta* 1817, 1833-1838
50. Rambold, A. S., Kostecky, B., Elia, N., and Lippincott-Schwartz, J. (2011). Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 10190-10195
51. Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S. E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B. F., Yuan, J., Deeney, J. T., Corkey, B. E., and Shirihai, O. S. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 27, 433-446
52. Gomes, L. C., Di Benedetto, G., and Scorrano, L. (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* 13, 589-598
53. Galloway, C. A., Lee, H., and Yoon, Y. (2012). Mitochondrial morphology-emerging role in bioenergetics. *Free Radic Biol Med* 53, 2218-2228
54. Liesa, M., Palacin, M., and Zorzano, A. (2009). Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* 89, 799-845
55. Liesa, M., and Shirihai, O. S. (2013). Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab* 17, 491-506
56. Zorzano, A., Hernandez-Alvarez, M. I., Sebastian, D., and Munoz, J. P. (2015). Mitofusin 2 as a driver that controls energy metabolism and insulin signaling. *Antioxid Redox Signal* 22, 1020-1031
57. Galgani, J. E., Moro, C., and Ravussin, E. (2008). Metabolic flexibility and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E1009-1017
58. Mandl, J., Meszaros, T., Banhegyi, G., Hunyady, L., and Csala, M. (2009). Endoplasmic reticulum: nutrient sensor in physiology and pathology. *Trends Endocrinol Metab* 20, 194-201
59. Gao, A. W., Canto, C., and Houtkooper, R. H. (2014). Mitochondrial response to nutrient availability and its role in metabolic disease. *EMBO Mol Med* 6, 580-589
60. Theurey, P., and Rieusset, J. (2017). Mitochondria-Associated Membranes Response to Nutrient Availability and Role in Metabolic Diseases. *Trends Endocrinol Metab* 28, 32-45
61. Reeves, P. G., Nielsen, F. H., and Fahey, G. C., Jr. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123, 1939-1951
62. Reeves, P. G. (1997). Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr* 127, 838S-841S
63. Schneider, W. C., and Hogeboom, G. H. (1951). Cytochemical studies of mammalian tissues; the isolation of cell components by differential centrifugation: a review. *Cancer Res* 11, 1-22
64. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254

65. Robinson, J., and Cooper, J. M. (1970). Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. *Anal Biochem* 33, 390-399
66. Nicholls, D., and Akerman, K. (1982). Mitochondrial calcium transport. *Biochim Biophys Acta* 683, 57-88
67. Vercesi, A. E., Hoffmann, M. E., Bernardes, C. F., and Docampo, R. (1991). Regulation of intracellular calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi*. Effects of calmidazolium and trifluoperazine. *Cell Calcium* 12, 361-369
68. LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., and Bondy, S. C. (1992). Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5, 227-231
69. Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Mari, M., Morales, A., and Fernandez-Checa, J. C. (1997). Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem* 272, 11369-11377
70. Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82, 70-77
71. Buege, J. A., and Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52, 302-310
72. Zanatta, A., Moura, A. P., Tonin, A. M., Knebel, L. A., Grings, M., Lobato, V. A., Ribeiro, C. A., Dutra-Filho, C. S., Leipnitz, G., and Wajner, M. (2013). Neurochemical evidence that the metabolites accumulating in 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency induce oxidative damage in cerebral cortex of young rats. *Cell Mol Neurobiol* 33, 137-146
73. Hissin, P. J., and Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74, 214-226
74. Misra, H. P., and Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247, 3170-3175
75. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105, 121-126
76. Paglia, D. E., and Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70, 158-169
77. Opie, L. H., and Newsholme, E. A. (1967). The activities of fructose 1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in white muscle and red muscle. *Biochem J* 103, 391-399
78. Mansour, T. E. (1965). Studies on Heart Phosphofructokinase. Active and Inactive Forms of the Enzyme. *J Biol Chem* 240, 2165-2172
79. Ito, M., Jaswal, J. S., Lam, V. H., Oka, T., Zhang, L., Beker, D. L., Lopaschuk, G. D., and Rebeyka, I. M. (2010). High levels of fatty acids increase contractile function of neonatal rabbit hearts during reperfusion following ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298, H1426-1437
80. Alp, P. R., Newsholme, E. A., and Zammit, V. A. (1976). Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J* 154, 689-700
81. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 25, 402-408

82. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24, 145-149
83. Lagranha, C. J., Hirabara, S. M., Curi, R., and Pithon-Curi, T. C. (2007). Glutamine supplementation prevents exercise-induced neutrophil apoptosis and reduces p38 MAPK and JNK phosphorylation and p53 and caspase 3 expression. *Cell Biochem Funct* 25, 563-569
84. Saraiva, K. L., Silva, A. K., Wanderley, M. I., De Araujo, A. A., De Souza, J. R., and Peixoto, C. A. (2009). Chronic treatment with sildenafil stimulates Leydig cell and testosterone secretion. *Int J Exp Pathol* 90, 454-462.

FIGURE CAPTIONS

FIGURE 1. High rate of mitochondrial oxygen consumption by low protein animals without change on respiratory control ratio. (A) Lines representing the oxygen consumption of mitochondria from control and low protein animals. Experiments performed in the presence of 500 μM EGTA, 2 μM rotenone and 5 mM succinate in a total volume of 1 ml. Rat liver mitochondria (RLM, 0.5 mg/ml), 200 μM ADP, 1 $\mu\text{g/ml}$ oligomycin and 1 μM CCCP were added where indicated by the arrows. Respiratory parameters (B): basal state (substrate presence), phosphorylation state (state 3, ADP presence), resting state (state 4, oligomycin presence) and uncoupling state (CCCP presence). (C) Respiratory control ratio (RCR, state 3/state 4). Data expressed as mean \pm S.E.M., n=6 for both groups. Statistical analysis: unpaired student t-test was applied. * $p < 0.05$, low protein group compared to control group.

FIGURE 2. Mitochondrial calcium resistance prevents against mitochondrial swelling. Rat liver mitochondria (RLM, 1 mg/ml) were incubated in the standard medium containing 30 μM Ca^{2+} and 5mM succinate in the presence or absence of 1 μM CsA, a classic inhibitor of mitochondrial permeability transition pore. Data expressed as mean \pm S.E.M., n=6 for the control group and n=5 for the low protein group. Statistical analysis: unpaired student t-test was applied. ** $p < 0.005$, low protein + Ca^{2+} compared to control + Ca^{2+} , * $p < 0.05$, control + Ca^{2+} + CsA compared to control + Ca^{2+} . Absorbance at 5 min.

FIGURE 3. Effect of protein restriction on the mitochondrial membrane electric potential ($m\Delta\Psi$). $m\Delta\Psi$ was determined in the presence of 10 μM Ca^{2+} . The reaction medium consisted 5 μM safranin and 5 mM succinate in a total volume of 2 mL. Rat liver mitochondria (RLM, 0.5 mg/ml) were added where indicated by the arrows. Data expressed as mean \pm S.E.M., n=5 for both groups. Statistical analysis: unpaired student t-test was applied. *** $p < 0.0005$. F.U., fluorescence units.

FIGURE 4. Ca^{2+} does not stimulate mitochondrial ROS production in liver of low protein animals. Rat liver mitochondria (RLM, 0.5 mg/ml) were incubated in the standard medium containing 5 μM $\text{H}_2\text{DCF-DA}$, 5mM succinate, 10 μM Ca^{2+} and presence or absence of the 500 μM EGTA. Data expressed as mean \pm S.E.M., n=4 for both groups. Statistical analysis: unpaired student t-test was applied. * $p < 0.05$, low protein compared to control; control + EGTA compared to control. F.U., fluorescence units.

FIGURE 5. Biomolecules are preserved against oxidative stress in liver of low protein animals. (A) Malondialdehyde content (MDA), (B) Content of oxidized proteins (carbonyls), (C) Sulfhydryl content. 200-300 μg of protein was used in the assay. Data expressed as mean \pm S.E.M., n = 8 for both groups. Statistical analysis: unpaired student t-test was applied.

FIGURE 6. Evaluation of liver enzymatic antioxidant systems activity. (A) SOD activity (n=8), (B) CAT activity (n=6), (C) GPx activity (n=7). The assay was performed with 80 μg of protein. Data expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analysis: unpaired student t-test was applied. **** $p \leq 0.0005$ compared to the control.

FIGURE 7. The liver redox state presents a positive balance in low protein animals. (A) Glutathione reduced (GSH) concentration, (B) glutathione oxidized (GSSG)

concentration and (C) GSH/GSSG ratio. Data expressed as mean \pm S.E.M., n=8 for both groups. Statistical analysis: unpaired student t-test was applied. *p<0.05, low protein group compared to control group.

FIGURE 8. Analysis of enzymes activity of the metabolism of carbohydrates, lipids and citric acid cycle in the liver. (A) Activity of PFK (glycolysis enzyme, n=5-6), (B) Activity of β -HAD (β -oxidation enzyme, n = 4-5) and (C) Activity of CS (acid citric enzyme, n= 8). Data expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analysis: unpaired student t-test was applied. **** p \leq 0.0005, compared to the control.

FIGURE 9. Mitochondrial biogenesis and metabolic enzymes are downregulated in liver, but mitochondrial fusion is stimulated. mRNA amplification analysis using Real Time-PCR (A) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α), nuclear respiratory factor 1 (NRF-1), mitochondrial transcription factor A (TFAM), mitofusin 2 (Mfn2) and optic atrophy 1 (Opa 1) associated with mitochondrial dynamics. (B) Citrate synthase (CS), succinate dehydrogenase (SDH), cytochrome c oxidase subunit 5^a (COX 5A) and cytochrome c (Cyt c) associated with mitochondrial metabolisms and function. (C) Pyruvate carboxylase (PC), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (β -had) associated with oxidative metabolisms. Data expressed as mean \pm S.E.M., n=4 for both groups. Statistical analysis: unpaired student t-test was applied. *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, low protein group compared to control group.

FIGURE 10. Expression of proteins in liver. Western blotting analysis of control and low protein animals groups. (A) Representative western blot showing expression of electron transport complex and oxidative phosphorylation (OXPHOS) proteins. Densitometric quantification of proteins is shown in Figure 10B. (C) Representative western blot showing expression of Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α), mitochondrial transcription factor A (TFAM), cytochrome c (Cyt c) and peroxisome proliferator-activated receptor - γ (PPAR- γ) proteins. Densitometric quantification of proteins is shown in Figure 10D. Values are normalized to β -actin level. Antibodies + molecular weights are indicated on the *right side* of the blots, and molecular weights marker (MW) are on the *left side*. Data expressed as mean \pm S.E.M., n=3 for both groups. TFAM, n=4 for both groups. Statistical analysis: unpaired student t-test was applied. *p<0.05, low protein group compared to control group.

FIGURE 11. Maternal protein restriction alters liver glycogen content and mitochondrial morphology and mitochondria ER-interaction. (A) and (C) - Liver from control animals. (B) and (D) Liver of low protein animals. (E) Morphology of the mitochondria of control animals; (F) Morphology of mitochondria of low protein animals. (G) Morphology of mitochondria isolated from control animals. (H) Morphology of mitochondria isolated from low protein animals. Images A, B, C and D correspond to an increase of 8200x and the images E, F, G and H correspond to an increase of 16500x. The black arrows indicate mitochondria and the white arrows indicate the presence of glycogen granules. N = nucleus. RER = rough endoplasmic reticulum. For these analyzes, 10 images per experimental group were evaluated.

