



Universidade Federal de Pernambuco – UFPE
Centro Acadêmico de Vitória – CAV
**Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade
Fenotípica – PPGNAFPF**

TALITTA RICARLLY LOPES DE ARRUDA LIMA

**Efeitos do treinamento físico moderado na bioenergética mitocondrial e
atividade de enzimas metabólicas de fígado de ratos juvenis submetidos a
restrição proteica perinatal**

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**

TALITTA RICARLLY LOPES DE ARRUDA LIMA

**Efeitos do treinamento físico moderado na bioenergética mitocondrial e
atividade de enzimas metabólicas de fígado de ratos juvenis submetidos a
restrição proteica perinatal**

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 Mecanismos biológicos da plasticidade fenotípica, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Mariana Pinheiro Fernandes

Coorientadora: Cláudia Jacques Lagranha

Vitória de Santo Antão

2017

Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB-4/2018

- L732e Lima, Talitta Ricarlly Lopes de Arruda.
Efeitos do treinamento físico moderado na bioenergética mitocondrial e atividade de enzimas metabólicas de fígado de ratos juvenis submetidos a restrição proteica perinatal / Talitta Ricarlly Lopes de Arruda Lima. - Vitória de Santo Antão, 2017.
101 folhas: il.; color.
- Orientadora: Mariana Pinheiro Fernandes.
Coorientadora: Cláudia Jacques Lagranha.
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. Bioenergética mitocondrial. 2. Fisiologia do Exercício - ratos. 3. Dieta hipoproteica - ratos. I. Fernandes, Mariana Pinheiro (Orientadora). II. Lagranha, Cláudia Jacques (Coorientadora). III. Título.

612.044 CDD (23.ed)

BIBCAV/UFPE-024/2018

TALITTA RICARLLY LOPES DE ARRUDA LIMA

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO NA BIOENERGÉTICA
MITOCONDRIAL E ATIVIDADE DE ENZIMAS METABÓLICAS DE FÍGADO DE
RATOS JUVENIS SUBMETIDOS A RESTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL**

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 Mecanismos biológicos da plasticidade fenotípica, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovado em: 21 / 02 / 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Mariana Fernandes Pinheiro (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Eduardo Carvalho Lira (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. José Antônio dos Santos (Examinador Externo)
Universidade Estadual de Campinas

Prof^o. Dr. Claudia Jacques Lagranha (Examinador Externo)
Universidade Estadual de Campinas

Dedico este trabalho aos meus pais e meu
irmão, pela paciência, por todo incentivo,
apoio e por sempre acreditar em mim. Sem
vocês jamais estaria onde estou.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que iluminou o meu caminho durante todos esses anos.

À minha família: minha mãe, Maria Inês pela vida, por acreditar sempre em mim, pela amizade, pelo companheirismo, pela paciência e incentivo em momentos difíceis que passamos durante esse tempo, ao meu pai José Ricardo pelo apoio de sempre, pela paciência, pelos ensinamentos sobre a vida, por estar sempre disponível. São meus exemplos, minha base, minha Fortaleza. Ao meu irmão Thalison, que é um companheiro, amigo e sempre esteve ao meu lado, que me aguentou todos esses anos. Vocês são minha vida, é por vocês que sempre vou buscar algo melhor, vou buscar me superar a cada dia, mostrar que o que aprendi com cada um estou levando sempre comigo, o que sinto por vocês não tem explicação. Obrigada. Amo vocês.

Mariana Fernandes, minha orientadora que é meu exemplo de profissional e pessoa, agradeço imensamente por toda paciência, esforço, generosidade e confiança. Pela oportunidade, durante todo o período de elaboração desse projeto. Que Deus lhe abençoe sempre. Muito obrigada por tudo.

Claudia Lagranha, a melhor co-orientadora que eu poderia ter, agradeço por estar sempre disposta a ajudar, pela paciência de sempre, pela amizade e por todo conhecimento passado. A admiro pela forma que trata a ciência.

Agradeço aos meus amigos, que durante esses anos de experimento, sempre me ajudaram e estiveram comigo durante dias e noites exaustivas de experimento, sem vocês eu não teria conseguido, e essa trajetória teria sido muito árdua. À Cristiane Freitas, Reginaldo Correia, Rudá Feitoza, meu muito obrigado. Contem comigo para qualquer coisa! Que vocês sejam agraciados pelo senhor Deus, nos caminhos majestosos que tenho certeza que irão seguir.

Agradeço ao meus colegas de laboratório, que fizeram, e/ou que agora fazem parte do Laboratório de Bioquímica e Bioquímica Geral, Molecular e do Exercício (Aline Isabel, Alessandra Barbosa, Cristiane Freitas, Luciana Nascimento, Reginaldo Correia, Gisele Santiago, Yuri Uei, Priscilla Rosa, Anderson Pedroza, Vitória Interaminense, Diorginis Ferreira, David Filipe, Ramon Nascimento, Aiany Simões, Máisa Menezes, Cássia Andrade, Erica Lima, Rudá Feitoza, Diego Araújo, Tercya

Araújo, Roger dos Santos, Shirley Sousa, Alex Emiliano), que me ajudaram direta ou indiretamente em meus experimentos. Agradeço pelos momentos divertidos, pelos momentos de concentração no laboratório, pela amizade que construímos, sendo esta que ultrapassa os limites do laboratório. E também pelos dias tristes, pelos dias de bronca, que nos fizeram aprender muito e crescer como seres humanos e profissionais. Tenho muito orgulho de fazer parte dessa equipe, aprendi e ainda vou aprender muito mais com todos vocês. Levarei um pouco de cada um sempre comigo. Desejo o melhor a todos, e a vocês meu eterno carinho e agradecimento.

Agradeço a Gerffeson Martins, por todo amor, carinho, amizade, companheirismo, cuidado e paciência. E mesmo diante de todo estresse, sempre está disposto a ajudar e sempre traz consigo uma palavra de conforto aos dias mais difíceis. À sua família (Genivaldo, Lúcia e Geniffer) pela força e torcida.

E por fim, não poderia esquecer da minha turma do Programa de Pós Graduação em Nutrição, Atividade Física, e Plasticidade Fenotípica. À Gabriela Goes, Mayara Guimarães, Débora Alves, Sávio dos Santos, Reginaldo Correia, Aiany Simões, muito obrigada por terem feito parte desse momento da minha vida. Que seus caminhos sejam sempre abençoados por Deus. Sucesso a todos!

Agradeço a todos que de forma direta ou indiretamente me ajudaram a conquistar esse sonho, e chegar onde cheguei hoje. Que Deus os abençoe sempre. “Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível” (Charles Chaplin).

RESUMO

A restrição proteica durante períodos críticos de desenvolvimento pode estar associada à sérias consequências sobre a funcionalidade de diferentes órgãos e sistemas. O fígado é um importante órgão no metabolismo de macromoléculas, além de atuar como sensor inicial de nutrientes. Pouco se sabe sobre os efeitos do treinamento físico moderado em modelos de restrição proteica perinatal no metabolismo hepático. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do treinamento físico moderado sobre a bioenergética mitocondrial e o metabolismo hepático de ratos jovens submetidos à restrição proteica durante períodos críticos de desenvolvimento. Ratas *Wistar* grávidas receberam dieta: com níveis normais de proteína (N, proteína 17%) e com baixo teor de proteína (L, proteína 8%) durante a gravidez e a lactação. Após o desmame, todos os grupos receberam dieta comercial até o sacrifício, ao 60º dia. A prole foi submetida ao teste de execução aeróbia incremental no 26º, 27º e 28º dias e subdividida em quatro grupos de acordo com a prática ou não do treinamento físico. Foram obtidos os seguintes grupos experimentais: Normo proteico Sedentário (NS); Normo proteico Treinado (NT); Baixa proteína Sedentário (LS); Baixa proteína Treinado (LT). Aos 30 dias de vida, os animais dos grupos NT e LT foram submetidos a um programa de treinamento físico (60 min/dia, 5 dias/semana durante 4 semanas). Aos 60 dias pós-nascimento, os machos foram eutanizados e o fígado removido. Foram avaliadas peso corporal e hepático, níveis de albumina sérica, atividade de enzimas metabólicas (fosfofrutoquinase 1 (PFK), glicose-6- fosfato desidrogenase (G6PDH) β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (B-HAD), citrato sintase (CS), consumo de oxigênio mitocondrial, inchamento mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), biomarcadores de estresse oxidativo (malondialdeído-MDA, níveis de carbonilas e sulfidrilas-SH), atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase -SOD, catalase -CAT, glutational peroxidase-GPx e glutational transferase -GST) e o estado redox celular (glutational-GSH reduzida, glutational-GSSG oxidada e razão GSH / GSSG). Nossos resultados mostraram uma redução nos pesos dos animais (15%, $p < 0,05$) e do fígado (22%, $p < 0,05$) no grupo LS quando comparados ao grupo NS. Os níveis de albumina não foram significativos entre os grupos. Observou-se diminuição da atividade da CS (28%, $p < 0,05$), nenhuma alteração na atividade da PFK1, diminuição na atividade da G6PDH (54%, $p < 0,001$) e aumento na atividade da β -HAD (211%, $p < 0,0001$) no grupo LS comparado ao grupo NS. Em relação à bioenergética mitocondrial observou-se no grupo LS diminuição do consumo de oxigênio mitocondrial após adição de ADP (Estado 3, 53%, $p < 0,01$) e do controle respiratório (RCR, 52%, $p < 0,0001$), aumento do inchamento mitocondrial (40 %, $p < 0,001$) e produção de ROS (36%, $p < 0,01$). Foi verificado um aumento na peroxidação lipídica (níveis de MDA 42%, $p < 0,0001$), oxidação de proteínas (81%, $p < 0,0001$) e diminuição do teor de SH (41%, $p < 0,01$) no grupo LS quando comparado ao grupo NS. As atividades das enzimas antioxidantes, SOD (33%, $p < 0,0001$), CAT (48%, $p < 0,0001$), GPx (49%, $p < 0,001$) e GST (64%, $p < 0,01$) foram diminuídas no grupo LS sem alteração nos níveis de GSH. Após o treinamento físico moderado, observou-se melhora significativa ou reversão dos efeitos deletérios da restrição proteica perinatal no metabolismo hepático no grupo LT. Nossos resultados sugerem que o exercício físico atuou como um agente terapêutico não-farmacológico capaz de minimizar os efeitos de uma restrição proteica no início da vida desses animais.

Palavras chave: Bioenergética mitocondrial. Exercício. Dieta hipoproteica. Fígado.

ABSTRACT

Protein restriction during critical periods of development may be associated with serious consequences on the functionality of different organs and systems. The liver is an important organ on the metabolism of macromolecules, besides acting as initial sensor of nutrients. Little is known about the effects of moderate physical training on models of perinatal protein restriction in the hepatic metabolism. Therefore, the study aims to evaluate the effects of the moderate physical training on the mitochondrial bioenergetics and hepatic metabolism of young rats submitted to protein restriction during critical periods of development. Pregnant Wistar rats received diet: Normoprotein (N, protein 17%) and Lowprotein (L, protein 8%) throughout gestation and lactation. After weaning, all groups received commercial chow until sacrifice at the 60th day. The offspring was submitted to the incremental aerobic run test from the 26th, 27th and 28th days and subdivided into four groups according to the practice or not the physical training. The following experimental groups were obtained: Normoprotein Sedentary (NS), casein 17%; Normoprotein Trained (NT), casein 17%; Lowprotein Sedentary (LS), casein 8%; Lowprotein Trained (LT), 8% casein. At 30 days of life, the animals of NT and LT groups underwent a physical training program (60 min day/ 5 days and 4 weeks). At 60 days post-birth, the male were euthanized and the liver removed. It were evaluated body and liver weights, serum albumin levels, metabolic enzymes activities (citrate synthase (CS), fosfofrutoquinase 1 (PFK), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (β -HAD)), mitochondrial oxygen consumption, mitochondrial swelling, reactive oxygen species (ROS) production, oxidative stress biomarkers (malondialdehyde-MDA, carbonyls, sulfhydryl-SH contents), antioxidant enzymes activities (superoxide dismutase-SOD, catalase-CAT, glutathione peroxidase-GPx and glutathione transferase-GST) and cellular redox state (reduced glutathione-GSH, oxidized glutathione-GSSG and GSH/GSSG ratio). Our results showed a reduction in both, animal (15%, $p<0.05$) and liver (22%, $p<0.05$) weights in LS group when compared to NS group. Albumin levels were no significant between groups. It was found decrease in CS activity (28%, $p<0.05$), no change of PFK1, decrease in G6PDH activity (54%, $p<0.001$) and increase in β -HAD activity (211%, $p<0.0001$) in LS group compared to NS group. In relation to mitochondrial bioenergetics was observed in LS group a decrease in mitochondrial oxygen consumption after ADP addition (State 3, 53%, $p<0.01$) and respiratory control ratio (RCR, 52%, $p<0.0001$), increase in mitochondrial swelling (40%, $p<0.001$) and ROS production (36%, $p<0.01$). It was verified an increase in lipid peroxidation (MDA-levels, 42%, $p<0.0001$), protein oxidation (81%, $p<0.0001$) and decrease in SH-content (41%, $p<0.01$) in LS group when compared to NS group. The antioxidant enzymes activities, SOD (33%, $p<0.0001$), CAT (48%, $p<0.0001$), GPx (49%, $p<0.001$) and GST (64%, $p<0.01$) were decreased in LS group without alteration in GSH levels. After the moderate physical training was observed a significant improvement or reversal of the deleterious effects of perinatal protein restriction on hepatic metabolism in LT group. Our results suggest that the physical exercise acted as a non-pharmacological therapeutic agent capable of minimizing the effects of a protein restriction in the early life of these animals.

Keywords: Mitochondrial bioenergetics. Exercise. Low protein diet. Liver.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro bovina
CAT	Catalase
Ca ²⁺	Ìon Cálcio
CCCP	Cianeto de carbonila m-clorofenil hidrazona
CsA	Ciclosporina A
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazine
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
DTNB	5,5'-dithiobis (2 nitrobenzoic acid)
EGTA	Etileno glico-bis(b-aminoetil éter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo reduzido
FC _{máx}	Frequência cardíaca máxima
G3P	Glicerol 3-fosfato desidrogenase
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona-S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio

H ₂ DCF-DA	Diacetato de diclorodihidrofluoresceína
HEPES	(Ácido N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanossulfónico])
LS	Baixo teor proteico Sedentário
LT	Baixo teor proteico Treinado
K ⁺	Potássio
MDA	Malondialdeído
MOPS	3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo no estado reduzido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato no estado reduzido
NS	Normo protéico Sedentário
NT	Normo protéico Treinado
nDNA	DNA nuclear
mM	Milimolar
mtDNA	DNA mitocondrial
O ₂ • ⁻	Ânion superóxido
PFK	Fosfofrutoquinase
pH	Potencial Hidrogeniônico
P _i	Fosfato inorgânico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PTP	Poros de transição de permeabilidade
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias Reativas ao ácido Tiobarbitúrico

TPM	Transição de permeabilidade mitocondrial
$\text{VO}_{2\text{máx}}$	Consumo máximo de oxigênio
$\Delta\psi$	Potencial elétrico
$\Delta\psi_{\text{m}}$	Potencial elétrico de membrana mitocondrial

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras da apresentação:

Figura 1 - Estrutura mitocondrial.....	22
Figura 2 - Complexos respiratórios mitocondriais.	23
Figura 3 - Cadeia transportadora de elétrons e produção mitocondrial de ATP.	24
Figura 4 - Sítios mitocondriais de produção de espécies reativas de oxigênio.	26
Figura 5 - Mecanismos de formação de espécies reativas e sistemas antioxidantes.	27
Figura 6 - Caminhos para captação de cálcio na mitocôndria	30
Figura 7 - Modelo hipotético para ilustrar a participação do cálcio no estresse oxidativo e processos de morte celular.	31
Figura 8 - Desenho Experimental.....	38
Figura 9- Inchamento mitocondrial.	42

Imagem da apresentação:

Imagem 1- Esteira ergométrica Inbramed, modelo KT-10100, utilizada para realização do treinamento dos animais.	39
--	----

Tabela da apresentação:

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais (g/100 g de dieta).....	37
Tabela 2- Protocolo de treinamento físico de acordo com a velocidade e duração das sessões durante as 4 semanas de treinamento.	39

Figuras do artigo:

Figure 1 - Citrate synthase activity in muscles.	76
Figure 2 - Metabolic enzymes activities.....	76
Figure 3 - Mitochondrial oxygen consumption.	78

Figure 4 - Mitochondrial swelling.	79
Figure 5 - Reactive oxygen species production.	79
Figure 6 - Oxidative stress biomarkers.	80
Figure 7 - Enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems.	81

Tabela complementar do artigo:

Table 1 - Body, liver weight evaluations and serum albumin, ALT and AST levels. ..	75
Table 2 - Physical training program according to the speed and duration of the sessions during 4 weeks of training.	82

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Insultos nutricionais e plasticidade durante o desenvolvimento	17
2. 2 Fígado: principais funções, plasticidade hepática e metabolismo	18
2.3 Restrição proteica e seus efeitos no fígado	20
2.4 Mitocôndria: estrutura, funções metabólicas e bioenergética mitocondrial	21
2.5 Espécies reativas de oxigênio, sistemas antioxidantes e estresse oxidativo	24
2.6 Transição de permeabilidade mitocondrial e associação com doenças crônicas	28
2.7 Treinamento físico e metabolismo oxidativo mitocondrial	31
3 HIPÓTESE	34
4 OBJETIVOS.....	35
4.1 Geral	35
4.2 Específicos	35
5 MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1 Animais e Dieta	36
5.2 Protocolo de treino	38
5.3 Coleta do tecido hepático para análises bioquímicas	39
5.4 Preparo do homogeneizado do tecido hepático para utilização nas técnicas bioquímicas	40
5.5 Isolamento das mitocôndrias hepáticas	40
5.6 Dosagem de proteína	40
5.7 Condições experimentais	40
5.8 Avaliação do inchamento mitocondrial (TPM)	41
5.9 Medida do consumo de oxigênio mitocondrial	42
5.10 Avaliação da produção de espécies reativas	43
5.11 Dosagem dos níveis séricos de Albumina.....	43

5.12 Dosagem sérica de aminotransferases: Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT)	43
5.13 Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica pela metodologia da substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico	43
5.14 Medida dos níveis de oxidação de proteínas (Carbonilas)	44
5.15 Avaliação do conteúdo de sulfidril-SH	44
5.16 Avaliação da atividade enzimática da Superóxido dismutase (SOD)	44
5.17 Avaliação da atividade enzimática da Catalase	45
5.18 Avaliação da atividade enzimática Glutational Peroxidase (GPx)	45
5.19 Avaliação da atividade enzimática da Glutational-S-Transferase	45
5.20 Quantificação do balanço redox (razão GSH/GSSG)	46
5.21 Determinação da atividade da fosfofrutoquinase 1 (PFK1)	46
5.22 Determinação da glicose-6-fosfato desidrogenase	47
5.23 Determinação da atividade da β-hidroxyacil-CoA desidrogenase (β-HAD)	47
5.24 Avaliação da atividade da citrato sintase	47
5.25 Análise estatística	48
6 RESULTADOS.....	49
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
REFERÊNCIAS.....	84
ANEXO A - Comitê de Ética no uso de animais da UFPE	99
ANEXO B - Artigo produzido em colaboração.....	100

1 INTRODUÇÃO

A desnutrição continua sendo um problema de saúde pública do século 21, que afeta principalmente a população de países subdesenvolvidos, onde a fome crônica significa o aporte alimentar insuficiente e vem sendo apontada como um dos principais fatores não genéticos implicados na etiologia de doenças crônico-degenerativas (FAO, 2015; WRITING GROUP *et al.*, 2016). O mecanismo subjacente ao desenvolvimento dessas afecções parece estar associado aos efeitos deletérios das deficiências nutricionais no período crítico do desenvolvimento (HALES, 1997; GLUCKMAN; HANSON; LOW, 2011). Evidências epidemiológicas têm demonstrado que a carência de nutrientes nesse período crítico eleva o risco de obesidade e doenças correlatas (hipertensão, diabetes tipo II, dislipidemias, hiperinsulinemia, doenças cardíacas, imunológicas e o câncer) na vida adulta (TAPPIA ; GABRIEL, 2006; BAROUKI *et al.*, 2012).

Estudos experimentais, com mitocôndrias isoladas de fígado, desenvolvidos no Centro Acadêmico de Vitória da UFPE têm demonstrado que ratos machos, aos 30 dias de vida, provenientes de ratas submetidas à dieta hipoprotéica (8 % de proteína) durante a gestação e lactação, apresentam uma diminuição significativa da velocidade de fosforilação mitocondrial (estado 3), acompanhado de uma redução do controle respiratório nesses animais desnutridos, com perda de potencial elétrico de membrana mitocondrial, aumento na produção de espécies reativas e menor capacidade de tamponamento do íon cálcio (Ca^{2+}) em comparação com o grupo controle (SILVA-FILHO, 2014). Esses resultados sugerem que essa disfunção mitocondrial observada em ratos jovens, em decorrência da desnutrição proteica perinatal, ocorra devido a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), uma vez que esses resultados foram completamente revertidos na presença de EGTA (quelante de cálcio) ou ciclosporina A (CsA) (um inibidor clássico do poro de transição de permeabilidade mitocondrial). O fenômeno de TPM está associado a diversas doenças crônico-degenerativas, tais como câncer, Parkinson, Alzheimer, diabetes tipo II (KOWALTOWSKI *et al.*, 2009).

Políticas públicas têm procurado incentivar a prática de atividade física, visto os benefícios que o exercício pode proporcionar ao organismo humano (WHO, 2010). Cada vez mais vem sendo atrelada a prática de atividades com a melhora da

aptidão muscular, cardiorrespiratória e óssea, reduzindo risco de hipertensão, diabetes, depressão, doenças coronárias, além do controle do peso corporal (WHO, 2016). A atividade física pode ser definida como um movimento corporal produzido pelos músculos esqueléticos que demanda um gasto energético a cima dos níveis basais (CASPERSEN; POWELL ; CHRISTENSON, 1985).

Considerando o fígado como órgão essencial no metabolismo dos carboidratos e lipídeos, e atuante como sensor inicial de nutrientes, estudos acerca dos efeitos do treinamento físico moderado em modelos de restrição proteica perinatal no metabolismo hepático são escassos e possibilitará uma melhor compreensão da base metabólica de doenças, relacionadas ao trinômio desnutrição/doenças crônico-degenerativas/exercício físico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Insultos nutricionais e plasticidade durante o desenvolvimento

Nas últimas décadas o combate à fome tem sido um desafio, o preço dos alimentos, da energia, o aumento progressivo do número de desemprego juntamente com os subempregos criados e os desastres naturais tem gerado danos a vidas humanas, como também à economia mundial prejudicando ainda mais a segurança e o aporte alimentar adequado. Mesmo com as políticas adotadas no mundo todo, principalmente em países subdesenvolvidos, o déficit alimentar continua sendo uma preocupação, pois a falta ou a inadequada ingestão de micronutrientes tem resultado em diferentes tipos de desnutrição (FAO, 2015).

Existe na literatura uma considerável relação entre a nutrição no início da vida e os impactos sobre o desenvolvimento e a saúde, que podem ser vistos a longo prazo (LUCAS, 1991; 2005). Evidências epidemiológicas e estudos experimentais vêm demonstrando uma estreita relação entre restrições dietéticas no início da vida e doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade e síndrome metabólica (GLUCKMAN *et al.*, 2005; TAPPIA; GABRIEL, 2006; LE CLAIR *et al.*, 2009). As doenças crônicas não transmissíveis apresentam uma grande parcela de morbidade e mortalidade em todo o mundo (WHO, 2011). O fornecimento de nutrientes é fundamental para um adequado crescimento fetal, e avaliar essa importância nutricional com os efeitos a longo prazo na saúde tem sido um papel muito difícil, visto que envolvem processos complexos e dinâmicos (WARNER; OZANNE, 2010; MARTIN-GRONERT; OZANNE, 2012).

O ambiente nutricional durante o crescimento fetal e pós-natal vêm sendo estudado por décadas, fortalecendo a hipótese que uma restrição nutricional durante as fases iniciais da vida pode sensibilizar a prole causando alterações que podem levar a quadros de desequilíbrio metabólico. E esse quadro poderá entrar em confronto com as condições que serão submetidas ao indivíduo em fases posteriores da vida (OROZCO-SOLIS *et al.*, 2011). Durante um período de privação nutricional, o feto interage dinamicamente com o meio a fim de adquirir vantagens de sobrevivência para o futuro, argumento que baseia o modelo do fenótipo poupador (HALES; BARKER, 2001)

De acordo com estudos realizados na Inglaterra em 1911, foram associadas taxas de mortalidade a doenças cardiovasculares em indivíduos que apresentaram baixo peso ao nascer (BARKER *et al.*, 1989). Esse estudo corrobora com o de Ravelli *et al.*, que mostrou jovens aos 19 anos de idade, cujas mães que passaram pelo período de escassez de alimentos durante a fome Holandesa (1944-1945), tornaram-se jovens obesos (RAVELLI; STEIN; SUSSER, 1976). Tais evidências deram subsídios para estudos mais detalhados afim de entender os mecanismos que circundam as alterações que o organismo pode sofrer durante períodos críticos de desenvolvimento, considerando gestação e lactação, insultos nutricionais e ambientais, com o risco de doenças na vida adulta.