TABLE 1
Real-time PCR primers used in this study

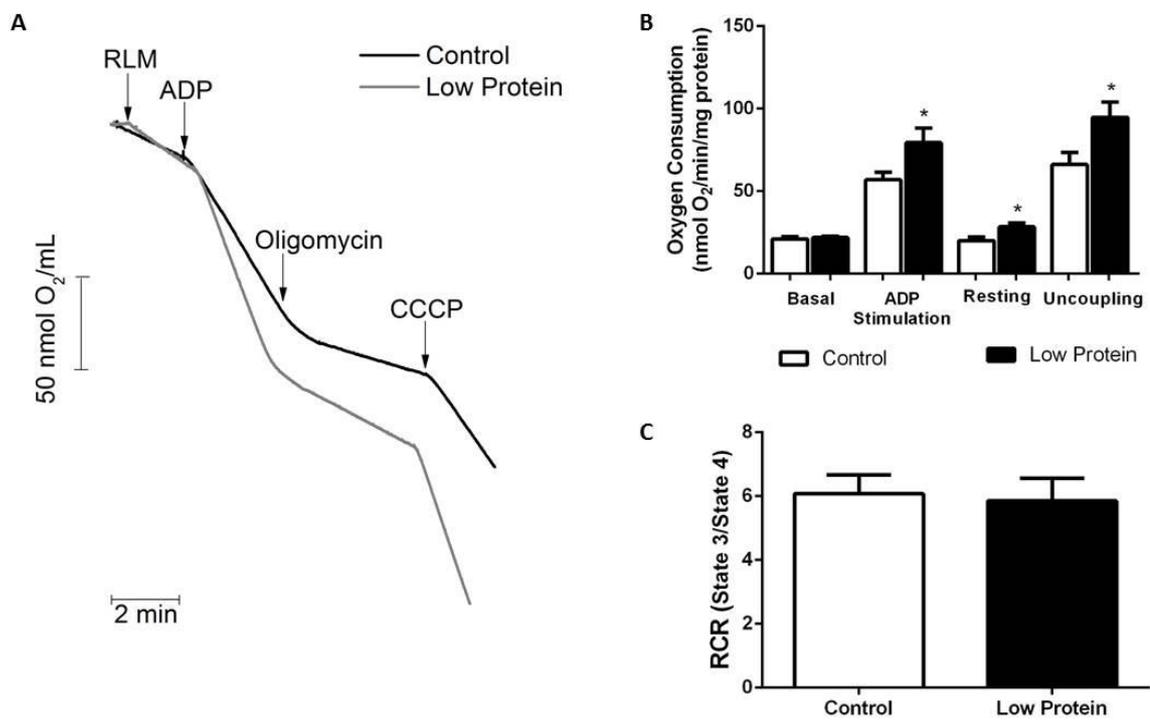
<i>Gene</i>	<i>Sense primer (5' – 3')</i>	<i>Antisense primer (5' – 3')</i>
<i>PGC-1α</i>	CAAGCCAAACCAACAACCTTTATCTCT	CACACTTAAGGTTTCGCTCAAAAGT
<i>NRF-1</i>	GCCCAAGTGAATTACTCTGC	TCGTCTGGATGGTCATTTTAC
<i>TFAM</i>	ACCCAGATGCAAACTTTTCAG	CTGCTCTTTATACTTGCTCACAG
<i>Mfn2</i>	CATGTCCATGATGCCCAACC	AGGGGAAGCATTACCTCAG
<i>OPA1</i>	AAAGCCCTTCCCAGTTCAGA	GTGTACCCGCAGTGAAGAAA
<i>SDH</i>	ACCCCTTCTCTGTCTACCG	ACCCCTTCTCTCTCTACCG
<i>Citrate synthase</i>	GTGTCAGATGAGAAGTTACGAGAC	TCCTTAGGCAGATGTTTCAG
<i>Cytochrome c</i>	AGGCAAGCATAAGACTGGAC	ACTCCATCAGGGTATCCTCTC
<i>COX 5A</i>	TGTTGGCTATGATCTGGTTCC	TTATGAGGTCCTGCTTTGTCC
<i>PC</i>	GAGCTTATCCCGAACATCCC	TCCATACCATTCTCTTTGGCC
<i>PEPCK</i>	TTGGGTGGCCGTAGACCTGC	GACCTTGCCCTTATGCTCTGCA
<i>β-had</i>	TCTTGACTATGTTGGACTGGATAC	AAGGACTGGGCTGAAATAAGG
<i>RPL39</i>	AATCGTCCCATTCCCCAGTG	CCCAGCTTGGTTCTTCTCCA

TABLE 2**Oxygen consumption by isolated liver mitochondria from rats**

Data are the mean \pm S.E.M. (n = 3), performed in duplicate. Isolated liver mitochondria from the control and low protein rats were incubated (0.5 mg/ml) in standard reaction medium, according with experimental conditions, in the presence of the BSA (0.2%). ADP (200 μ M) followed by oligomycin (1 μ g/mL) were added to achieve the ADP-stimulated and the resting respiratory states, respectively. Statistical analysis: unpaired student t-test was applied. *p<0.05, low protein compared to control.

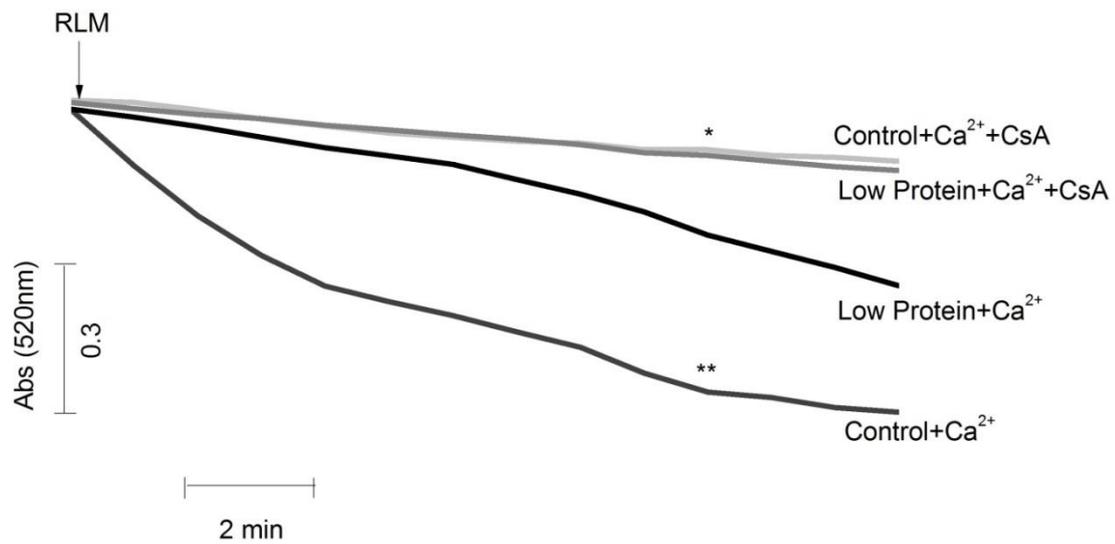
Substrate + Inhibitor	Group	Respiratory rate (nmol O ₂ /min/mg protein)	
		ADP-Stimulated	Resting
Complex I (Malate, pyruvate, α -ketoglutarate and glutamate)	Control	31.17 \pm 4.06	5.85 \pm 2.29
	Low protein	86.59 \pm 22.72*	17.32 \pm 7.33
Complex II (Succinate + rotenone)	Control	41.49 \pm 17.84	13.93 \pm 1.44
	Low protein	80.11 \pm 10.47*	21.57 \pm 4.52*
Complex IV (TMPD and Ascorbate + Antimycin A)	Control	21.8 \pm 8.92	11.94 \pm 4.16
	Low protein	28.19 \pm 4.07	16.47 \pm 0.38

Figure 1



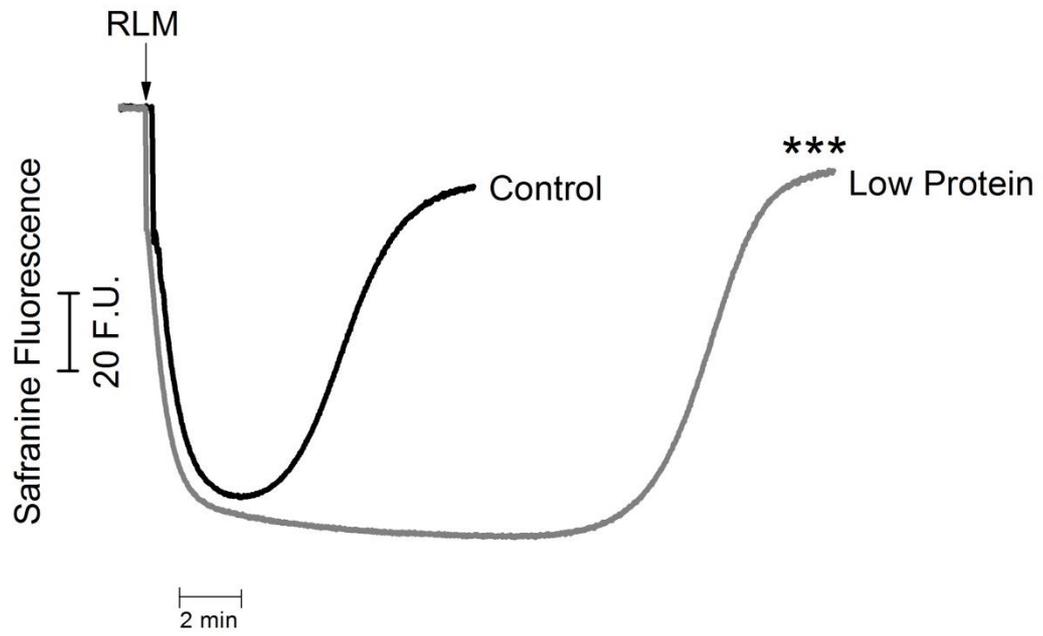
SILVA-FILHO et al.

Figure 2



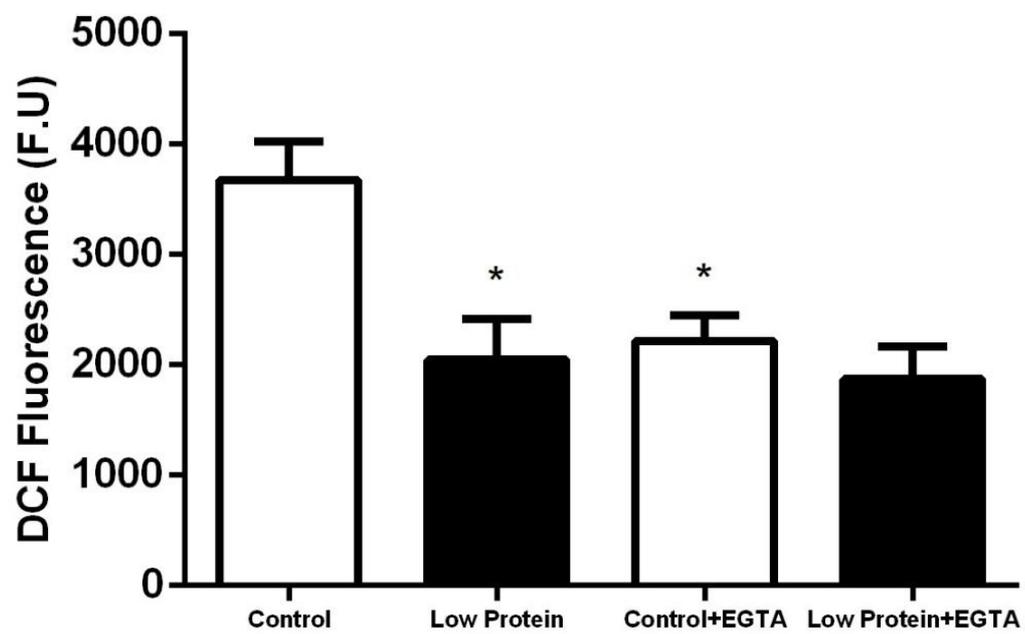
SILVA-FILHO et al.