A nutrição e sua relação com períodos do desenvolvimento (gestação e lactação) tem reconhecimento comprovado há décadas. Estudo realizado em 1962 por McCance observou que uma prole ao receber menos leite materno durante a lactação e posteriormente alimentados com dieta equilibrada apresentavam baixa taxa de crescimento e ganho de peso corporal. Propondo a ideia que existe uma janela crítica que poderia influenciar no crescimento e desenvolvimento, de forma a ser programada pelo aporte nutricional durante essas fases (MCCANCE, 1962).

O termo "plasticidade fenotípica" propõe que o organismo tem a capacidade de modificar seu fenótipo em resposta às agressões ambientais sofridas durante períodos críticos do desenvolvimento podendo causar repercussões tardias (GLUCKMAN *et al.*, 2005). A relação entre eventos precoces e doenças na idade adulta tornou-se evidente, porém mecanismos biológicos envolvendo modificações moleculares ainda são pouco conhecidos (BARNES; OZANNE, 2011; JIMENEZ-CHILLARON *et al.*, 2012)

2. 2 Fígado: principais funções, plasticidade hepática e metabolismo

O fígado é um órgão essencial do metabolismo, desempenhando papéis importantes em processos fisiológicos, que incluem desintoxicação, síntese de proteínas, equilíbrio da homeostase de glicose e metabolização de vários nutrientes (GEBHARDT, 1992; GHAFORY *et al.*, 2013). Além disso, esse órgão apresenta uma grande capacidade de se regenerar a partir de várias lesões. A maioria das funções metabólicas e de síntese são realizadas pelos hepatócitos que representam

cerca de 60% das células total do fígado e 80% do volume do órgão (MIYAJIMA; TANAKA; ITOH, 2014).

O fígado de rato, apresenta diferenciação celular em processos bioquímicos variados durante o período de gestação e pós natal. Métodos realizados para quantificar o volume celular do fígado, mostrou que este volume é atribuído ao número de células parenquimatosas, hematopoiéticas e células de *Kupffer* (GREENGARD; FEDERMAN; KNOX, 1972). No período dos 12 aos 28 dias pós-natal, enzimas metabólicas como tirosina aminotranferase, glicoquinase e aspartato transcarbomolase passam por uma grande oscilação em termos de atividades e após esse período, elas passam a exercer suas atividades metabólicas de uma maneira mais homogênea, ou seja, sem grandes variações (GREENGARD; FEDERMAN; KNOX, 1972).

Através do processamento e distribuição no metabolismo, o fígado oferece combustíveis e precursores para outros tecidos em concentrações apropriadas de nutrientes via corrente sanguínea (RUI, 2014). Para isso, esse órgão possui uma flexibilidade metabólica excepcional responsável por funções secretoras (bile, eletrólitos, fosfolípidos e colesterol) e excretoras (hormônios esteroides, bilirrubina, cálcio, drogas metabólicas), como também com principais funções de atuar no processamento de carboidratos através da glicogênese, glicogenólise, gliconeogênese; também pelo metabolismo proteico, síntese de uréia; e metabolismo lipídico pelos processos de lipogênese, oxidação de ácidos graxos, síntese de lipoproteínas, colesterol e fosfolípidos (MITRA, 2009).

Nos hepatócitos, local onde ocorre as atividades metabólicas por exemplo, no caso de uma dieta rica em proteínas, ele é abastecido com enzimas para catabolizar e direcionar os aminoácidos para gliconeogênese, horas depois, caso ocorra mudança na dieta rica em carboidratos, as enzimas recrutadas diminuem para que outras essenciais ao metabolismo de carboidratos executem sua atividade no metabolismo desses açúcares e para síntese de gordura (NELSON; COX, 2014).

Como regulador metabólico chave, ele atua como um mediador para conectar metabolicamente diferentes tecidos, incluindo músculo esquelético, tecido adiposo e outros tecidos extra-hepáticos, e o acometimento de uma disfunção hepática provoca uma predisposição a uma variedade de doenças incluindo,

doenças hepáticas gordurosa não alcoólica, e diabetes tipo 2, por exemplo (RUI, 2014).

2.3 Restrição proteica e seus efeitos no fígado

Uma alimentação equilibrada garante uma eficiência nos processos de crescimento e desenvolvimento. A falta ou a deficiência nutricional nos considerados períodos críticos podem causar repercussões em órgãos e sistemas, que podem refletir negativamente tanto a curto quanto a longo prazo, e tomar dimensões irreparáveis para o funcionamento destes (OLIVEIRA, 2007; AMORIM *et al.*, 2009)

Estudos já comprovam o efeito de dietas restritas de proteínas acarretando alterações estruturais no fígado. Foi observado aumento do tamanho dos lóbulos do fígado na prole de mães desnutridas (BURNS *et al.*, 1997), hipertrofia hepática que pode estar relacionada a alterações no estado oxidativo, renovação celular e utilização de substratos (SAMUELSSON *et al.*, 2008; SHANKAR *et al.*, 2010; HALL *et al.*, 2012). Porém estudos também demonstram comprometimento em sua funcionalidade, uma vez que foram observadas no tecido hepático alterações na atividade de várias enzimas envolvidas na glicogênese, glicogenólise e glicólise, na sensibilidade à insulina (diminuição da atividade das proteínas da cascata de sinalização intracelular da insulina) e na homeostase da glicose, mesmo sem hiperinsulinemia (HALES, 1997).

Em outro estudo, onde ratas foram submetidas à privação proteica durante a gestação foi visto que a gliconeogênese hepática e o processamento da glicose de seus descendentes apresentou-se alterada quando comparada com os controles, além de apresentar mudanças estruturais no fígado (BURNS *et al.*, 1997). Também foi demonstrado que desnutrição proteica durante o período de gestação e lactação causou diminuição nos níveis de DNA mitocondrial de fígado e músculo esquelético na idade adulta e estes níveis não foram completamente recuperados com uma boa nutrição pós-natal (PARK *et al.*, 2003).

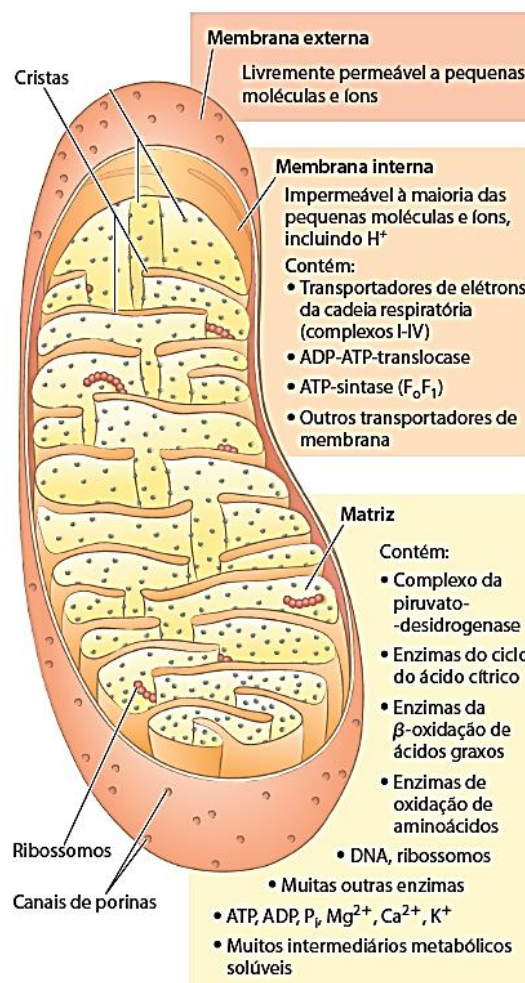
Estudos experimentais, com mitocôndrias isoladas de fígado, desenvolvidos no Centro Acadêmico de Vitória da UFPE têm demonstrado que ratos machos, aos 30 dias de vida, provenientes de ratas submetidas à dieta hipoprotéica (8 % de proteína) durante a gestação e lactação, apresentaram uma diminuição significativa da velocidade de fosforilação mitocondrial (estado 3), acompanhado de uma

redução do controle respiratório nesses animais desnutridos, com perda de potencial elétrico de membrana mitocondrial, aumento na produção de espécies reativas e menor capacidade de tamponamento do íon cálcio (Ca^{2+}) em comparação com o grupo controle (SILVA-FILHO, 2013). Esses resultados sugerem que essa disfunção mitocondrial observada em ratos jovens, em decorrência da desnutrição proteica perinatal, ocorra devido a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), uma vez que esses resultados foram completamente revertidos na presença de EGTA (quelante de cálcio) ou ciclosporina A (CsA) (um inibidor clássico do poro de transição de permeabilidade mitocondrial). O fenômeno de TPM está associado a diversas doenças crônico-degenerativas, tais como alguns tipos de câncer, Parkinson, Alzheimer e diabetes tipo II (KOWALTOWSKI *et al.*, 2009).

2.4 Mitocôndria: estrutura, funções metabólicas e bioenergética mitocondrial

As mitocôndrias são organelas responsáveis pela produção da energia celular, onde os combustíveis que suportam o metabolismo são armazenados na forma de adenosina trifosfato (ATP) pelo processo de fosforilação oxidativa (HATEFI, 1985; TAANMAN, 1999; LEVERVE, 2007). Possuem membrana dupla que permitem um arranjo seletivo de proteínas, nucleotídeos e coenzimas. A membrana externa que encontra-se em contato com o citosol e a membrana interna contém invaginações que se projetam para dentro e definem a matriz da organela, essa membrana interna possui uma alta impermeabilidade que é controlada por transportadores específicos e canais altamente regulados (KALUDERCIC; GIORGIO, 2016) (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura mitocondrial

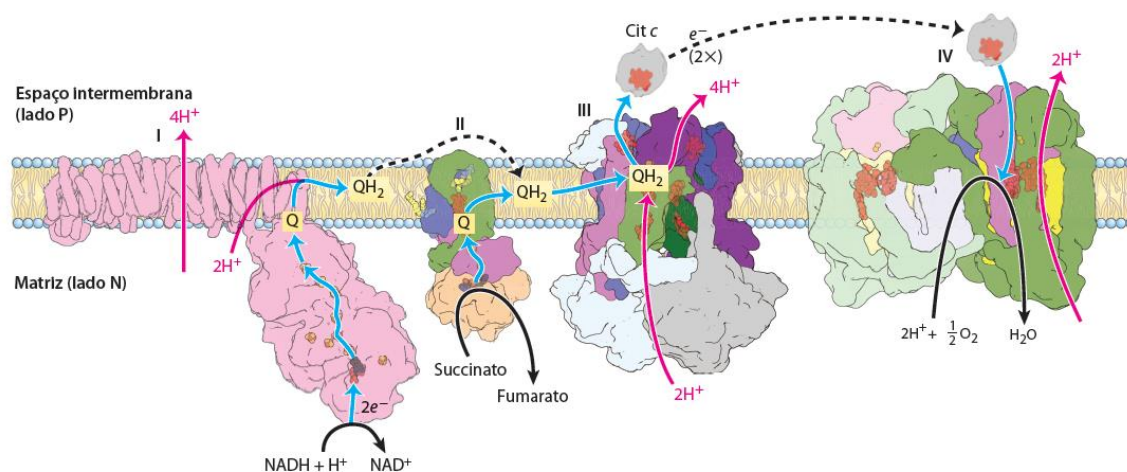


Fonte: Adaptada de Nelson e Cox, 2011.

Conhecidas há mais de séculos, por serem organelas dinâmicas, as mitocôndrias se tornaram um importante tema de pesquisa dentro da biologia experimental (ERNSTER; SCHATZ, 1981; YIN; CADENAS, 2015). De acordo com a hipótese endossimbiótica, as mitocôndrias surgiram pela imersão de eubactérias aeróbicas, coincidindo com a origem das células eucarióticas (MARGULIS *et al.*, 1970; GRAY; BURGER; LANG, 1999). Como um forte objeto de estudo, a complexidade dessa organela pode ser resumida como uma rede que intersecta e integra sinais e vias intracelulares que tem uma importância crítica na homeostase celular, incluindo participação na β -oxidação de ácidos graxos, participação no ciclo do ácido cítrico e do ciclo da ureia, além do controle intracelular de Ca^{2+} , regulação de sinalização de morte celular, entre outras atividades (D'AQUILA; BELLIZZI; PASSARINO, 2015).

As mitocôndrias possuem seu próprio sistema genético, que inclui um DNA mitocondrial (mtDNA) circular, o qual codifica os genes de 13 polipeptídeos que são traduzidos nos ribossomos mitocondriais para formação das unidades estruturais dos complexos enzimáticos presentes na matriz mitocondrial, que incluem 7 dos 46 polipeptídeos do complexo I (NADH desidrogenase), 1 polipeptídeo dos 11 do complexo III (complexo bc_1), 3 dos 13 polipeptídeos do complexo IV (citocromo c oxidase) e 2 das 16 proteínas do complexo V (ATP sintetase). O DNA nuclear (nDNA) possui códigos para outras proteínas mitocondriais, que incluem as 4 subunidades que formam o complexo II (succinato desidrogenase), proteínas ribossomais mitocondriais, fatores de alongamento e outras enzimas mitocondriais (WALLACE, 2005; SCARPULLA, 2008).