Figure 3



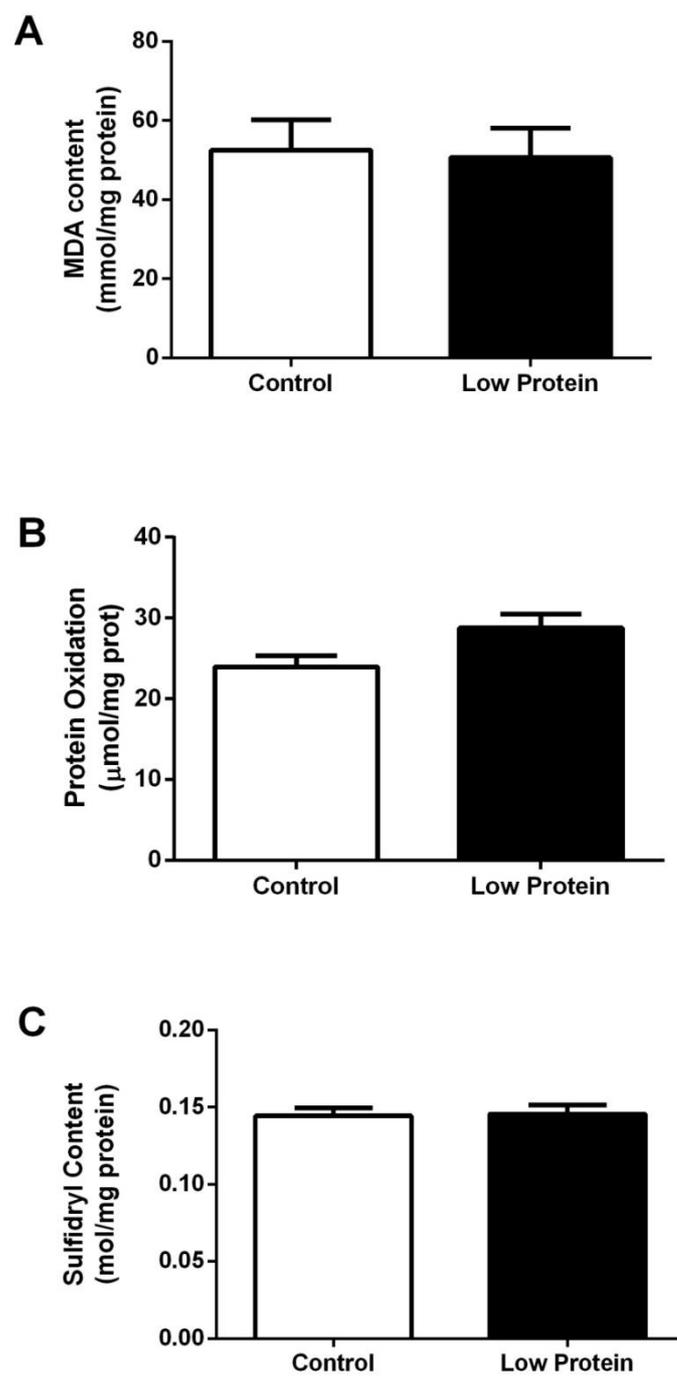
SILVA-FILHO et al.

Figure 4



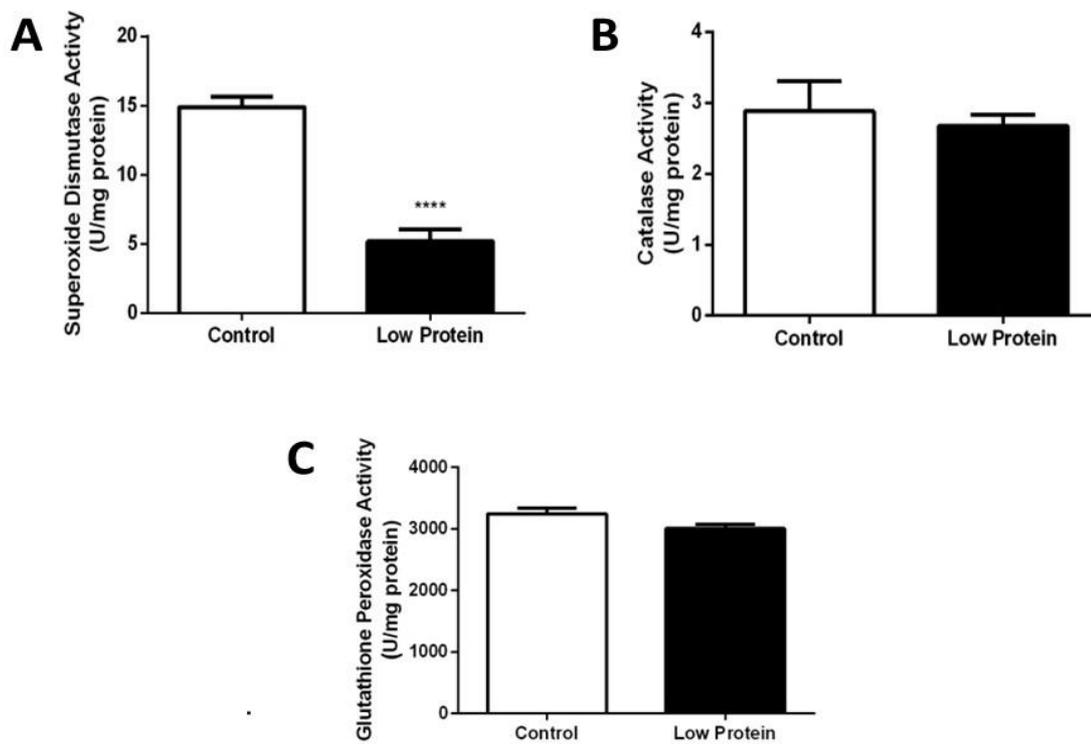
SILVA-FILHO et al.

Figure 5



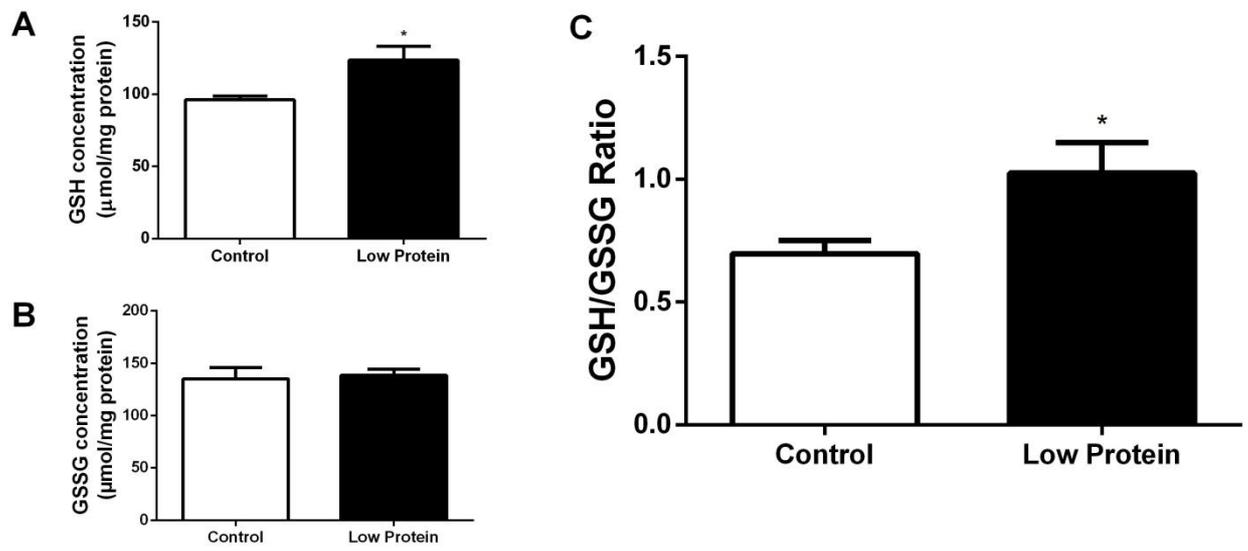
SILVA-FILHO et al.

Figure 6



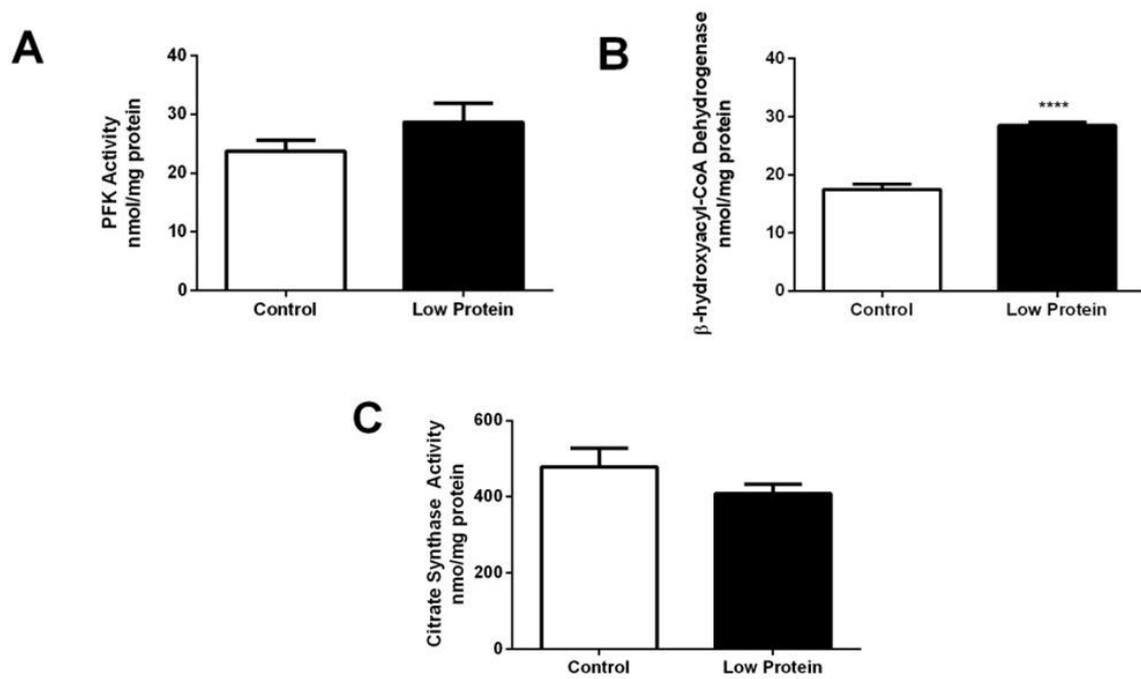
SILVA-FILHO et al.