Figura 2 - Complexos respiratórios mitocondriais.

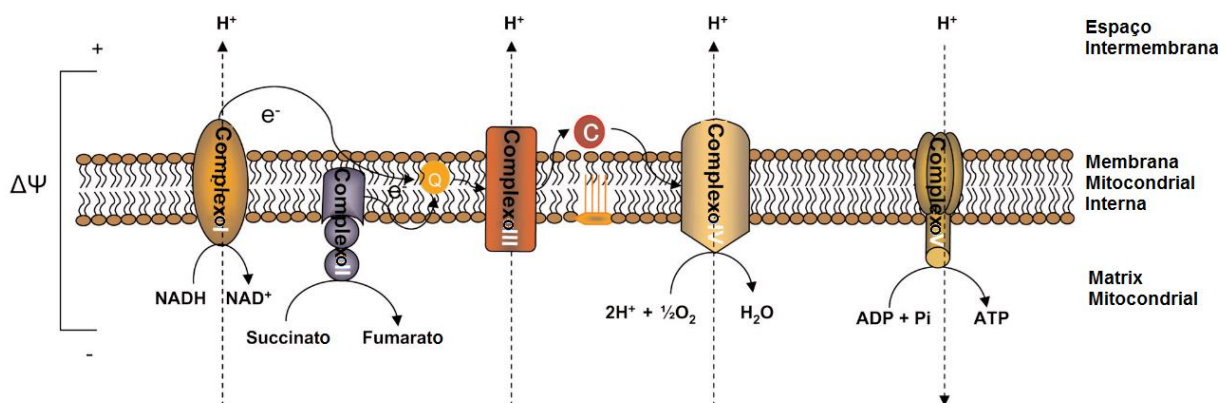


Abaixo da identificação dos complexos estão os números das subunidades de proteínas codificadas por nDNA e mtDNA. Na imagem identificam-se: setas azuis indicam os locais de bombeamento de prótons, as setas verdes caminhos dos elétrons, setas vermelhas fluxo de prótons através do complexo V. Também são visualizados transportadores de elétrons tais como, *citocromo c* (Cyt c) e coenzima Q (Q), além de íons de ferro e cobre (NELSON; COX, 2014).

Os complexos respiratórios mitocondriais desempenham um papel crítico na produção de energia celular através do transporte de elétrons, que ocorre entre os complexos I e IV, com a extrusão de prótons pelos complexos I, III e IV para o espaço intermembranas, gerando um gradiente eletroquímico ($\Delta\psi$) na membrana mitocondrial interna, e através do complexo V (ATP sintase) a maior parte desses prótons retornam a matriz mitocondrial gerando força próton motriz para síntese de

de ATP a partir da $\text{ADP} + \text{P}_i$ (ENNS, 2003; BAYIR; KAGAN, 2008; HAN *et al.*, 2017) (Figura 3).

Figura 3 - Cadeia transportadora de elétrons e produção mitocondrial de ATP.



Fonte: Adaptado de Baylr, 2008.

2.5 Espécies reativas de oxigênio, sistemas antioxidantes e estresse oxidativo

A energia produzida nas mitocôndrias depende da força próton-motriz gerada pelo gradiente eletroquímico da cadeia transportadora de elétrons (CTE), responsável por transferir elétrons de cofatores reduzidos como NADH e FADH_2 , derivados do ciclo de Krebs ou da β -oxidação (MELOV, 2000). Quando a CTE torna-se saturada com elétrons, os mesmos podem passar diretamente pelos complexos I e III, gerando assim o $\text{O}_2^{\cdot -}$ (ânion superóxido), que pode ser reduzido a um radical hidroxila ($\text{OH}^{\cdot}$) um agente potencialmente mais oxidante, que o $\text{O}_2^{\cdot}$. Estima-se em nível fisiológico que entre 0,2 e 2% do oxigênio gerado seja convertido em espécies reativas de oxigênio (EROs) mitocondriais (MELOV *et al.*, 2000; BEVILACQUA *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2016).

A geração dessas EROs pode acontecer em pelo menos 9 sítios na mitocôndria. São eles (Figura 4):

(1) piruvato desidrogenase, cuja taxa de produção está ligada ao aumento da razão $\text{NAD(P)H}/\text{NAD(P)}^+$ (BRAUTIGAM *et al.*, 2009; FISHER-WELLMAN *et al.*, 2013; AMBRUS *et al.*, 2015);

(2) 2-oxoglutarato desidrogenase, enzima mitocondrial do ciclo de Krebs, que produz EROs pela oxidação do NADH (STARKOV *et al.*, 2004; TRETTER; SIPOS; ADAM-VIZI, 2004);

(3) glicerol 3-fosfato desidrogenase, uma coenzima na membrana mitocondrial interna, que transfere fatores citosólicos para a cadeia transportadora de elétrons (TRETTER *et al.*, 2007; ORR *et al.*, 2012);

(4) flavoproteína oxidoreductase Q, responsável por doar elétrons para ubiquinona, aumentando a capacidade de escape dos elétrons (STPIERRE, 2002; PEREVOSHCHIKOVA, 2013);

(5) monoaminas oxidase (MAO), uma flavoenzima que pode ter seu grupo prostético reduzido a aldeído e amônia e em seguida oxidado para formação do H_2O_2 (TIPTON *et al.*, 2004; TONINELLO *et al.*, 2004; YODIM; EDMONDSON; TIPTON, 2006; DI LISA *et al.*, 2009);

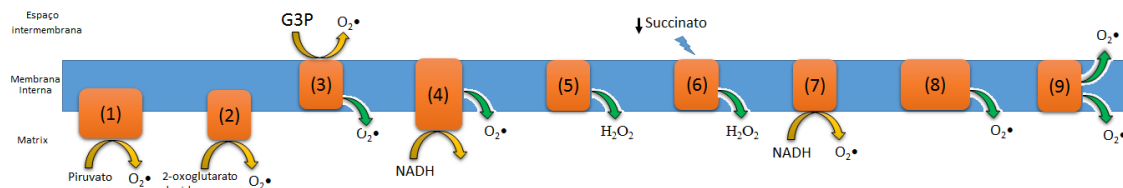
(6) flavina no complexo II, em condições de baixos níveis de succinato e uma atividade diminuída dos complexos I e III (TURRENS, 2003; QUINLAN *et al.*, 2012);

(7) flavina no complexo I, que sofre redução durante o fluxo de elétrons a partir da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato no estado reduzido (NADH), produzindo $O_2^{\bullet}$ (HERREO, 2000);

(8) ubiquinona no complexo I, que pode sofrer redução na presença de succinato, glicerol-3-fosfato ou acil-CoA, porém quando os elétrons sofrem um bombeamento inverso geram $O_2^{\bullet}$ (LAMBERT, 2004; BRAND, 2010; CARDOSO, 2012);

(9) ubiquinona no complexo III, que através da ubiquinona reduzida transfere os elétrons para o citocromo c através do chamado ciclo Q, que resulta na formação de uma semi-ubiquitina que tem a capacidade de reduzir O_2 em $O_2^{\bullet}$ (BROOKES *et al.*, 2004; FIGUEIRA *et al.*, 2013).

Figura 4 - Sítios mitocondriais de produção de espécies reativas de oxigênio.



Cada sítio está enumerado de acordo com as especificações acima citados. As abreviaturas da figura correspondem a G3P (glicerol 3- fosfato desidrogenase), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido) e $O_2^{\bullet -}$ (ânion superóxido).

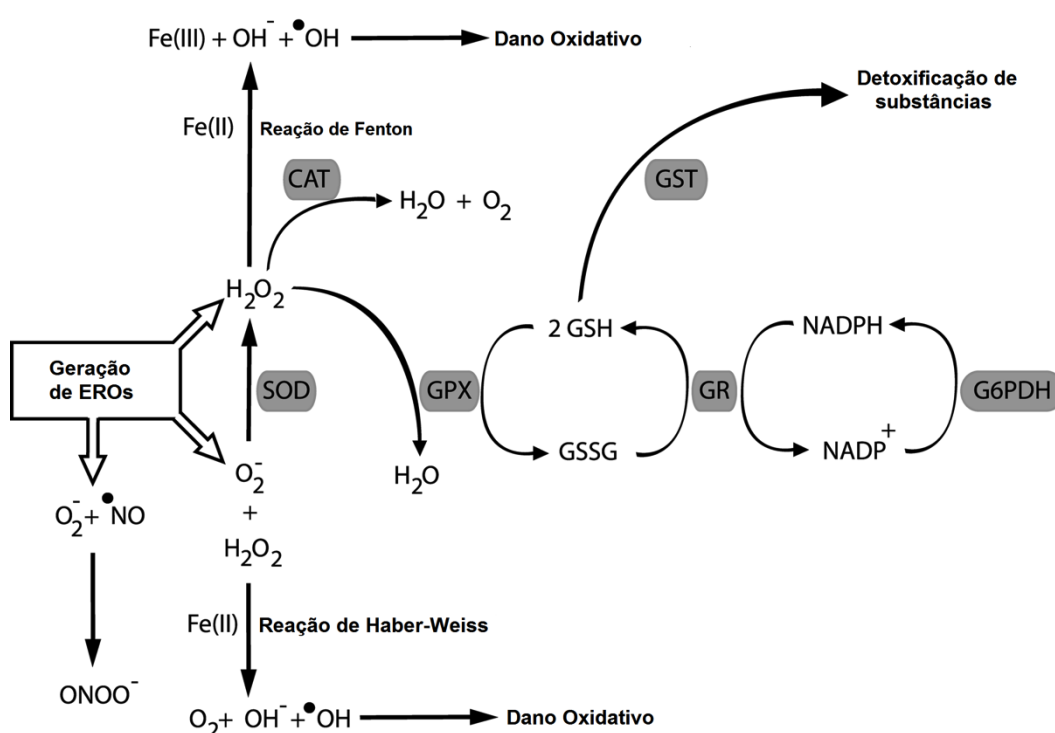
Fonte: LIMA, 2016.

As mitocôndrias possuem uma capacidade antioxidante, que compreende sistemas não-enzimáticos e enzimáticos, os quais desempenham o papel de converter espécies reativas em moléculas menos ofensivas (HALLIWELL, 1994). Essa capacidade de conversão envolve produtos de reações que podem ser utilizados como substratos para utilização da próxima enzima (HALLIWELL, 2012). Com os $O_2^{\bullet -}$ formados, a enzima superóxido dismutase (SOD – Mn-SOD na matriz ou Cu/Zn-SOD no citosol) é responsável pela conversão/detoxificação do $O_2^{\bullet -}$ a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (OKADO-MATSUMOTO; FRIDOVICH, 2001, BRAND, 2010) (Figura 5).

O H_2O_2 formado ainda possui uma parcela de dano a célula, porém desempenha um importante papel de sinalizador (CONRAD, 2013), que desencadeia a ativação de enzimas para sua remoção ou através da reação de Fenton pode reagir com íons de cobre (Cu^+) ou ferro (Fe^{2+}) produzindo radicais hidroxil ($OH^{\bullet}$), que em excesso estão envolvidos em processos de peroxidação lipídica em membranas biológicas, oxidação de proteínas, nDNA e mtDNA e até mesmo podem participar de reações para formação o peroxinitrito ($ONOO^{\bullet -}$) (HERMES-LIMA, 2004). Ainda em relação a atuação das enzimas no sistema de defesa antioxidante, a catalase (CAT) é responsável pela conversão do H_2O_2 em H_2O e O_2 (AEBI, 1984). Outra enzima que contribui para a neutralização do peróxido de hidrogênio e que executa a mesma função da CAT é a Glutathiona Peroxidase (GPx) (RUSZKIEWICZ; ALBRECHT, 2015).

Já em relação ao sistema antioxidante não enzimático, a glutathiona reduzida (GSH) pode estabilizar essas espécies reativas por ação própria, através da doação de prótons (H^+) derivados a partir de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato no estado reduzido (NADPH), ou desempenhar seu papel juntamente com a ação da glutathiona S-transferase, que excreta xenobióticos tóxicos produzidos pela peroxidação lipídica ou fornecendo substratos para GPx (JACKSON, 2002; HERMES-LIMA, 2004; HALLIWELL, 2012; MARI, 2013) (Figura 5).

Figura 5 - Mecanismos de formação de espécies reativas e sistemas antioxidantes.



As abreviaturas SOD, CAT, GST, GR, GPx, GSH, GSSG, NADP⁺, NADPH e G6PDH representam, superóxido dismutase, catalase, glutathiona S-transferase, glutathiona redutase, glutathiona peroxidase, glutathiona reduzida, glutathiona oxidada, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado oxidado), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido), e glicose-6-fosfato desidrogenase, respectivamente.