Figure 7



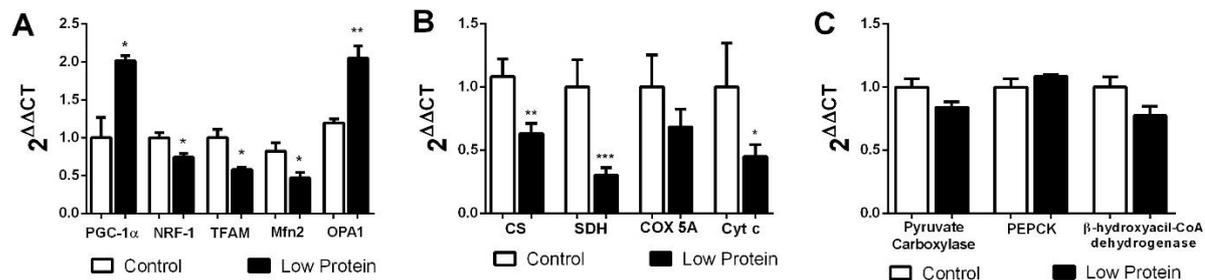
SILVA-FILHO et al.

Figure 8



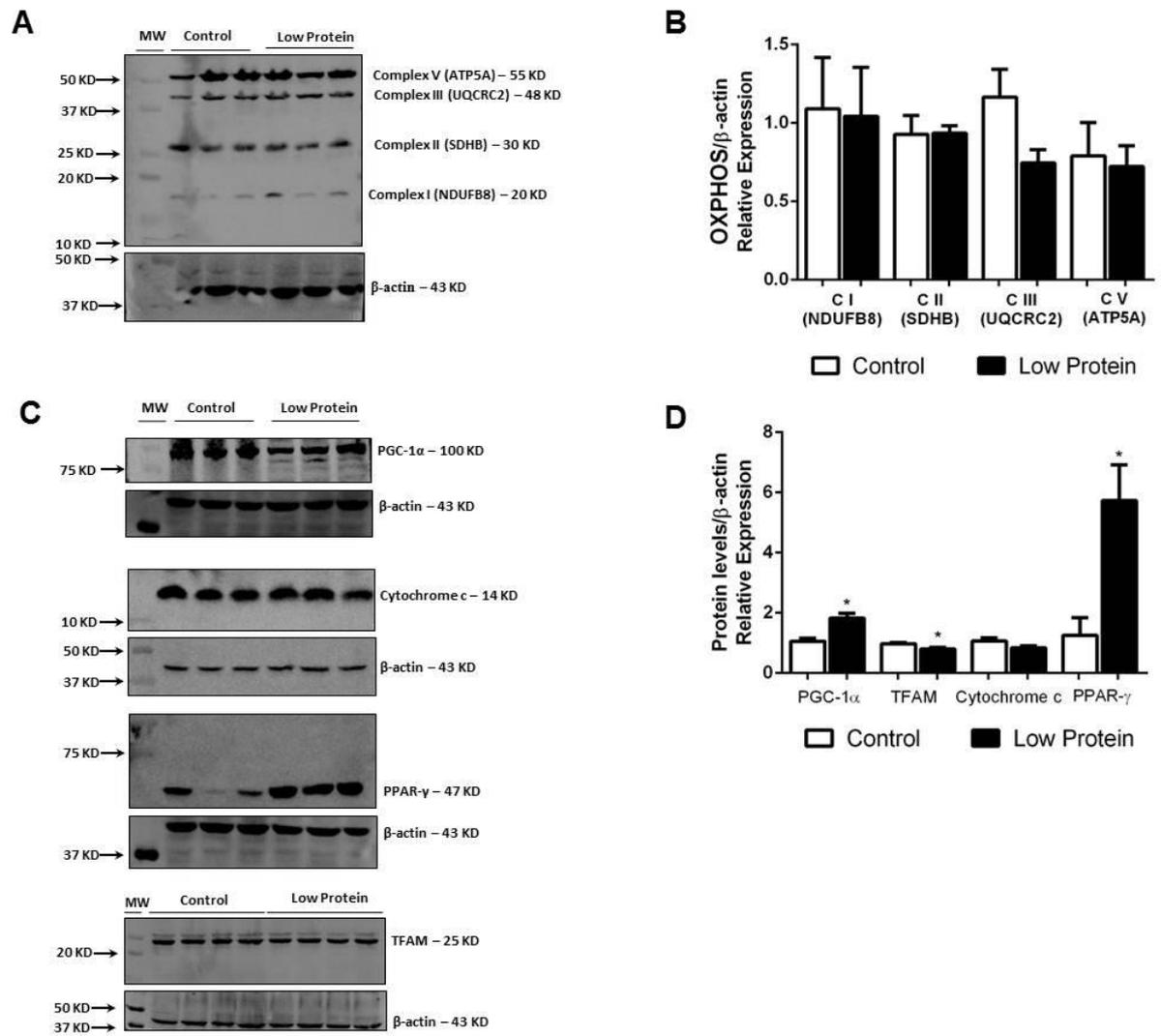
SILVA-FILHO et al.

Figure 9



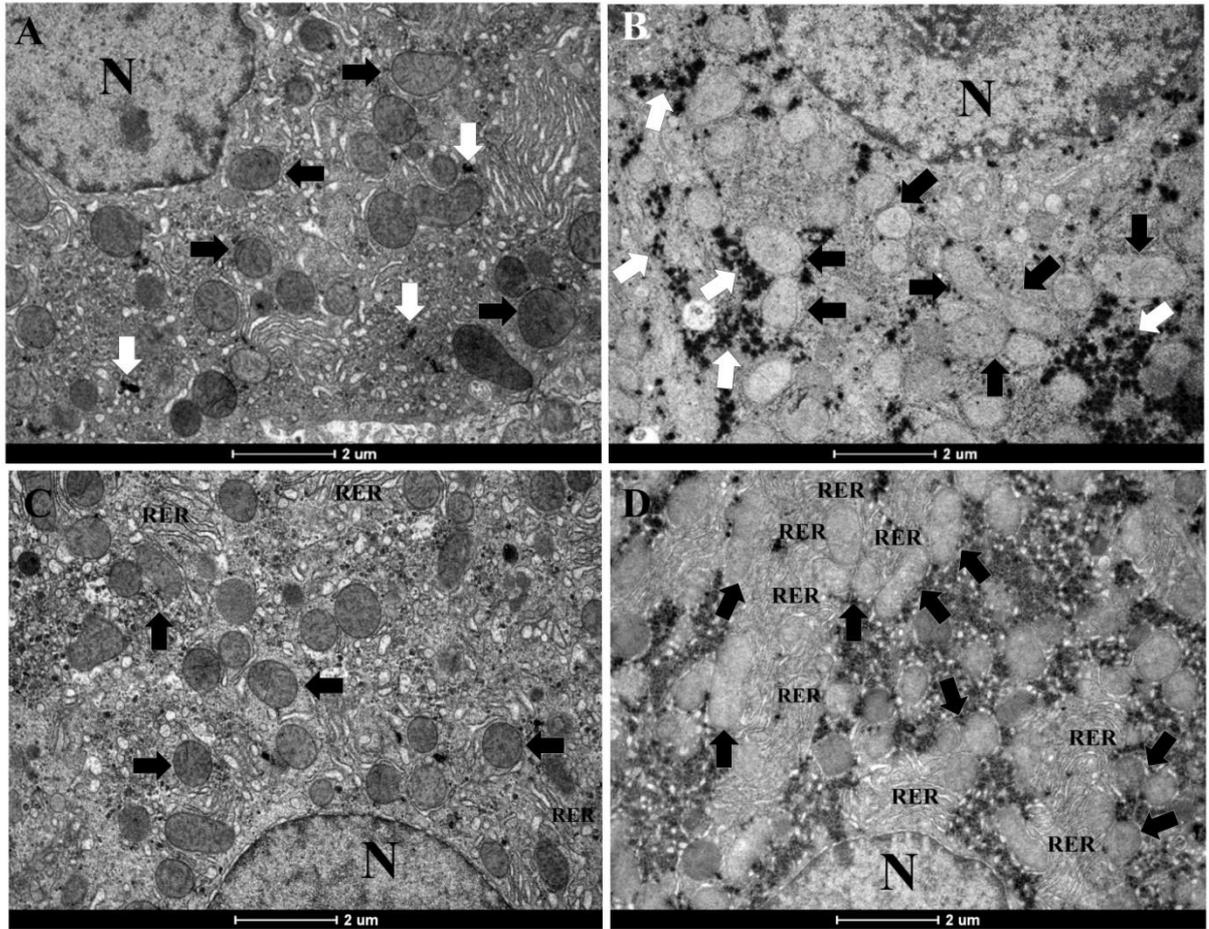
SILVA-FILHO et al.

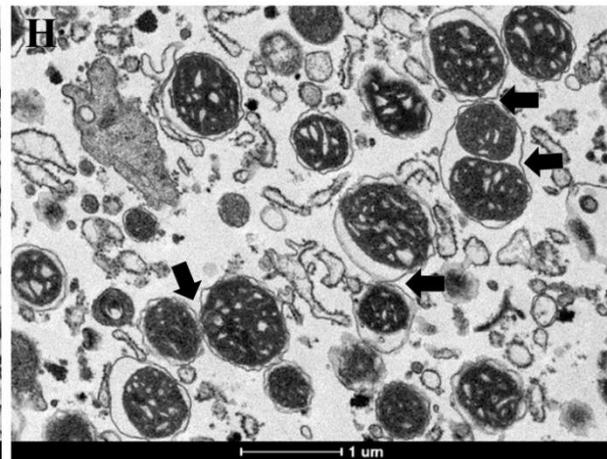
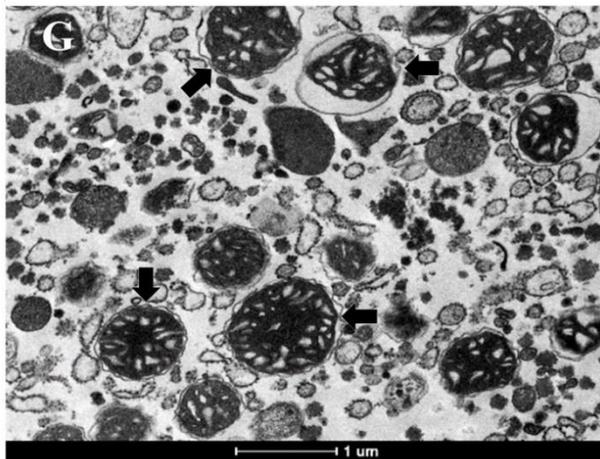
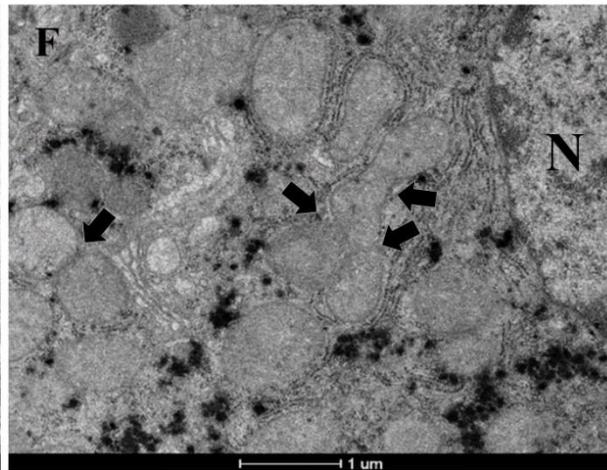
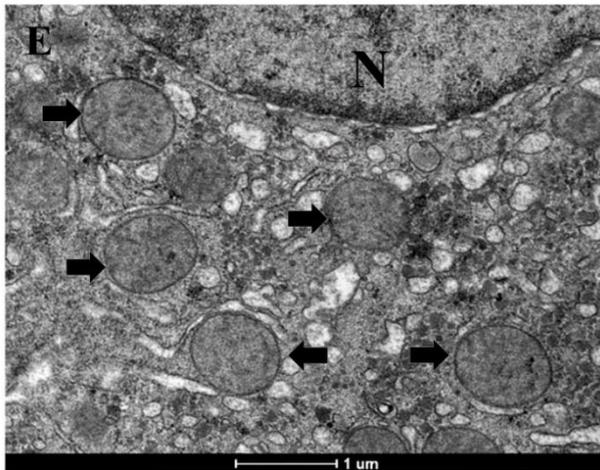
Figure 10



SILVA-FILHO et al.