Fonte: Adaptado de Hermes-Lima, 2004.

A produção contínua das EROs na célula é necessária para regulação de vários processos celulares, como por exemplo crescimento e diferenciação celular, no entanto o desequilíbrio entre as espécies reativas e os sistemas antioxidantes pode gerar também um quadro conhecido como estresse oxidativo (SIES; CADENAS, 1985; HAMANAKA; CHANDEL, 2010; DIKALOV, 2011; TOCCHETTI *et al.*, 2011; FIGUEIRA *et al.*, 2013). O dano produzido por essas biomoléculas pode

resultar numa disfunção do tecido acometido, gerando uma série de condições patológicas já relatadas na literatura, como câncer, distúrbios neurodegenerativos e envelhecimento precoce (LIN; BEAL, 2006; REUTER *et al.*, 2010).

Estudos de bases experimentais vêm demonstrando o efeito de dietas com baixo teor de proteína durante períodos de gestação e lactação, no estado redox de ratos. Um desses estudos mostrou que uma restrição proteica perinatal altera a função mitocondrial, com aumento na produção de EROs e diminuição na atividade de enzimas antioxidantes resultando num desbalanço oxidativo, em coração de ratos adultos (NASCIMENTO *et al.*, 2014). Esse mesmo modelo experimental mostrou que em ratos, aos 22 dias de vida, foi observada uma disfunção mitocondrial, logo após o desmame, a qual levou ao aumento de espécies reativas, diminuição do sistema de defesas antioxidantes e desbalanço redox no tronco cerebral. Aos 100 dias de vida avaliando o mesmo tecido, também foi observada uma alteração do balanço oxidativo, com aumento de peroxidação lipídica e diminuição da atividade de enzimas antioxidantes (FERREIRA, D. S. *et al.*, 2016; FERREIRA, D. J. *et al.*, 2016)

2.6 Transição de permeabilidade mitocondrial e associação com doenças crônicas

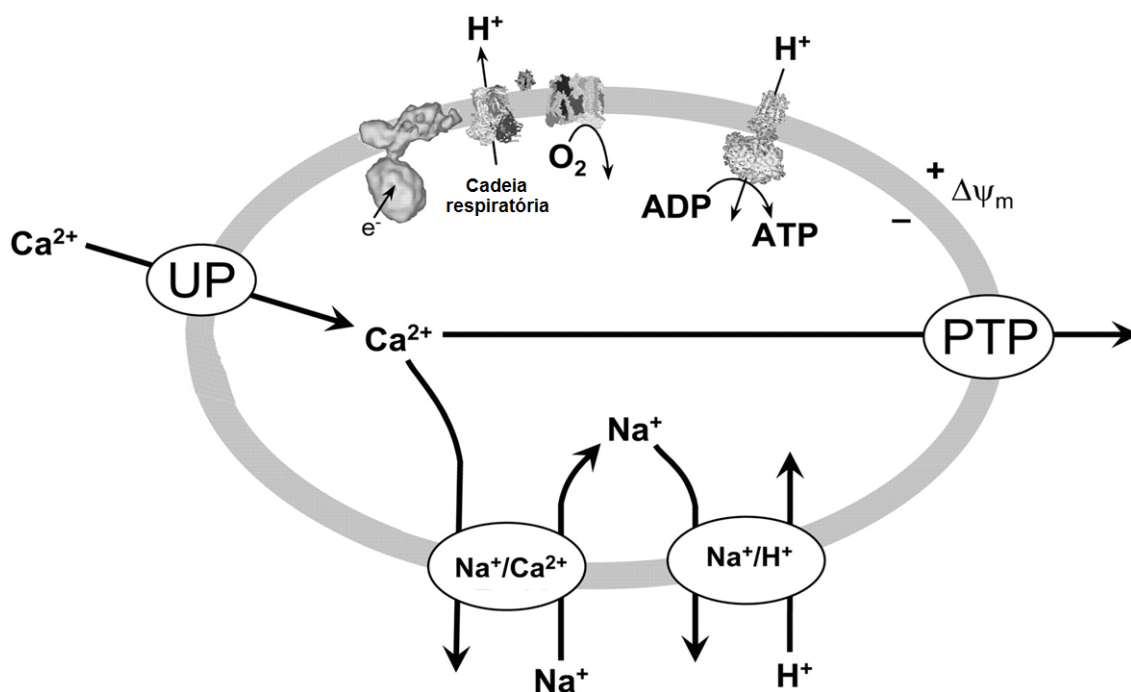
O cálcio (Ca^{2+}) é um versátil segundo mensageiro, responsável por controlar respostas celulares a curto e a longo prazo através de um sistema sofisticado que requer canais e íons e mudanças no fluxo do Ca^{2+} através da membrana plasmática e da membrana intracelular de organelas (SANTO-DOMING; DEMAUREX, 2010). O estado redox e a bioenergética mitocondrial podem ser determinados através de vários sistemas, como também os níveis intracelulares de Ca^{2+} podem contribuir para que seja gerado um desbalanço redox, evento que pode ser devido a ocorrência da transição de permeabilidade mitocondrial (TPM). A TPM pode resultar na abertura de um poro na membrana mitocondrial interna, conhecido como poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) gerando um comprometimento da funcionalidade das mitocôndrias, inchamento substancial da organela, ruptura de membrana e extravasamento de conteúdos da matriz mitochondrial (KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001; KOWALTOWSKI *et al.*, 2009).

Essa homeostase das concentrações de Ca^{2+} pode ser regulada por duas organelas: a mitocôndria e o retículo endoplasmático (RE). O RE é responsável pelos estoques de cálcio das células ao passo que a mitocôndria decodifica sinais para liberação desses íons de Ca^{2+} (BERRIDGE, 2010; SANTO-DOMINGO; DEMAUREX, 2010). O acúmulo de cálcio pode levar à redução do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), com consequente indução da abertura PTPM levando a liberação de *citocromo c* e fatores pro-apoptóticos no espaço intermembranas (HALESTRAP; PASDOIS, 2009).

O PTPM é um complexo multicanal de proteínas responsáveis por manter o equilíbrio da cadeia respiratória. As principais proteínas que compõem esse complexo são canal de ânion dependente de voltagem (VDAC), translocadores de adenina nucleotídeo-1 (ANT-1) e a ciclofilina-D (CYP-D), que quando estimuladas aumentam a produção de espécies reativas, resultando em depleção de ATP e liberação de moléculas apoptóticas (BONORA; PINTON, 2014; RASOLA; BERNARDI, 2014).

A captação de Ca^{2+} é realizada através de um sistema uniporter (UP) mitocondrial de cálcio, o qual é regulado pelo $\Delta\Psi_m$ para a matriz mitocondrial. O efluxo de Ca^{2+} formado é devido a troca de Na^+ bombeado para fora da matriz em troca dos prótons bombeados pela cadeia respiratória, consumindo esse potencial de membrana (BROOKES *et al.*, 2004). Um mesmo mecanismo ocorre através do poro de transição, que em sua abertura sobrecarrega a mitocôndria podendo resultar muitas vezes em consequências patológicas (CROMPTON *et al.*, 1999) (Figura 6).

Figura 6 - Caminhos para captação de cálcio na mitocôndria



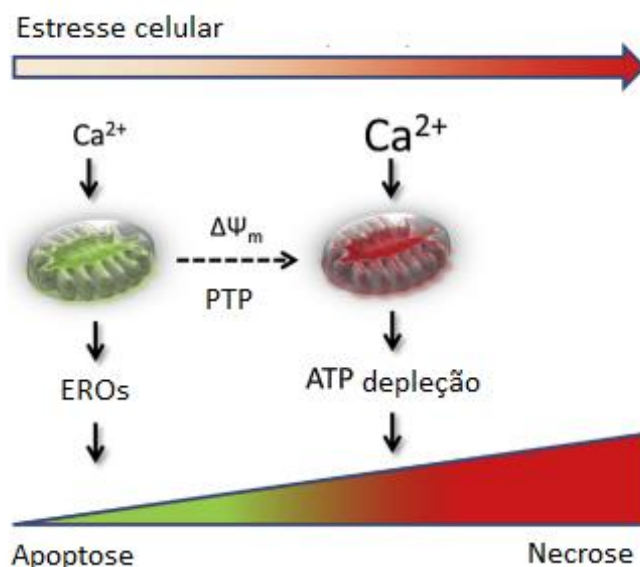
As siglas na figura significam: UP (sistema uniporter), PTP (poro de transição de permeabilidade mitocondrial), $\Delta\Psi_m$ (potencial elétrico de membrana mitocondrial), $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (trocador sódio/cálcio) e Na^+/H^+ (trocador sódio/próton).

Fonte: Adaptado de Brookes, 2004.

Estudos vem demonstrando que uma sobrecarga celular de Ca^{2+} está atrelada a danos mitocondriais importantes para o desenvolvimento de patologias. Onde o sistema de regulação neuronal em taxas alteradas de concentração de Ca^{2+} tem levado ao aumento da produção de espécies reativas comprometendo por exemplo, a função de neurônios e levando a quadros de apoptose associados ao desenvolvimento do Alzheimer (BERRIDGE, 2010; SUPNET; BEZPROZVANNY, 2010). Estudos destacam um dano tóxico pelo Ca^{2+} na função de células acinares e ductais do pâncreas, acarretando pancreatite aguda, ativação prematura de enzimas digestivas e morte celular por necrose (CRIDDLE, 2016; MALETH; HEGYI, 2016) (Figura 7).

Um outro estudo também relacionou uma indução de sobrecargas de Ca^{2+} com disfunção tanto mitocondrial quanto no retículo endoplasmático, levando a um quadro de estresse oxidativo e sensibilidade a insulina em animais obesos (ARRUDA *et al.*, 2014).

Figura 7 - Modelo hipotético para ilustrar a participação do cálcio no estresse oxidativo e processos de morte celular.



As siglas na figura significam: ATP (adenosina trifosfato), Ca^{2+} (Cálcio), EROs (espécies reativas de oxigênio), PTP (porão de transição de permeabilidade mitocondrial), $\Delta\Psi_m$ (potencial elétrico de membrana mitocondrial).

Fonte: Adaptado de Criddle, 2016.

2.7 Treinamento físico e metabolismo oxidativo mitocondrial

O estilo de vida moderno tem aumentado comportamentos sedentários e hábitos incorretos de alimentação, contribuindo para altos índices de doenças metabólicas crônicas como doenças cardiovasculares, hepáticas, obesidade e diabetes tipo II (MATTEONI *et al.*, 1999; TARGHER; MARRA; MARCHESINI, 2008). Existe um consenso na comunidade científica de que um estilo de vida ativo, incluindo prática regular de atividade física e nutrição equilibrada, está associado a uma maior qualidade de vida e menor risco de aparecimento de doenças metabólicas (FARRELL *et al.*, 1998; BOUSQUET-SANTOS *et al.*, 2006).

O termo atividade física refere-se ao movimento do músculo esquelético que ao ser realizado demanda um gasto energético acima de valores basais (CASPERSEN; POWELL; CHRISTENSON, 1985). O exercício físico e o treinamento refletem à atividade física realizada de forma sistêmica com parâmetros como, intensidade, duração, frequência e tipo (CASPERSEN; POWELL; CHRISTENSON, 1985).

Estudos acerca do efeito modulador do treinamento físico sobre o metabolismo mitocondrial no fígado ainda são inconclusivos. Dados sobre o metabolismo hepático e a atuação do treinamento físico ainda são muito controversos e inconsistentes, provavelmente estão relacionados a diferentes modelos experimentais como também, tipo do exercício (natação ou esteira), duração, intensidade, idade de sacrifício e duração do treinamento. Porém estudos com treinamento físico já apresentam resultados positivos mostrando melhorias na capacidade de complexos mitocondriais e capacidade antioxidante, como aumento da atividade mitocondrial dos complexos I, IV e V, e aumento da atividade das enzimas antioxidantes GST (SUN *et al.*, 2010), e da enzima GPx, diminuição de peroxidação lipídica (VENDITTI; DI MEO, 1996), e redução da oxidação de proteínas em animais (LIU *et al.*, 2000).

A citrato sintase é uma enzima limitante para o processo de produção mitocondrial de energia, e sua atividade pode ser avaliada como um marcador do metabolismo oxidativo, servindo como avaliador da capacidade respiratória e marcador de massa mitochondrial (SPINA *et al.*, 1996; SANTOS-ALVES *et al.*, 2015). Um estudo demonstrou que a atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo encontra-se elevada 1 e 48 horas após a última sessão de treinamento de resistência (SIU *et al.*, 2003). Um outro estudo comparando os efeitos de duas modalidades de exercício crônico (treinamento em esteira e atividade física voluntária) em ratos, comprovou que ambos são capazes de promover biogênese mitocondrial e renovação dos hepatócitos, por apresentar alta atividade da enzima citrato sintase nesses grupos quando comparado ao grupo sedentário (SANTOS-ALVES *et al.*, 2015).

As mitocôndrias são organelas centrais no metabolismo celular e têm um papel principal nas vias de sinalização que podem incluir regulação da homeostase redox ou estar envolvidas em processos de morte celular (SERVIDDIO; ROMANO, *et al.*, 2011; GONCALVES *et al.*, 2013). O exercício como fator ambiental também está atrelado a modulações antioxidantes, diminuição do estresse oxidativo, regulação de proteínas anti-apoptóticas, aumento do fluxo protetor de autofagia e maior reciclagem de componentes celulares (GONCALVES *et al.*, 2013).

Políticas públicas têm procurado incentivar a prática de atividade física, visto os benefícios que o exercício pode proporcionar ao organismo humano (WHO, 2010). Cada vez mais vem sendo atrelada a prática de atividades com a melhora da aptidão muscular, cardiorrespiratória e óssea, reduzindo risco de hipertensão, diabetes, depressão, doenças coronárias, além do controle do peso corporal (WHO, 2016).

3 HIPÓTESE

O exercício físico moderado modula o estado redox e a bioenergética mitocondrial hepática de ratos jovens, minimizando o estresse oxidativo causado pela restrição proteica perinatal.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Estudar os efeitos do exercício físico moderado no metabolismo hepático e bioenergética mitocondrial de ratos jovens submetidos a uma restrição proteica durante a gestação e lactação.

4.2 Específicos

Avaliar os efeitos do treinamento físico moderado em fígado de ratos jovens (60 dias) submetidos a restrição proteica perinatal na (o):

- Peso do animal e do tecido hepático;
- Dosagem dos níveis séricos de albumina;
- Atividade da citrate sintase nos músculos sóleo e EDL;
- Atividade de enzimas-chave das vias metabólicas da glicose, ácido graxo e via das pentoses: fosfofrutoquinase (PFK), β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (β -HAD), citrato sintase (CS), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH);
- Capacidade funcional da cadeia transportadora de elétrons;
- Inchamento mitocondrial;
- Produção mitocondrial de espécies reativas em geral (oxigênio e nitrogênio);
- Biomarcadores de estresse oxidativo (MDA, carbonilas e sulfidrilas);
- Atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase, glutathione-S-transferase e glutathione peroxidase no tecido hepático;
- Estado redox celular (GSH/GSSG);

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais e Dieta

Foram utilizados ratos fêmeas da linhagem *Wistar* provenientes da colônia do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em biotério de experimentação com temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$, ciclo claro-escuro de 12/12 horas. As ratas prenhas foram divididas em dois grupos de acordo com a dieta fornecida: dieta com níveis normais de proteína (N, proteína a 17%) e dieta com baixo teor de proteína (L, proteína a 8%), com base no Instituto Americano de Nutrição (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993; NASCIMENTO *et al.*, 2014) (Quadro 1). Após o período de lactação (21 dias), apenas os ratos machos fizeram a composição do grupo experimental. Estes receberam dieta comercial de biotério Presence®. Do 26º ao 28º dias de vida, todos os animais foram submetidos ao teste de velocidade máxima, para então, serem subdivididos em quatro grupos de acordo com a prática ou não de treinamento físico. Foram obtidos os seguintes grupos experimentais: Normoproteico Sedentário (NS); Normoproteico treinado (NT); baixa proteína sedentário (LS); baixa proteína treinado (LT). Os grupos de animais não treinados permaneceram nas gaiolas no mesmo ambiente dos animais treinados, pelo mesmo período de tempo de realização do treinamento físico. Aos 60 dias de vida, os diferentes grupos experimentais foram eutanaziados, para a realização do estudo proposto (Figura 8). A manipulação e os cuidados com os animais seguiram as recomendações do COBEA. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de uso animal da UFPE (nº do protocolo: 23076.017809/2014-04).

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

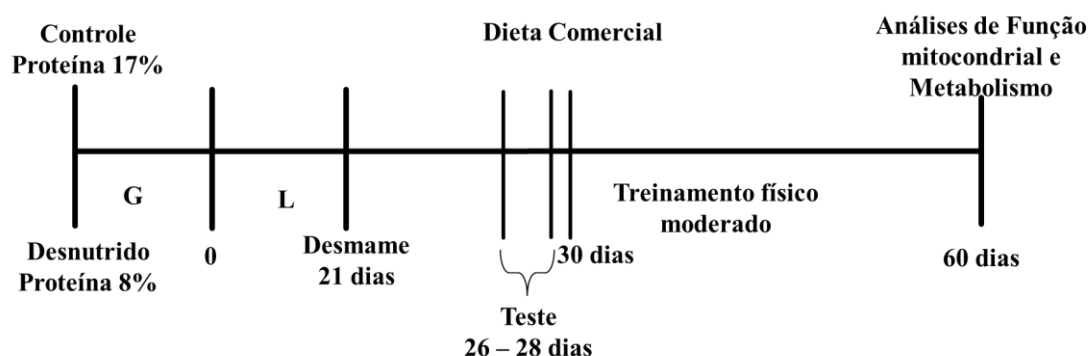
Ingredientes	Dieta com teor normal de proteína (17 %)	Dieta com baixo teor de proteína (8 %)
Caseína (85 %)	20	9,41
Amido de milho dextrinizado	13	13,2
Celulose	5	5
Sacarose	10	10
Amido de milho	39,74	50,34
Óleo de soja	7,6	7,6
Bitartarato de colina	0,25	0,25
Metionina	0,3	0,3
Mix Vitamínico*	1	1
Mix Mineral**	3,5	3,5
Densidade energética (kJ/g)	16,26	16,26

*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; Fe₂O₃, 120; FeSO₄.7H₂O, 200.

Fonte: REEVES, 1993.

Figura 8 - Desenho Experimental



G: Gestação/ L: Lactação

Fonte: LIMA, T. R. L. A., 2016.

5.2 Protocolo de treino

Os animais foram submetidos no 26º, 27º e 28º dias de vida a um teste de corrida aeróbica incremental até a fadiga. Onde foi avaliado o desempenho dos animais com progressão da velocidade em 3m/min a cada 3 minutos. (BROOKS, 1978; RODRIGUES, 2007). A fadiga foi definida como um ponto em que os animais não eram capazes de manter o ritmo da esteira por mais de 10 segundos. Após 48 h do teste incremental, os animais dos grupos treinado e desnutrido treinado com completos 30 dias de vida, foram submetidos a um programa de treinamento físico, em esteira ergométrica Inbramed, modelo KT-10100 (Imagem 1), utilizando o seguinte protocolo experimental (60 min/dia, 5 dias/semana, 4 semanas e a 50% da capacidade máxima atingida para os determinandos grupos experimentais). Os grupos sedentários permaneceram nas gaiolas, e no mesmo ambiente e tempo dos animais em treinamento (BELLÓ-KEIN *et al.*, 2000; BRAZ *et al.*, 2015).

Tabela 2- Protocolo de treinamento físico de acordo com a velocidade e duração das sessões durante as 4 semanas de treinamento.

Semana	Velocidade máxima do teste		50% da capacidade máxima		Duração (min)
	LT	NT	LT	NT	
1°	6m/min	6m/min	3m/min	3m/min	60*
2°	12m/min	9m/min	6m/min	4,5m/min	5/50/5**
3°	15m/min	12m/min	7,5m/min	6m/min	5/50/5**
4°	18m/min	15m/min	9m/min	7,5m/min	5/50/5**

*Duração da corrida do animal na esteira por dia.

** 5 minutos iniciais e finais do treinamento com velocidade da semana anterior.

Fonte: LIMA, T. R. L. A., 2016.

Imagem 1- Esteira ergométrica Inbramed, modelo KT-10100, utilizada para realização do treinamento dos animais.



Fonte: LIMA, T. R. L. A., 2016.

5.3 Coleta do tecido hepático para análises bioquímicas

Todos os animais foram eutanaziados através do uso da guilhotina e em seguida, realizada dissecação para a remoção do tecido hepático.

5.4 Preparo do homogeneizado do tecido hepático para utilização nas técnicas bioquímicas

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

5.5 Isolamento das mitocôndrias hepáticas

As mitocôndrias foram isoladas a partir do fígado de ratos jovens, utilizando a técnica de centrifugação diferencial, segundo SCHNEIDER e HOGEBOM (1951). O fígado, retirado após a morte do animal, 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 homogeneizador Potter-Elvehjem. O material foi centrifugado a 461g por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado durante 10 minutos a 4722 g sendo a fase lipídica superior retirada com pipeta de Pasteur. 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, e posteriormente submetida a dosagem protéica.

5.6 Dosagem de proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método de BRADFORD (BRADFORD, 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 (2mg/mL) foi utilizada como padrão.

5.7 Condições experimentais

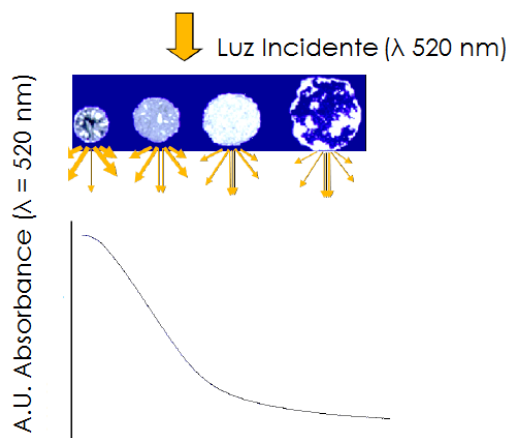
Os experimentos com mitocôndrias isoladas foram realizados a 28 °C em meio de respiração o qual continha 120 mM de KCl, 4mM de Hepes, 5mM de K₂HPO₄, 1mM de EGTA, BSA a 0.2%, com pH final de 7.2. Como substrato respiratório foi utilizada uma mistura de substratos para o complexo I da cadeia respiratória (2mM de malato, 1mM de piruvato, 1mM de α -cetoglutarato e 1mM de

glutamato). Os experimentos foram feitos na presença e/ou ausência de 0,5 mM de EGTA.

5.8 Avaliação do inchamento mitocondrial (TPM)

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 (Figura 9) (NICHOLLS; 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. Esta propriedade das mitocôndrias fornece um método qualitativo simples para se estudar o fluxo de solutos através da membrana mitocondrial interna. As mitocôndrias são ideais à aplicação desta técnica porque sua matriz pode sofrer grandes variações de volume, já que a membrana interna sofre desdobramento de suas pregas. O acompanhamento espectrofotométrico da redução da absorbância a 520 nm (MACEDO *et al*, 1988) foi feito em um espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA) utilizando mitocôndrias isoladas (0,5 mg de proteína/mL). Essa técnica também pode ser utilizada para avaliar o fenômeno de TPM, o qual resulta em inchamento da organela. A confirmação do aumento do volume mitocondrial em decorrência da TPM foi feita através do uso de inibidores do poro de transição de permeabilidade (como ciclosporina A e EGTA, quelante de cálcio).

Figura 9- Inchamento mitocondrial.

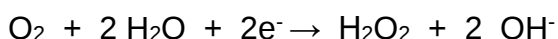


As setas indicam o feixe de luz que reflete ao incidir sob mitocôndrias integras e que podem ser menos espalhadas em situações de inchamento mitocondrial, por exemplo. O gráfico representa a absorbância a 520 nm em função do tempo.

Fonte: SILVA-FILHO, 2014.

5.9 Medida do consumo de oxigênio mitocondrial

O consumo de oxigênio mitocondrial foi medido polarograficamente utilizando-se um eletrodo do tipo OXIGY conectado a um oxígrafo (Hansatech Instrument®), em uma câmara de vidro fechada (1mL) e termostatizada (28°C), equipada com agitador magnético (ROBINSON; COOPER, 1970). Esse tipo de eletrodo compreende um cátodo de platina e um ânodo de prata, imersos numa solução eletrolítica (geralmente 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 O_2 na superfície do cátodo. Os impulsos elétricos são transmitidos ao oxígrafo, onde foi feita a leitura.

5.10 Avaliação da produção de espécies reativas

A geração de espécies reativas (oxigênio e nitrogênio) mitocondriais foi monitorada espectrofluorimetricamente utilizando-se o probe diclorodihidrofluoreceína ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$), da Sigma. O $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ($5 \mu\text{M}$), não específico apenas para espécies reativas de oxigênio. A fluorescência foi monitorada em um espectrofluorímetro (FLUOstar Omega - BMG Labtech, USA) usando comprimentos de onda de 488 nm para excitação e 525 nm para emissão (LEBEL; ISCHIROPOULOS; BONDY, 1992; GARCIA-RUIZ *et al.*, 1997). Os resultados foram expressos como unidades de fluorescência (F.U.) de DCF.