Figure 11





SILVA-FILHO et al.

7. CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos a partir do estudo realizado, é possível concluir que a restrição proteica materna, durante o período crítico do desenvolvimento que compreende a gestação e lactação, foi capaz de induzir uma adaptação metabólica no fígado de ratos machos adultos da linhagem Wistar. Dentre as adaptações observadas, destaca-se a otimização da bioenergética mitocondrial hepática através de uma maior eficiência na capacidade oxidativa desta organela, o que permitiu manter sua integridade, assim como preveniu o quadro de estresse oxidativo. Uma das explicações que podem ter levado a essa melhora na funcionalidade das mitocôndrias, pode ser o fato de que estas organelas são capazes de modificar sua arquitetura a fim de manter a homeostase energética em situações de estresse impostas pelo ambiente. Notou-se que estas organelas apresentam estrutura fusionada, mais alongada, o que garante maior resistência, manutenção do potencial elétrico de membrana mitocondrial e maior eficiência metabólica, uma vez que alongadas, as mitocôndrias são capazes de garantir maior fluxo de substratos para a matriz para gerar energia na forma de ATP.

Além disso, uma das adaptações metabólicas geradas no fígado desses animais desnutridos foi o aumento da atividade da enzima β -HAD, indicando que esse órgão utiliza preferencialmente ácidos graxos como substrato energético e poupa glicogênio para outros tecidos como o cérebro, rins e hemácias. Vale salientar, que essa modulação positiva do metabolismo hepático e especificamente da bioenergética mitocondrial, não permite concluir que esse foi um efeito benéfico gerado pelo insulto nutricional, e sim uma tentativa do organismo de compensar o déficit energético que provavelmente foi causado durante a gestação e lactação, com a finalidade de manutenção da vida. Isso se deve provavelmente pelo fato do fígado atuar como sensor de nutrientes, sintetizando e fornecendo substrato energético na forma de glicose, ácido graxo e provavelmente corpos cetônicos, para outros órgãos, como por exemplo, cérebro, coração e músculo esquelético. A literatura ressalta diversos efeitos deletérios da restrição proteica em vários tecidos, talvez por isso o fígado tenha se tornado resistente nesses animais adultos.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** v. 105, p. 121-6, 1984.
- ÅKERMAN K.E.O, WIKSTROM K.F. Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Lett**, v. 68, p.191-7, 1976.
- ALP, P. R., NEWSHOLME, E. A.; ZAMMIT, V. A. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **Biochem J.** v. 154, n. 3, p. 689-700, 1976.
- ANDERSEN, J. K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? **Nat. Med.**, v. 10, n. 5, p. 18–25, 2004.
- ARMSTRONG, J. S.; WHITEMAN, M. Measurement of Reactive Oxygen Species in Cells and Mitochondria. **In: Pon, L.A., Schon, E. A. (eds) Mitochondria**, p. 355-377, 2007.
- BALLINGER, S. W. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. **Free Radic.Biol. Med**, v. 38, p. 1278–1295, 2005.
- BANERJEE, A. et al. Oxidant, antioxidant and physical exercise. **Molec Cell Biochem**, v. 253, n. 1-2, p. 307-312, 2003.
- BARKER D. J. et al.. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. **BMJ**, v. 298, n. 6673, p. 564-7, 1989.
- BARKER D. J., OSMOND C. Diet and coronary heart disease in England and Wales during and after the Second World War. **J Epidemiol Comm Health**, v. 40, n. 1, p. 37-44, 1986.
- BARKER, D. J.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet**, v.1, n.8489, 10, p.1077-81, 1986.
- BARKER, D. J.; THORNBURG, K. L. The obstetric origins of health for a lifetime. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 56, p. 511–519, 2013.
- BARKER, D.J. et al. Maternal and social origins of hypertension. **Hypertension**, v. 50, n. 3, p. 565-71, 2007.
- BARUA S.; JUNAID M. A. Lifestyle, pregnancy and epigenetic effects. **Epigenomics**, v. 7, n. 1, p.85-102, 2015.
- BATES, T. E.; et al. Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 213, p. 896-900, 1995.
- BATESON, P.; et al. Developmental plasticity and human health. **Nature**, v. 430, n. 6998, p. 419–421, 2004.

BATISTA, T. M., et al. Taurine supplementation improves liver glucose control in normal protein and malnourished mice fed a high-fat diet. **Mol Nutr Food Res**, v. 57, n. 3, p. 423-34, 2013.

BEATH, S.V. Hepatic function and physiology in the newborn. **Seminars in Neonatology**; v. 8, p. 337–346, 2003.

BHUTTA, Z. A., et al. Lancet Nutrition Interventions Review Group; Maternal and Child Nutrition Study Group. Evidence-based interventions for improvement of maternal and child nutrition: what can be done and at what cost? **Lancet**, v. 382, n. 9890, p. 452–77, 2013.

BLACK, R. E., et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. **Lancet**, v. 382, n. 9890, p. 427–51, 2013.

BLEI, A., MAZHAR, S., DAVIDSON, A. Hemodynamic evaluation before liver transplantation: insights into the portal hypertensive syndrome. **J Clin Gastroenterol**, v. 41, p. 323-329, 2007.

BLEI, A.T., OLAFSSON, S. AND THERRIEN, G. Ammonia-induced brain edema and intracranial hypertension in rats after portacaval anastomosis. **Hepatology**, v. 19, p. 1437-1444, 1994.

BORST, T. P., et al. Uncoupling activity of long-chain fatty acids. **Biochim Biophys Acta**, v. 62, p. 509–518, 1962.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J**, v. 134, n. 3, p.707-16, 1973.

BOVERIS, A., OSHINO, N., CHANCE, B. The cellular production of hydrogen peroxide. **Biochem. J**, v. 128, p. 617–630, 1972.

BRADFORD et al. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRONS, C., et al. Mitochondrial function in skeletal muscle is normal and unrelated to insulin action in young men born with low birth weight. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, p. 3885-3892. 2008.

BRUSTOVETSKY, N.; KLINGENBERG, M. Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca^{2+} . **Biochemistry**, v. 35, n. 26, p. 8483-8, 1996.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302-10, 1978.

CADENAS, E., et al. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 180, p. 248-257, 1977.

- CADENAS, E.; DAVIES, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 29, p. 222–230, 2000.
- CARAFOLI E. Intracellular calcium homeostasis. **Annu Rev Biochem**, v. 56, p. 395-433, 1987.
- CASTILHO R. F., et al. Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II) citrate is potentiated by Ca²⁺ and includes lipid peroxidation and alterations in membrane proteins. **Arch Biochem Biophys**, v. 308, n. 1, p. 158-63, 1994.
- CASTILHO, R. F., et al. Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II) citrate or t-butyl hydroperoxide in the presence of Ca²⁺: effect of coenzyme Q redox state. **Free Radic Biol Med**, v. 18, n. 1, p. 55-9, 1995.
- CHEN, H., MCCAFFERY, J.M.; CHAN, D.C. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. **Cell**, v. 130, p. 548–562, 2007.
- CHISOLM, G. M., STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. **Free Radic Biol Med**, v. 1528, n. 12, p. 1815-26, 2000.
- CHITTURI S., FARRELL, G. C. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Semin Liver Dis**, v. 21, n. 1, p. 27-41, 2001.
- CONDE, W. L.; MONTEIRO, C. A. Nutrition transition and double burden of undernutrition and excess of weight in Brazil. **Am J Clin Nutr**, v. 100, p.1617S–22S. 2014.
- CORREIA, L. L., et al. Prevalence and determinants of child undernutrition and stunting in semiarid region of Brazil. **Rev Saúde Pública**, v. 48, n. 1, p. 19-28, 2014.
- CROMPTON, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. **Biochem J**, v. 341, n. 2, p. 233-49, 1999.
- DA SILVA ARAGÃO, R., et al. Maternal protein restriction impairs the transcriptional metabolic flexibility of skeletal muscle in adult rat offspring. **Br J Nutr**, v. 112, n. 3, p. 328-37, 2014.
- DE BOO H. A; HARDING, J. E. Protein metabolism in preterm infants with particular reference to intrauterine growth restriction. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, v. 92, p. 315-9, 2007.
- DE ONIS, M., MONTEIRO, C., CLUGSTON, G. The worldwide magnitude of protein energy malnutrition: An overview from the WHO global database on child growth. **Bull. World Health Organ**, v. 71, p. 703-712, 1993.
- DEN BOER, M. E., WANDERS, R. J., MORRIS, A. A. et al. Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: clinical presentation and follow up of 50 patients. **Pediatrics**, v. 109, p. 99–104, 2002.
- DHILLON, A.; RANDOLPH, H. S. Liver Diseases. **Anesthesia and Uncommon Diseases. Chapter 5**, p. 162-214, 2012.

DIAZ, F.; MORAES, C. T. Mitochondrial biogenesis and turnover. **Cell Calcium**, v. 44, p. 24–35, 2008.

DIKALOV, S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. **Free Radic Biol Med**, v. 51, p. 1289–1301, 2011.

DOS SANTOS PEREZ, G., et al. Maternal and post-weaning exposure to a high fat diet promotes visceral obesity and hepatic steatosis in adult rats. **Nutr Hosp**, v. 32, n. 4, p. 1653-8, 2015.

EINSTEIN, F. H. Multigenerational effects of maternal undernutrition. **Cell Metabolism**, v. 19, 2014.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v. 82, n. 1, p. 70-7, 1959.

FALCK-YTTER, Y., et al. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. **Seminars in Liver Disease**, v. 21, p. 17-26, 2001.

FERNANDES, M. P., et al. The Cratylia mollis seed lectin induces membrane permeability transition in isolated rat liver mitochondria and a cyclosporine a-insensitive permeability transition in Trypanosoma cruzi mitochondria. **J Eukaryot Microbiol**, v. 61, n. 4, p. 381-8, 2014.

FERREIRA, D. J. S., et al. Perinatal low-protein diet alters brainstem antioxidant metabolism in adult offspring. **Nutritional Neuroscience (Online)**, 2015.

FIGUEIRA, T. R. et al. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 16, p. 2029-74, 2013.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of Food Insecurity in the Global nutrition report: actions and accountability to accelerate the world progress on nutrition. **International Food Policy Research Institute**, 2014.