5.11 Dosagem dos níveis séricos de Albumina

Os níveis de albumina foram quantificados através de Kit colorimétrico da Labtest® utilizando como amostra, o soro dos animais, seguindo rigorosamente as especificações do Kit.

5.12 Dosagem sérica de aminotransferases: Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT)

Os níveis de AST e ALT foram quantificados através de Kit colorimétrico da Labtest® utilizando-se como amostra, o soro dos animais, seguindo rigorosamente as especificações do Kit.

5.13 Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica pela metodologia da substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico

Para a dosagem de TBARS foi utilizada a técnica colorimétrica de BUEGE e AUST (BUEGE, 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. Adicionou-se a uma alíquota ($300 \mu\text{g}$ proteína) do homogeneizado ao ácido tricloroacético (TCA) a 30%, o material foi

centrifugado a 1180g por 10 minutos, o sobrenadante retirado e adicionado ao ácido tiobarbitúrico a 0.73% 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, utilizada para a leitura da absorbância a 535nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA), utilizando cubetas de quartzo. Os resultados foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína.

5.14 Medida dos níveis de oxidação de proteínas (Carbonilas)

A avaliação da oxidação de proteínas dar-se através da reação com o composto 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) descrito por ZANATTA (ZANATTA *et al.*, 2013). As proteínas foram precipitadas em TCA a 30% seguido de centrifugação a 1180g por 15 minutos, o *pellet* foi ressuspensão e adicionado DNPH 10mM dissolvido em HCl 2.5 N e incubado em local livre de luz a temperatura ambiente durante uma hora. Posteriormente, as proteínas precipitadas em adição ao TCA 20% foram centrifugadas e passaram por uma série de lavagens com tampão contendo acetato de etila e etanol, até o precipitado ser ressuspensão em cloridrato de guanidina e levado ao espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA) para leitura em um comprimento de onda de 370nm (37°C). Os resultados foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína.

5.15 Avaliação do conteúdo de sulfidril-SH

O conteúdo de sulfidril foi determinado a partir da reação com o composto DTNB (5,5'-dithiobis (2 nitrobenzoic acid) (ELLMAN, 1959). A alíquota do homogenate (200 μg de proteína) foi incubada no escuro após a adição de DTNB 10mM e o volume final foi de 1 mL completado com tampão de extração pH 7.4 e realizada a leitura com absorbância (30°C) a 412nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA). Os resultados foram expressos em M/mg de proteína.

5.16 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) foram incubados no tampão carbonato de sódio (0,05 %, pH 10.2, 0.1 mM de EDTA) em banho-maria a 37 °C, antes da avaliação da atividade enzimática. A reação teve início pela adição de 20

μM de epinefrina (150 mM), em ácido acético (0.05 %). A absorbância foi lida a 480nm por 3 min em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de proteína requerida para inibir a auto-oxidação de $1\mu\text{mol}$ de epinefrina por minuto.

5.17 Avaliação da atividade enzimática da Catalase

A atividade da catalase foi monitorada de acordo com AEBI. O princípio do ensaio é baseado na determinação da constante k de decomposição de H_2O_2 , que nas nossas condições de temperatura e pH foi definido como 4.6×10^7 . Assim, 0,3M de H_2O_2 foi adicionado a amostra (80 μg de proteína), seguido de adição do tampão fosfato 50mM, pH 7.0 a 20°C, a absorção de decaimento foi monitorizada por 4 min a 240nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína (AEBI, 1984). Uma unidade de catalase foi definida como quantidade de proteína requerida para converter $1\mu\text{mol}$ de H_2O_2 em H_2O por minuto.

5.18 Avaliação da atividade enzimática Glutathione Peroxidase (GPx)

As amostras foram previamente preparadas, adicionando-se uma mistura de cianetos para inibir a atividade pseudo-peroxidase da hemoglobina, transformando-a em cianometaemoglobina. A atividade da glutathione peroxidase (GPx) foi monitorada pela diminuição de absorbância do NADPH a 340 nm, em um meio contendo: tampão fosfato (50mM) e EDTA (5mM), NADPH (0.28mM), Azida sódica (3.75mM), GSH (5mM) e Glutathione redutase (GR). A reação começou com 2.2mM de H_2O_2 . A absorbância foi registrada por um período de 3 minutos, a 37°C, em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA). O consumo de NADPH foi monitorado por aproximadamente 5 minutos, com os resultados expressos em U/mg de proteína. Uma unidade de GPx foi definida como quantidade de proteína requerida para oxidar $1\mu\text{mol}$ de NADPH por minuto (PAGLIA, 1967).

5.19 Avaliação da atividade enzimática da Glutathione-S-Transferase

A atividade da glutathione-S-transferase é diretamente proporcional a taxa de formação do composto DNP-SG (dinitro fenil S glutathione), podendo desta forma ser medida através do monitoramento da taxa de formação do composto. Em uma

cubeta de quartzo de 1 mL, adicionou-se a amostra (80µg de proteína) ao tampão fosfato (0.1M) e EDTA (1mM), amostra, GSH (1mM) e CDNB (1mM). A absorbância (340nm) foi registrada por um período de aproximadamente 3 min com controle da temperatura (30 °C), em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA). Os resultados foram expressos em U/mg proteína. Uma unidade de atividade enzimática da GST foi definida como a quantidade necessária para catalisar a formação de quanto 1µmol do composto DNP-SG por minuto. (HABIG; PABST; JAKOBY, 1974).

5.20 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). Em tampão 0,1M fosfato contendo 5mM de EDTA (pH 8.0) foi adicionado 100 µg do homogenato do fígado e o fluorescente ortoftaldeído (1µM), e então incubado a temperatura ambiente, por 15 minutos e lido em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA), utilizando os comprimentos de onda de 350nm de excitação e 420nm de emissão. Para determinar os níveis de GSSG, a amostra foi incubada com 0.04M de N-ethylmaleimide por 30 minutos, seguido da adição de tampão NaOH a 0.1M. Quando os preparos estavam prontos, seguindo os mesmos passos de GSH foi executado para determinar GSSG. O estado redox foi determinado pela relação GSH/GSSG (HISSIN e HILF, 1976).

5.21 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-bisfosfato, a terceira reação da via glicolítica. A atividade máxima da enzima será determinada segundo método descrito por Opie e Newsholme (1967) e Mansur (1963). O sistema de reação consistiu de Tris-HCl 50 mM pH8.0, MgCl₂ 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 foi realizadas a 25°C, por 10 min, a 340 nm em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA). Os resultados foram expressos como µmol/min/mg prot.

5.22 Determinação da glicose-6-fosfato desidrogenase

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) catalisa a primeira reação do *shunt* da hexose-monofosfato, a via das pentoses. A atividade máxima foi avaliada pelo método descrito por BERGMEYER *et al.* (1974). O sistema de reação enzimático continha Tris-HCl 86 mM, MgCl₂ 6.9 mM, NADPH + 0.4 mM, glicose-6-fosfato 1.2 mM, Triton X-100 0.05 % (v/v), pH 7.6. Foi adicionado ao sistema de reação, 0.08 mg de proteína total e o ensaio iniciado pela adição do substrato (glicose-6-fosfato). As determinações enzimáticas foram realizadas a 25°C, por 4 min, a 340 nm em um volume final de 0.25mL, em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA). Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot.

5.23 Determinação da atividade da β -hidroxyacil-CoA desidrogenase (β -HAD)

A atividade da β -HAD foi determinada segundo ITO (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 a um comprimento de onda de 340nm, volume final de 0.25mL. Preparou-se uma solução de Imidazol a 50 mM, depois um mix de reação (Imidazol 50mM + EDTA 12mM + NADH 0.18mM). Incubou-se por um minuto o mix de Reação com 0.08 mg proteína de cada amostra e colocou-se Acetoacetil-CoA 0.1mM para iniciar a reação e efetuou-se a leitura a 340nm de absorbância em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA). Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot.

5.24 Avaliação 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, a partir da quantificação do complexo formado entre a CoA liberada com o DTNB do meio (ALP, NEWSHOLME e ZAMMIT, 1976). O tampão de ensaio continha Tris-aminometano 50 mM, EDTA 1 mM, DTNB 0.2 mM, acetil-CoA 0.1 mM, oxaloacetato 0.5 mM e Triton X-100 0.05% (v/v), pH 8.1. 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 espectrofluorímetro modelo FLUOstar

Omega (BMG Labtech, USA). Como marcador de treinabilidade moderada também foi realizada a atividade da citrato sintase no músculo sóleo e no músculo EDL. Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot.}$

5.25 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média e erro padrão da média. Para comparação dos dados foi utilizado o teste de análise de variância ANOVA *Two Way* seguido do pos-teste de comparações múltiplas TUKEY. O nível de significância foi mantido em 5% ($p < 0.05$) para todas as análises. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism, versão 6.0 para Windows.

6 RESULTADOS

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO THE JOURNAL OF NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY

Fator de impacto 4,6 (Qualis - Nutrição: A1)

EFFECTS OF MODERATE PHYSICAL TRAINING ON THE HEPATIC METABOLISM OF MALNOURISHED JUVENILE RATS

Talitta Ricarly Lima^{1,2}; Cristiane de Moura Freitas^{1,3}; Reginaldo Correia da Silva Filho^{1,2}; Glauber Rudá Feitoza Braz^{1,3}; Cláudia Jacques Lagranha^{1,3*}; Mariana Pinheiro Fernandes^{1,2*}

¹Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry, Department of Physical Education and Sports Science, Federal University of Pernambuco-CAV, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil

² Nutrition, Physical activity and Phenotypic plasticity graduate program, Federal University of Pernambuco-CAV, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil

³ Biochemistry and Physiology graduate program, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

*The authors equally contributed to the manuscript.

Running title: Effects of moderate exercise in liver of malnourished 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

The authors declare that there is no conflict of interest.

Abstract

Protein restriction during critical periods of development may be associated with serious consequences for the functions of different organs and systems. The liver is an important organ for the metabolism of macromolecules, besides acting as initial sensor of nutrients. Despite the importance of this organ, little is known about the effects of moderate physical training on models of perinatal protein restriction in the hepatic metabolism. This study aims to evaluate the effects of moderate physical training on the mitochondrial bioenergetics and hepatic metabolism of juvenile rats submitted to protein restriction during critical periods of development. Pregnant Wistar rats received diets of Normoprotein (N, protein 17%) and Lowprotein (L, protein 8%) throughout pregnancy and lactation. After weaning, all groups received commercial chow until sacrifice at the 60th day. The offspring were submitted to the incremental aerobic run test from the 26th to the 28 days and subdivided into four groups according to their practice or not of physical training. The following experimental groups were established: Normoprotein Sedentary (NS); Normoprotein Trained (NT); Lowprotein Sedentary (LS); Lowprotein Trained (LT). At 30 days of life, the animals of NT and LT groups underwent a physical training program (60 min day/ 5 days and 4 weeks, and, at 50% VO₂max). At 60 days post-birth, the males were euthanized and their liver removed to evaluate the following: body and liver weight, serum albumin levels, metabolic enzymes activities (citrate synthase (CS), fosfofrutoquinase 1 (PFK), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (β -HAD)), mitochondrial oxygen consumption, mitochondrial swelling, reactive oxygen species (ROS) production, oxidative stress biomarkers (malondialdehyde-MDA, carbonyls, sulfhydryl-SH contents), antioxidant enzyme activities (superoxide dismutase-SOD, catalase-CAT, glutathione peroxidase-GPx and glutathione transferase-GST) and cellular redox state (reduced glutathione-GSH, oxidized glutathione-GSSG and GSH/GSSG ratio). Our results showed a reduction in both animal (15%, $p < 0.05$) and liver (22%, $p < 0.05$) weight in the LS group when compared to the NS group. Differences in albumin levels were not significant among the groups. There was a decrease in CS activity (28%, $p < 0.05$), no change in PFK1, a decrease in G6PDH activity (54%, $p < 0.001$) and an increase in β -HAD activity (211%, $p < 0.0001$) in the LS group compared to NS group. In relation

to mitochondrial bioenergetics, the LS group showed a decrease in mitochondrial oxygen consumption after ADP addition (State 3, 53%, $p<0.01$) and respiratory control ratio (RCR, 52%, $p<0.0001$), increase in mitochondrial swelling (40%, $p<0.001$) and ROS production (36%, $p<0.01$). There was an increase in lipid peroxidation (MDA-levels, 42%, $p<0.0001$), protein oxidation (81%, $p<0.0001$) and a decrease in SH-content (41%, $p<0.01$) in the LS group when compared to the NS group. The antioxidant enzymes activities SOD (33%, $p<0.0001$), CAT (48%, $p<0.0001$), GPx (49%, $p<0.001$) and GST (64%, $p<0.01$) were decreased in the LS group without altering the GSH levels. After moderate physical training, a significant improvement or reversal of the deleterious effects of perinatal protein restriction on hepatic metabolism was observed in the LT group. Our results suggest that physical exercise acted as a non-pharmacological therapeutic agent capable of minimizing the effects of a protein restriction in the early life of these animals.