FREITAS, I., et al. In Situ Evaluation of Oxidative Stress in Rat Fatty Liver Induced by a Methionine- and Choline-Deficient Diet. **Oxid Med Cell Longev**, ID, 9307064, 2016.

FUKUI, H.; MORAES, C. T. The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis? **Trends Neurosci**, v. 31, p. 251–256, 2008.

GALGANI, J. E. et al. Metabolic flexibility and insulin resistance. **Am. J. Physiol. Endocrinol Metab**, v. 295, pp. E1009–E1017, 2008.

GALLOWAY, C. A., HAKJOO, L. AND YISANG, Y. Mitochondrial morphology – Emerging role in bioenergetics. **Free Radic Biol Med**, v. 53, n. 12, p. 2218–2228, 2012.

GAO, A. W. et al. Mitochondrial response to nutrient availability and its role in metabolic disease. **EMBO Mol. Med.**, v. 6, p. 580–589, 2014.

- GARCIA-RUIZ, C., et al. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. **J Biol Chem.**, v. 272, p. 11369-77, 1997.
- GLANCY, B., BALABAN, R. S. Role of mitochondrial Ca^{2+} in the regulation of cellular energetics. **Biochemistry**, v. 51, p. 2959-73, 2012.
- GLEYZER, N., VERCAUTEREN, K., SCARPULLA, R. C. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. **Mol Cell Biol**, v. 25, p. 1354–1366, 2005.
- GOMES, L. C., DI BENEDETTO, G., SCORRANO, L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. **Nat Cell Biol**, v. 13, p. 589–598, 2011.
- GREEN, D. R., REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1309-12, 1998.
- GRIJALBA, M. T., VERCESI, A. E., SCHREIER, S. Ca^{2+} -induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca^{2+} -stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. **Biochemistry**, v. 38, n. 40, p. 13279-87, 1999.
- GROSE, R. D., NOLAN, J., and DILLON J. F. Exercise-induced left ventricular dysfunction in alcoholic and non-alcoholic cirrhosis. **J Hepatol**, v. 22, p. 326-332, 1995.
- GUNTER, T. E. & PFEIFFER, D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. **Am.J.Physiol**, v. 258, p. C755–C786, 1990.
- GUNTER, T. E., et al. Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. **Cell Calcium**, v. 28, p. 285–296, 2000.
- HALES C. N., et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. **BMJ**, v. 303, n. 6809, p. 1019-22, 1991.
- HALES, C. N., BARKER, D. J. The thrifty phenotype hypothesis. **British Medical Bulletin**, v. 60, p.5–20, 2001.
- HALES, C. N., BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **International Journal of Epidemiology**, v. 42, p. 1215–1222, 2013.
- HAMANAKA, R. B.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. **Trends Biochem Sci**, v. 35, p. 505–513, 2010.
- HAWLEY, J. A. Nutritional strategies to enhance fat oxidation during aerobic exercise. In: Burke L, Deakin V, eds. **Clinical Sports Nutrition**, p. 428-54, 1994.

HAWORTH, R. A., HUNTER, D. R. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. **Arch Biochem Biophys**, v. 195, n. 2, p. 460-7, 1979.

HIDALGO, C., DONOSO, P. Crosstalk between calcium and redox signaling: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, p. 1275-312, 2008.

HISSIN, P. J. and HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.*, v. 74, p. 214-226, 1976.

HRACSKO, Z., et al. Evaluation of oxidative stress markers in neonates with intra-uterine growth retardation. **Redox Rep**, v. 13, p. 11–16, 2008.

HUE, L. and TAEGTMEYER, H. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*, v. 297, p. E578–E591, 2009.

HYATT, M. A., BUDGE, H., SYMONDS, M. E. Early developmental influences on hepatic organogenesis. **Organogenesis**, v. 4, p. 170–175, 2008.

IAN, Y. M. and ASHISH, C. S. Obesity and nutrition disorders. **Anesthesia and Uncommon Diseases, Chapter 6**, p. 215-224, 2016.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Rio de Janeiro.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pof/2008_2009/POPublicacao.pdf, 2010. Acessado em: 05/05/2016.

ITO, M., et al. High levels of fatty acids increase contractile function of neonatal rabbit hearts during reperfusion following ischemia. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 298, n. 5, p. H1426-37, 2010.

JENSEN, C. B., et al. Altered PI3-kinase/Akt signalling in skeletal muscle of young men with low birth weight. **PLoS ONE**, v. 3, p. e3738, 2008.

JEQUIER, E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 967, p. 379–388, 2002.

JONES, R. H. e OZANNE, S. E. Fetal programming of glucose–insulin metabolism. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 297, p. 4–9, 2009.

JOUSSE, C., et al. Perinatal protein malnutrition affects mitochondrial function in adult and results in a resistance to high fat diet-induced obesity. **PLoS One**; v. 9, n. 8, p. e104896, 2013.

KAMEL, M. A., et al. Maternal obesity and malnutrition in rats differentially affect glucose sensing in the muscles and adipose tissues in the offspring. **Int J Biochem Res Rev**, v. 4, p. 440–469, 2014.

KAWADA, T., et al. Dietary regulation of nuclear receptors in obesity-related metabolic syndrome. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 17, n. 1, p. 126-30, 2008.

KENNEDY, E. P.; LEHNINGER, A. L. Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria. **J Biol Chem**, v. 179, n. 2, p. 957-72, Jun 1949.

KLINGENBERG, M. Uncoupling proteins--how do they work and how are they regulated. **IUBMB Life**, v. 52, n. 3-5, p. 175-9, 2001.

KOMIYA, Y., HABAS, R. Wnt signal transduction pathways. **Organogenesis**, v. 4, p. 68-75, 2008.

KOWALTOWSKI, A. J., et al. MITOCHONDRIA AND REACTIVE OXYGEN SPECIES. **FREE RADICBIOL MED**, v. 47, n.4, p. 333-43, 2009.

KOWALTOWSKI, A. J., VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 26, n. 3-4, p. 463-71, 1999.

LAGRANHA, C. J., et al. Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. **Circ. Res.**, v. 106, p. 1681-1691, 2010.

LAGRANHA, C. J., HIRABARA S. M. CURI, R., PITHON-CURI, T. C. Glutamine supplementation prevents exercise-induced neutrophil apoptosis and reduces p38 MAPK and JNK phosphorylation and p53 and caspase 3 expression. **Cell Biochem Funct**, v. 25, p. 563-569, 2007.

LARROQUE, B., SAMAIN, H., GROUPE EPIPAGE. Epipage study: mortality of very premature infants and state of progress at follow up. **J Gynecol Obstet Biol Reprod**, v. 30, n. 6, 2001.

LEANDRO, C. G., et al. Maternal moderate physical training during pregnancy attenuates the effects of a low-protein diet on the impaired secretion of insulin in rats: potential role for compensation of insulin resistance and preventing gestational diabetes mellitus. **J Biomed Biotechnol**. ID. 805418, p. 1-7, 2012.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.*, 5: 227-31, 1992 NICHOLLS, D.G., ÅKERMAN, K.E.O. Mitochondrial calcium transport. **Biochim Biophys Acta**, v. 683, p. 57-88, 1982.

LEHMAN, J. J. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. **J. Clin. Invest**, v. 106, p. 847-856, 2000.

LEHNINGER, A. L., et al. Regulation of Ca^{2+} release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. **Proc Natl Acad Sci**, v.75, n.4, p. 1690-4, 1978.

- LEVIN B. E. Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 361, p. 1107–1121, 2006.
- LIESA, M. and SHIRIHAI, O. S. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. **Cell Metab**, v. 17, p. 491–506, 2013.
- LIESA, M., BORDA-D'AGUA, B., MEDINA-GOMEZ, G., LELLIOTT, C. J., PAZ, J. C., ROJO, M., PALACIN, M., VIDAL-PUIG, A., and ZORZANO, A. Mitochondrial fusion is increased by the nuclear coactivator PGC-1beta. **PLoS One**, v. 3, p. e3613, 2008.
- LIESA, M., PALACIN, M., ZORZANO, A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. **Physiol Rev**, v. 89, p. 799–845, 2009.
- LIU, J., et al. Targeting mitochondrial biogenesis for preventing and treating insulin resistance in diabetes and obesity: Hope from natural mitochondrial nutrients. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 30, n. 61, p. 1343-52, 2009.
- LOTZ, C., et al. Characterization, design, and function of the mitochondrial proteome: from organs to organisms. **J Proteome Res**, v. 13, p. 433–446, 2014.
- LUCAS, A. Programming not metabolic imprinting. **Am J Clin Nutr**, v.71, n.2, p. 602, 2000.
- LUO, Z. C. et al. Tracing the origins of “fetal origins” of adult diseases: programming by oxidative stress? **Medical Hypotheses**, vol. 66, p. 38–44, 2006.
- MANDL, J. et al. Endoplasmic reticulum: nutrient sensor in physiology and pathology. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 20, p. 194–201, 2009.
- MANSOUR, T. E. Studies on heart phosphofructokinase. Active and inactive forms of the enzyme. **J Biol Chem**. V. 240, p. 2165-72, 1965.
- MATTEONI, C. A., et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. **Gastroenterology**, v. 116, p. 1413-1419, 1999.
- MEHROTRA, S., KAKKAR, P., VISWANATHAN, P. N. Mitochondrial damage by active oxygen species in vitro. **Free Radic Biol Med**, v. 10, n. 5, p. 277-85, 1991.
- MEHTA, K., et a. **Nutrition Reviews**, v. 60, p. 289-293, 2002.
- MERILÄ, J. Evolutionary biology: Perplexing effects of phenotypic plasticity. *Nature*. v. 17, n. 525, p. 326-7, 2015.
- MERRYFIELD, M. L., LARDY, H. A. Ca²⁺-mediated activation of phosphoenolpyruvate carboxykinase occurs via release of Fe²⁺ from rat liver mitochondria. **J Biol Chem**, v. 257, n. 7, p. 3628-35, 1982.
- MERTENS, J. J., et al. Reactive oxygen species and DNA damage in 2-bromo-(glutathion-S-yl) hydroquinone-mediated cytotoxicity. **Arch Biochem Biophys**, v. 320, n. 1, p. 51-8, 1995.

- MEYER, A. J., HELL, R. Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. **Photosynth Res**, v. 86, n. 3, p. 435-57, 2005.
- MEZEY, E. Liver disease and protein needs. **Ann. Rev. Nutr**, v. 2, p. 21-50, 1982.
- MISRA, H. P., FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 25, n. 247, p. 3170-5, 1972.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature**, v. 191, p. 144-8, 1961.
- MOLLER, S., HENRIKSEN, J. Cardiovascular complications of cirrhosis. **Gut**, v. 57, p. 268-278, 2008.
- MORAES, C., et al. Effect of maternal protein restriction on liver metabolism in rat offspring. **J Physiol Sci**, v. 64, n. 5, p. 347-55, 2014.
- MORENO S. N., SILVA, J., VERCESI, A. E., DOCAMPO, R. Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. **J Exp Med**, v. 180, n. 4, p. 1535-40, 1994.
- MOTA, M. P., FIGUEIREDO, P., DUARTE, JÁ. Teorias biológicas do envelhecimento. **Rev Port Ciênc Desp**, v. 4, n. 1, p. 81-110, 2004.
- MOWAT, A. P. Liver disorders in childhood. 3rd ed. Oxford: Butterworth Heinemann, 1994.
- MULLINS, C. The biogenesis of cellular organelles. Kluwer Academic / Plenum Publishers: New York, 2005.
- MURPHY, A. N., et al. Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. **Proc Natl Acad Sci**, v. 3, n. 93, p. 9893-8, 1996.
- MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem. J**, v. 417, p. 1-13, 2009.
- MUSACCO-SEBIO, R., et al. Rat liver antioxidant response to iron and copper overloads. **J Inorg Biochem**, v. 137, p. 94-100, 2014.
- NASCIMENTO, L., et al. The effect of maternal low-protein diet on the heart of adult-offspring: Role of mitochondria and oxidative stress. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism (Print)**, v.10, p.140220143615002-1139, 2014.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- NICHOLLS, D. G. e FERGUSON, S. J. Bioenergetics 3. Academic Press. An Elsevier Science Imprint, 2002.
- NICHOLLS, D., AKERMAN, K. Mitochondrial calcium transport. **Biochim Biophys Acta**. v. 1 n. 683, p. 57-88, 1982.

- NICOTERA, P., BELLOMO, G., ORRENIUS, S. Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 32, p. 449-70, 1992.
- OLIVEIRA, C.P.M.S., et al. Liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of experimental non alcoholic fatty liver disease. **Braz J Med Biol Res**, vol. 39, n. 2, p.189-194, 2006.
- ONYANGO, I. G, et al. Regulation of neuron mitochondrial biogenesis and relevance to brain health. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease**, v. 1802, p. 228-234, 2010.
- OPIE, L. H., NEWSHOLME, E. A. The activities of fructose 1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in white muscle and red muscle. **Biochem J**. v. 103, n. 2, p. 391-9, 1967.
- OROZCO-SÓLIS, R., et al.. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. **Physiol Behav**, v. 96, n. 3, p. 481-92, 2009.
- OWEN, O. E., et al. Protein, fat, and carbohydrate requirements during starvation: anaplerosis and cataplerosis. **Am. J. Clin. Nutr**, v. 68, p. 12–34, 1998.
- OZANNE, S. E., et al: Decreased protein levels of key insulin signalling molecules in adipose tissue from young men with a low birthweight: potential link to increased risk of diabetes? **Diabetologia**, v. 49, p. 2993-2999, 2006.
- OZANNE, S. E., et al. Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin- signalling protein expression. **Diabetologia**, v. 48, p. 547-552, 2005.
- PAGLIA, D. E., VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J Lab & Clin. Med**, v.70, p.158-169, 1967.
- PAGLIARINI, D. J., et al. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. **Cell**, v. 134, p. 112–123, 2008.
- PICH, S., et al. The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. **Hum. Mol. Genet**, v. 14, p. 1405–1415, 2005.
- PIGLIUCCI, M., MURREN, C. J., SCHLICHTING, C. D. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. **J Exp Biol.**; v. 209, n. 12, p. 2362-7, 2006.
- PRUIS, M. G. et al. Lipotoxicity and the role of maternal nutrition. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 210, n. 2, p. 296-306, Feb 2014.
- PRUIS, M. G. M., EWIJK, P. A. VAN, SCHRAUWEN-HINDERLING, V. B., PLÖSCH, T. (PRUIS *et al.*, 2014). **Acta Physiol**, 10.1111, 2013.
- PUIGSERVER, P. et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell**, v. 92, p. 829–839, 1998.

QASEM, R. J., et al. Decreased liver triglyceride content in adult rats exposed to protein restriction during gestation and lactation: role of hepatic triglyceride utilization. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 42, n. 4, p.380-82, 2015.

RAMBOLD, A. S., KOSTELECKY, B., ELIA, N., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 108, p. 10190–10195, 2011.

RANDLE, P. J., et al. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet I**, v. 13, p. 785-9, 1963.

RAVELLI G. P., STEIN Z. A., SUSSER M. W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **N Engl J Med**; v. 295, n. 7, p. 349-53, 1976.

REED, D. J. Review of the current status of calcium and thiols in cellular injury. **Chem Res Toxicol**, v. 3, n. 6, p. 495-502, 1990.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **J Nutr**. v. 127, n. 5, p. 838S-841S, 1997.

REEVES, P. G., NIELSEN, F. H., FAHEY, G. C. JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**. v. 123, n. 11, p. 1939-51, 1993.

REYNOLDS, C. M., et al. Early Life Nutrition and Energy Balance Disorders in Offspring in Later Life. **Nutrients**, v. 7, n. 9, p. 8090-111, 2015.

RISNES, K. R., et al. Birthweight and mortality in adulthood: a systematic review and meta-analysis. **Int J Epidemiol**, v. 40, n. 3, p. 647-61, 2011.

ROBINSON, J.; COOPER, J. M. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. **Anal Biochem**, v. 33, p. 390-399, 1970.

RTVELADZE, K., et al. Health and economic burden of obesity in Brazil. **PLoS ONE**, v. 8, e68785, 2013.

RUSSELL, L. K. et al. Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. **Circ. Res**, v. 94, p. 525–533, 2004.

SARAIVA, K. L., et al. International journal of experimental pathology 90, 454-462, 2009. Chronic treatment with sildenafil stimulates Leydig cell and testosterone secretion. **Int J Exp Pathol**. v. 90, n. 4), p. 54-62, 2009.

SASAKI, A., NAKAGAWA, I., KAJIMOTO, M. Effect of protein nutrition throughout gestation and lactation on growth, morbidity and life span of rat progeny. **J. Nutr.Sci. Vitaminol**, p. 543–555, 1982.

- SATOH, J., KAWANA, N., YAMAMOTO, Y. Pathway analysis of ChIP-seq-based NRF1 target genes suggests a logical hypothesis of their involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Gene Regul Syst Bio**, v. 7, p. 139–152, 2013.
- SCARPULLA, R. C, VEGA, R. B., KELLY, D. P. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. **Trends Endocrinol Metab**, v. 23, p. 459–466, 2012.
- SCARPULLA, R. C. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1813, p. 1269-1278, 2011.
- SCHEFFLER, I. E. Mitochondria make a come back. **Adv Drug Deliv Rev**, 49(1-2):3-26, 2001.
- SCHNEIDER, W. C., HOGEBOOM, G. H. Cytochemical studies of mammalian tissues; the isolation of cell components by differential centrifugation: a review. **Cancer Res**, v. 11, p. 1-22, 1951.
- SCHREPFER, E. and SCORRANO, L. Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism. **Molecular Cell**, v. 61, 2016.
- SILVEIRA, L. R. et al. The contraction induced increase in gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha), mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) and hexokinase II (HKII) in primary rat skeletal muscle cells is dependent on reactive oxygen species. **Biochemistry et Biophysica Acta**, v. 1763, n. 9, p. 969-976, 2006.
- SILVEIRA, L. R., et al. Regulation of glucose and fatty acid metabolism in skeletal muscle during contraction. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 55, n. 5, p. 303-13, 2001.
- SKULACHEV, V. P. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. **FEBS Lett**, v. 294, n. 3, p. 158-62, 1991.
- SKULACHEV, V. P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1363, p. 100–124, 1998.
- SOOKOLA, S. and PIROLA, C. Nonalcoholic fatty liver disease is strongly associated with carotid atherosclerosis: a systemic review. **J Hepatol**, v. 49: p. 600-607, 2008.
- SORIANO, F. X., et al. Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha, estrogen-related receptor-alpha, and mitofusin 2. **Diabetes**, v. 55, p. 1783–1791, 2006.
- STARKOV, A. A., FISKUM, G. Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state. **J. Neurochem**, v. 86; p. 1101–1107, 2003.
- TANG, B. L. Sirt1 and the Mitochondria. **Mol Cells**, v. 29, n. 39, p. 87-95, 2016.

TARRY-ADKINS, J. L., et al. Coenzyme Q10 prevents hepatic fibrosis, inflammation, and oxidative stress in a male rat model of poor maternal nutrition and accelerated postnatal growth. **Am J Clin Nutr**, v. 103, n. 2, p. 579-88, 2016.

THEUREY, P e RIEUSSET, J. Mitochondria-Associated Membranes Response to Nutrient Availability and Role in Metabolic Diseases. **Trends Endocrinol. Metab.** pii: S1043-2760, n. 16, p. 30113-8,2016.

TOCCHETTI, C. G., et al. Playing with cardiac “redox switches”: the “HNO way” to modulate cardiac function. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, p. 1687–1698, 2011.

TOWBIN H., STAEHELIN T, GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Biotechnology**, v. 24, p. 145-9, 1992.

TRINDADE, C. E. P.; NÓBREGA, F. J. de & TONETE, S. S. Q. Repercussões metabólicas da desnutrição protéico-calórica. In: Desnutrição: intra-uterina e pós-natal. (Ed.). **Panamed Editorial**, 1986.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol**, v. 552.2, pp. 335–344, 2003.

TURRENS, J. F., ALEXANDRE, A., LEHNINGER, A. L. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 237, p. 408–414, 1985.

TWIG, G., ELORZA, A., MOLINA, A. J., MOHAMED, H., WIKSTROM, J. D., WALZER, G., STILES, L., HAIGH, S. E., KATZ, S., LAS, G., et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. **Embo J**, v. 27, p. 433–446, 2008.

UNICEF, WHO, World Bank Group. Levels and trends in child malnutrition. Joint child malnutrition estimates, 2015.

VAAG, A. A., et al. The thrifty phenotype hypothesis revisited. **Diabetologia** v. 55, p. 2085–2088, 2012.

VAAG, A., et al: Metabolic aspects of insulin resistance in individuals born small for gestational age. **Horm Res**, v. 65, n. 3, p. 137-143, 2006.

VAARTJES, W. J., VAN DEN BERGH, S. G. The oxidation of long-chain unsaturated fatty acids by isolated rat liver mitochondria as a function of substrate concentration. **Biochim Biophys Acta**, v. 503, p. 437–449, 1978.

VEGA, C. C., et al. Resveratrol partially prevents oxidative stress and metabolic dysfunction in pregnant rats fed a low protein diet and their offspring. **J Physiol**, v. 594, n. 5, p. 1483-99, 2016.

VERCESI, A. E., et al. Regulation of intracellular calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi*. Effects of calmidazolium and trifluoperazine. **Cell Calcium**, v. 12, n. 5, p. 361-9, 1991.

VERCESI, A. E. Ca^{2+} transport and oxidative damage of mitochondria. **Braz J Med Biol Res**, v. 26, n. 5, p. 441-57, 1993A.

VERCESI, A. E., HOFFMANN, M. E. Generation of reactive oxygen metabolites and oxidative damage in mitochondria: the role of calcium. *Methods in Toxicology "Mitochondrial Dysfunction"*. In: Jones, D. P., Lash, L. H., editors. New York: **Academic Press**; 2, chapter 21, 1993.

VERCESI, A. E., et al. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. **Biosci Rep**, v.17, n. 1, p. 43-52, 1997.

VERCESI, A.E., et al. Ca^{2+} -dependent NAD(P)⁺-induced alterations of rat liver and hepatoma mitochondrial membrane permeability. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 154, n. 3, p. 934-41, 1988.

Web site: https://en.wikipedia.org/wiki/Inner_mitochondrial_membrane. Acessado em 16 de abril de 2016 às 13:44h.

WELL, J. C. The Thrifty Phenotype Hypothesis: Thrifty Offspring or Thrifty Mother? **J Theor Biol**, 7; v. 221, n. 1, p. 143-61, 2003.

WELLS, J. C. K., DAVIES, P. S. W. Estimation of the energy cost of physical activity in infancy. **Arch. Dis. Child**, v. 78, p. 131–136, 1998.

WESTERMANN, B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1817, p.1833–1838, 2012.

WHO. Global nutrition targets 2025: low birth weight policy brief (WHO/NMH/NHD/14.5). Geneva: **World Health Organization**, 2014.

WHO. World Health Statistic 2015. **World Health Organization**, 2015.

WILLCOX, J. K., ASH, S. L. AND CATIGNANI, G. L. Antioxidants and prevention of chronic disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.44, n.4, p.275–295, 2004.

WOODFIELD, K., et al. Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. **Biochem J**, v. 336, n. 2), p. 287-90, 1998.

World - Addressing Food Insecurity in Protracted Crises; **FAO**: Rome, Italy, 2010.

YOON, H. J., CHA, B. S. Pathogenesis and therapeutic approaches for non-alcoholic fatty liver disease. **World Journal of Hepatology**, v. 6, n. 11, p. 800–811, 2014.

ZANATTA A., MOURA A.P., TONIN A.M. ET AL. Neurochemical evidence that the metabolites accumulating in 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency induce oxidative damage in cerebral cortex of young rats. **Cell Mol Neurobiol**, v. 33, p.137-146, 2013.

ZHU, W. F., et al. Maternal undernutrition leads to elevated hepatic triglycerides in male rat offspring due to increased expression of lipoprotein lipase. **Mol Med Rep**, 2016.

ZORATTI, M., SZABO, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochim Biophys Acta**, v. 1241, n. 2, p. 139-76, 1995.

ZORZANO, A., HERNÁNDEZ-ALVAREZ, M. I., SEBASTIÁN, D., MUÑOZ, J. P. Mitofusin 2 as a driver that controls energy metabolism and insulin signaling. **Antioxid Redox Signal**, v. 20; n. 22(12), 2015.

APÊNDICE 2 – Artigo publicado em colaboração.

Brain Research 1642 (2016) 553–561



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/brainres



Research report

Mitochondrial bioenergetics and oxidative status disruption in brainstem of weaned rats: Immediate response to maternal protein restriction



Diorginis José Soares Ferreira^{a,b}, Anderson Apolônio da Silva Pedroza^b, Glauber Ruda Feitoza Braz^b, Reginaldo Correia da Silva-Filho^b, Talitta Arruda Lima^b, Mariana Pinheiro Fernandes^b, Sonia Q. Doi^c, Claudia Jacques Lagranha^{a,b,*}

^a Neuropsychiatry and Behavioral Science Graduate Program, Federal University of Pernambuco, 50670–901, Brazil

^b Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry, Department of Physical Education and Sports Science, Federal University of Pernambuco–CAV, Vitória de Santo Antão 55608–680, Brazil

^c Department of Medicine, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, MD 20814, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2015

Received in revised form

31 March 2016

Accepted 21 April 2016

Available online 22 April 2016

Keywords:

Mitochondria

Oxidative stress

Brainstem

Undernutrition

Rats

ABSTRACT

Mitochondrial bioenergetics dysfunction has been postulated as an important mechanism associated to a number of cardiovascular diseases in adulthood. One of the hypotheses is that this is caused by the metabolic challenge generated by the mismatch between prenatal predicted and postnatal reality. Perinatal low-protein diet produces several effects that are manifested in the adult animal, including altered sympathetic tone, increased arterial blood pressure and oxidative stress in the brainstem. The majority of the studies related to nutritional programming postulates that the increased risk levels for non-communicable diseases are associated with the incompatibility between prenatal and postnatal environment. However, little is known about the immediate effects of maternal protein restriction on the offspring's brainstem. The present study aimed to test the hypothesis that a maternal low-protein diet causes tissue damage immediately after exposure to the nutritional insult that can be assessed in the brainstem of weaned offspring. In this regard, a series of assays was conducted to measure the mitochondrial bioenergetics and oxidative stress biomarkers in the brainstem, which is the brain structure responsible for the autonomic cardiovascular control. Pregnant *Wistar* rats were fed *ad libitum* with normoprotein (NP; 17% casein) or low-protein (LP; 8% casein) diet throughout pregnancy and lactation periods. At weaning, the male offspring were euthanized and the brainstem was quickly removed to assess the mitochondria function, reactive oxygen species (ROS) production, mitochondrial membrane electric potential ($\Delta\Psi_m$), oxidative biomarkers, antioxidant defense and redox status. Our data demonstrated that perinatal LP diet induces an immediate mitochondrial dysfunction. Furthermore, the protein restriction induced a marked increase in ROS production, with a decrease in antioxidant defense and redox status. Altogether, our findings suggest that LP-fed animals may be at a higher risk for oxidative metabolism impairment throughout life than NP-fed rats, due to the immediate disruption of the mitochondrial bioenergetics and oxidative status caused by the LP diet.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: EDTA, ethylene diamine tetra acetic acid; G6PDH, glucose-6 phosphate dehydrogenase; GSSG, oxidized glutathione; GPx, glutathione peroxidase; GSH, reduced glutathione; GST, glutathione-S-transferase; LP, low-protein; NAD(P)H, nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) reduced; NP, normo-protein; RVLm, rostral ventrolateral medulla; SOD, superoxide dismutase; TRIS, tris (hydroxymethyl) aminomethane; TCA, trichloroacetic acid

* Corresponding author at: Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte, Rua Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, CEP: 55608–680 Vitória de Santo Antão, PE, Brazil.

E-mail address: lagranha@hotmail.com (C.J. Lagranha).

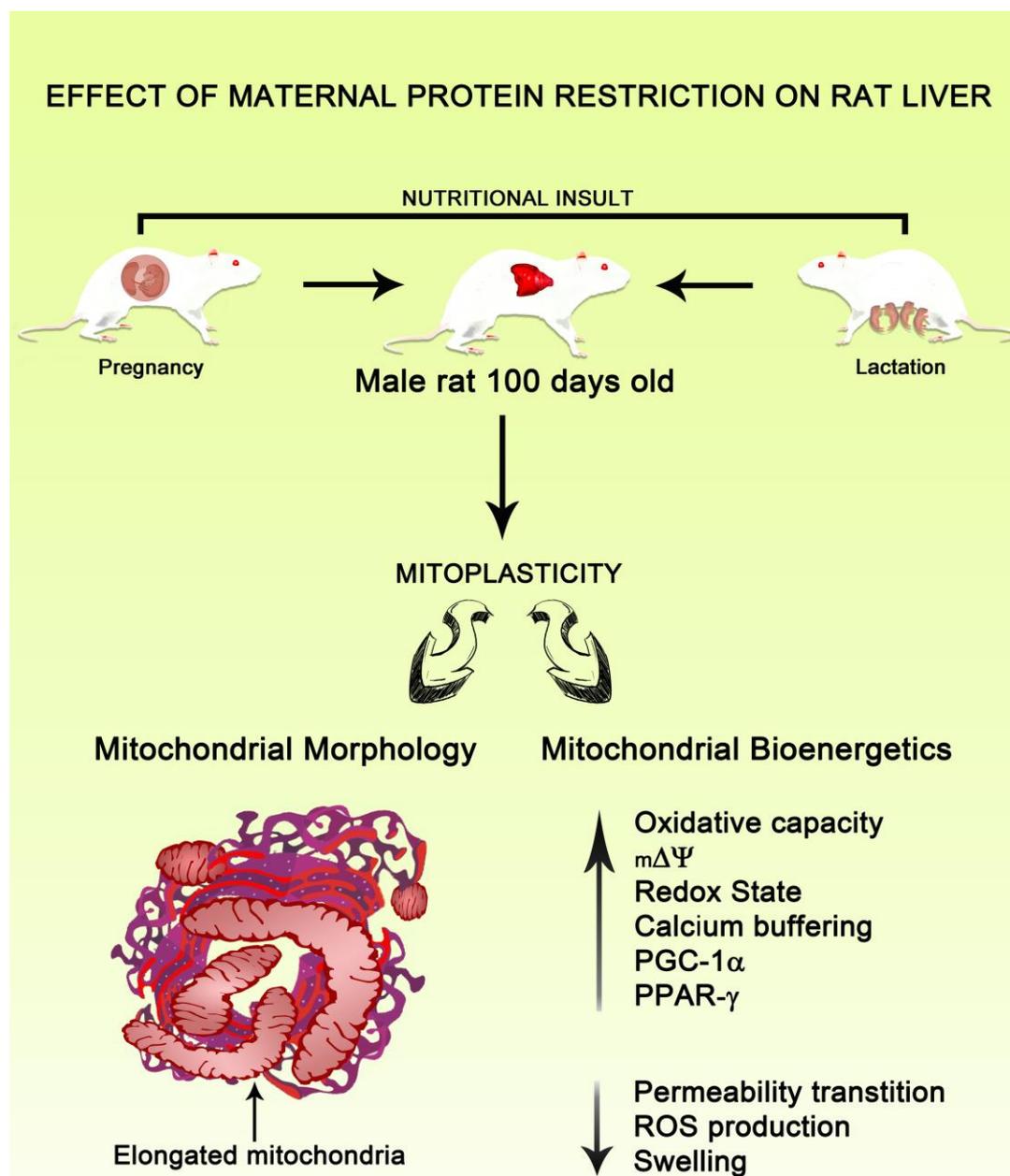
<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.049>

0006-8993/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

It is well known that mitochondria play several functions in eukaryotic cells. Considered as the major energy producer, by means of ATP formation, mitochondria are also the main source of reactive oxygen species (ROS) (Halliwell and Gutteridge, 2007). In physiologic conditions, mitochondrial ROS production is a tightly adjusted mechanism required for a plethora of cellular processes (e.g., cell signaling, gene expression, cellular growth and apoptosis) (Fukai and Ushio-Fukai, 2011). Since mitochondrion also has a high antioxidant capacity (Figueira et al., 2013), its dysfunction can

APÊNDICE 3 – Esquema proposto para ilustrar o mecanismo envolvido na plasticidade do fígado de ratos machos adultos submetidos à restrição proteica perinatal.



Scheme to show the mechanisms involved in the liver plasticity of adult rat submitted to perinatal protein restriction. Mitochondria suffer plasticity and become more elongated (fused), ensuring the maintenance of the electrical potential of membrane and optimization of oxidative capacity. Genes such as PGC-1 α and PPAR- γ and OPA1 are more expressed and a high β -HAD activity suggests great oxidation by lipid metabolism. These mitochondria are resistant to calcium, produce fewer ROS, maintain the membrane integrity, and improve the liver redox balance.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Ciências Biológicas
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: (55 81) 2126 0340 | 2126 8331
 Fax: (55 81) 2126 0350
 www.ccb.ufpe.br



Recife, 01 de março de 2011.

Ofício nº 362/11

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: **Mariana Pinheiro Fernandes**
 Departamento: Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte de Vitória de Santo Antão
 CAV-UFPE
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 23076.044262/2010-88

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado: "Efeito da Desnutrição Perinatal no Metabolismo Bioenergético de Mitocôndrias Hepáticas."

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos parecer favorável aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

Maria Teresa Jansen


 Presidente da CEEA

Observação: Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição; Número de animais previsto no protocolo: 16 ratas lactantes e 32 filhotes no total; Espécie: Ratos; Linhagem: Wistar; Sexo: machos e fêmeas; Idade: ratas adultas com 55 dias e seus filhotes.

CCB: Integrar para desenvolver