Keywords: mitochondrial bioenergetics, exercise, lowprotein diet, liver

Introduction

Malnutrition continues to be a public health problem in the 21st century, affecting mainly the populations of underdeveloped countries where insufficient dietary intake for a chronic period has been pointed out as one of the main non-genetic factors involved in the etiology of chronic-degenerative diseases (FAO, 2015; WRITING GROUP *et al.*, 2016). Epidemiological evidence has shown that nutrient deficiency during critical periods of development may increase the risk of obesity and related diseases (hypertension, type II diabetes, dyslipidemia, hyperinsulinemia, heart disease and cancer) in adult life (TAPPIA e GABRIEL, 2006; BAROUKI *et al.*, 2012). Nutritional imbalance pre- and periconceptional and during early postnatal periods can cause repercussions on organs and systems, which may reflect negatively the short and long term, with irreparable impairment for their functions (LEANDRO *et al.*, 2007; WELLS, 2010).

The liver is an essential organ for metabolism performance and important for physiological processes such as detoxification, protein synthesis, glucose

homeostasis balance and the metabolism of various nutrients (GEBHARDT, 1992; GHAFORY *et al.*, 2013). Some studies have shown that consumption of a protein-restricted diet can cause structural changes in the liver. An increase in the size of the fetal lobes in the offspring of malnourished mothers (BURNS *et al.*, 1997), hepatic hypertrophy that may be related to alteration in the oxidative state, cell renewal and substrate utilization (SAMUELSSON *et al.*, 2008; SHANKAR *et al.*, 2010; HALL *et al.*, 2012) have been reported. Another experimental study with low protein diet reported increased oxidative stress in both male and female offspring, causing metabolic dysfunction (VEGA *et al.*, 2016). Methionine- and choline-deficient diets have been observed to increase ROS production and decrease antioxidant defenses in the liver (FREITAS *et al.*, 2016). A number of studies have indicated that damage from oxidative stress can lead to mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening, a phenomenon associated with several chronic-degenerative diseases, such as some types of cancer, Parkinson's, Alzheimer's, type II diabetes (KOWALTOWSKI *et al.*, 2009; FIGUEIRA *et al.*, 2013). Mitochondria are central organelles in the cell metabolism and have a major role in signaling pathways that may include regulating in the redox homeostasis and cell death processes (SERVIDDIO, BELLANTI, *et al.*, 2011; GONCALVES *et al.*, 2013).

Various modalities of exercise (aerobic and resistance) have been shown to have health benefits including reducing non-alcoholic fatty liver disease (CUTHBERTSON *et al.*, 2016; HASHIDA *et al.*, 2017). These kinds of exercise are also linked to antioxidant modulations, oxidative stress reduction, regulation of anti-apoptotic proteins, increased protective flux of autophagy and greater recycling of cellular components (GONCALVES *et al.*, 2013). Okudan *et al.* showed that exercise decreased oxidative stress parameters in the livers of young rats. The MDA levels tended to be lower and the SOD activity tended to increase after the exercise (OKUDAN e BELVIRANLI, 2016). Their study agrees with findings of Liu *et al.*, that showed a decrease in the carbonyl levels in liver tissue after chronic exercise, suggesting that exercise acts in defense against oxidative damage (LIU *et al.*, 2000).

Given the fact that the liver is an important organ for the metabolism of macromolecules, and acts as an initial sensor of nutrients, it is important to know about the effects of moderate physical training on models of perinatal protein restriction in the hepatic metabolism. Our study will enable a better understanding of

the metabolic bases, related to the effects of moderate physical training in a malnutrition model during critical periods of development (gestation and lactation).

Materials and Methods

Drugs and reagents

All drugs and reagents were purchased from Sigma-Andrich (St. Louis, Mo., USA) and Molecular Probes (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA).

Ethical standards

Experiments were carried out in accordance with the National Institute of Health guidelines for animal experimentation. They were approved by the Ethical Standards Committee of the Biological Science Center of the Federal University of Pernambuco (N° 23076.017809/2014-04).

Animals and Diet

Virgin female Wistar rats aged 80 - 90 days, weighing 180 ± 30 g, were obtained from the Centro Acadêmico de Vitória of the Federal University of Pernambuco. The animals were kept throughout the experiment in standard conditions of temperature of $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ and a light-dark cycle of 12/12 hours. The rats were mated in a ratio of 2 females to 1 male, with conception checked daily via the presence of vaginal spermatozoa. When pregnancy was detected, the pregnant rats were divided into two experimental groups according to their diet: Normoprotein (N, protein 17%) and Lowprotein (L, protein 8%) based on the American Institute of Nutrition (REEVES, NIELSEN e FAHEY, 1993; NASCIMENTO *et al.*, 2014). Both diets were provided *ad libitum* during pregnancy and lactation. On their first day of life, the number of suckling pups was adjusted to 8 pups per dam. At weaning (21 days of age), only the male rats were maintained in the study and began to receive a Presence® commercial herbage diet until the end of the study. From the 26th to the 28th days of life, all the animals were submitted to the maximum speed test, and then were further subdivided into four groups according to the practice or not of the physical training. The following experimental groups were obtained: Normoprotein Sedentary (NS); Normoprotein Trained (NT); Lowprotein Sedentary (LS); Lowprotein Trained (LT). The untrained animals were maintained in the same ambient as the trained animals,

for the same length of time. At 60 days of life, the four groups were euthanized, to performed the experiments.

Physical training program

Between days 26 to 28 after birth, the animals were submitted to an incremental aerobic run test until fatigue. The performance of the animals with velocity progression was evaluated at 3m/min every 3 minutes (BROOKS e WHITE, 1978; RODRIGUES *et al.*, 2007). Fatigue was defined as the point where the animals were not able to maintain the treadmill's pace for more than 10 seconds. 48 hours after this incremental test, the animals from trained and lowprotein trained groups underwent a moderate physical training program, on a treadmill (Ibramed, model KT-10100), using the following experimental protocol: 4 weeks, 5 days /and 60 min / day (BELLÓ-KEIN *et al.*, 2000; BRAZ *et al.*, 2015). The untrained group remained in their cages in the same environment that the trained animals.

Isolation of Liver Mitochondria and Experimental Conditions

Liver mitochondria were isolated using the differential centrifugation method modified from SCHNEIDER and HOGEBOM (1951) (SCHNEIDER e HOGEBOM, 1951). The liver was washed in solution containing 250 mM sucrose, 10 mM HEPES (pH 7.2) and EGTA 0.5 mM, chopped with scissors and homogenized in Potter-Elvehjem pestle and glass tube connected to a digital homogenizer IKA® (RW 20). The liver homogenate was centrifuged at 461g, at 4°C for 10 minutes. The supernatant was centrifuged at 4722 g, at 4°C for 10 minutes and the lipid phase removed followed by the pellet resuspension in 250 mM sucrose, 5 mM HEPES (pH 7.2) and 0.3 mM EGTA and centrifuged as previously. The mitochondrial fraction was resuspended in the same solution, without EGTA. The experiments with isolated mitochondria were performed at 28°C in a reaction medium containing 12 mM KCl, 4 mM HEPES, 5 mM K₂HPO₄, 1mM EGTA and 0.2% BSA. The respiratory substrate was a mixture of complex I substrates of the respiratory chain (2 mM malate, 1 mM pyruvate, 1 mM α - ketoglutarate and 1mM glutamate).

Protein Measurement tissue

Protein concentration was measured by the Bradford method (BRADFORD, 1976). 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) containing a closed glass chamber thermostatic (1 mL), equipped with magnetic stirrer. Experiments were performed in the presence of 200 μ M ADP, 1 μ g/mL oligomycin and 1 μ M CCCP (Carbonyl cyanide p-(Trifluoromethoxy) hydrazine) (ROBINSON e COOPER, 1970).

Mitochondrial Swelling

Mitochondrial swelling (1 mg/mL) was determined by the decrease in the turbidity of the mitochondrial suspension, in the presence of 10 μ M calcium, measured at 520 nm using a Biochrom Libra S12 Visible Spectrophotometer (Biochrom, USA). The absorbance was measured every 30 seconds during 5 minutes (VERCESI *et al.*, 1988). These experiments were also performed in the presence of 200 μ M EGTA or 1 μ M cyclosporine A (CsA).

Reactive Oxygen Species Production

The measurement of the reactive species was determined spectrofluorometrically using 5 μ M dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) under constant stirring. Fluorescence was determined on a FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA) spectrofluorimeter at 488 and 525 nm, excitation and emission, respectively (LEBEL, ISCHIROPOULOS e BONDY, 1992; GARCIA-RUIZ *et al.*, 1997). The results were expressed as fluorescence units (F.U.) of DCF.

Sample preparation for biochemistry analyses

After freezing, the rat livers were immersed in a cold buffer containing 50mM TRIS and 1mM EDTA, pH 7.4, with the addition of 1mM sodium orthovanadate and 200 μ g/mL phenylmethanesulfonyl fluoride. Then, they were homogenized with digital homogenizer IKA@ T10 (basic Ultra Turrax, Brazil). Homogenates were centrifuged at 1180 g for 10 min, at 4°C and the supernatant used for biochemical analyses after protein measurement.

Serum albumin, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate transaminase (AST) levels

Levels of albumin, ALT and AST were quantified by Lab Test® Colorimetric Kit using the serum of the animals as sample, following the specifications of the Kit.

Evaluation of Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

Lipid peroxidation evaluated TBARS levels as previously published by Buege and Aust (1978) (BUEGE e AUST, 1978). Samples (liver homogenate, 300 µg of protein) were sequentially mixed with 30% (w/v) Trichloroacetic acid (TCA) and a 10mM TRIS buffer, pH 7.4. This mixture was centrifuged at 1180 g for 10 min and the supernatant was boiled for 15 min with 0.73% (w/v) thiobarbituric acid. The pink pigment yielded was measured at 535nm absorption using a Biochrom Libra S12 Visible Spectrophotometer (Biochrom, USA) at RT and expressed as µM/mg protein.

Evaluation of protein oxidation

The protein oxidation was assessed using the procedures highlighted by Zanatta (2013) (ZANATTA *et al.*, 2013). With the samples (liver homogenate, 300µg of protein) on ice, 30% (w/v) TCA was added to the sample and then centrifuged for 14 min at 1180 g. The pellet was re-suspended in 10mM 2,4 dinitrophenylhydrazine and immediately incubated in a dark room for 1 h, centrifuged three times in an ethyl/acetate buffer and the final pellet re-suspended in 6M guanidine hydrochloride, with the absorbance read at 370nm (37°C) using a Biochrom Libra S12 Visible Spectrophotometer (Biochrom, USA). The results were expressed as µM/mg protein.

Evaluation sulfhydryl-SH content

Sulfhydryl group content was determined from the reaction with DTNB (5,5'-dithiobis (2 nitrobenzoic acid) .The aliquot of the homogenate (liver homogenate, 200 µg of 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 The absorbance reading (30°C) was done in a Biochrom Libra S12 Visible Spectrophotometer (Biochrom, USA) at 412 nm (ELLMAN, 1959). The results were expressed as M/mg protein.

Superoxide dismutase assay

Superoxide dismutase (SOD) activity was performed in accordance with the protocol developed by Misra and Fridovich (1972) (MISRA e FRIDOVICH, 1972). In brief, the

liver homogenate, 80µg of protein, was added to a 0.05M Carbonate buffer with 0.1mM EDTA, pH 10.2. The action was started with 150mM epinephrine and the SOD activity was determined by adrenaline auto-oxidation inhibition at 30 °C. The decrease in absorbance was monitored using a Biochrom Libra S12 Visible Spectrophotometer (Biochrom, USA) for 1.5 min, at 480 nm and the results expressed as U/mg protein. One unit of SOD was defined as the amount of protein required to inhibit the auto-oxidation of 1 µmol of epinephrine per minute.

Catalase assay

Catalase (CAT) activity was performed as previously described by Aebi (1984) (AEBI, 1984). Briefly, 0.3 M hydrogen peroxide and samples (liver homogenate, 80µg of protein) were added to a 50 mM phosphate buffer, pH 7.0 at 20 °C and the absorption decay was monitored using a Biochrom Libra S12 Visible Spectrophotometer (Biochrom, USA) for 3 min, at 240 nm and the results expressed as U/mg protein. One unit of CAT was defined as the amount of protein required to convert 1µmol of H₂O₂ to H₂O per minute.

Glutathione peroxidase assay

Glutathione peroxidase (GPx) activity was performed in accordance with Paglia and Valentine (1967) (PAGLIA, 1967). Briefly, samples (liver homogenate, 80µg of protein) were added to a 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, containing 5 mM EDTA; 0.28 mM NADPH; 3.75 mM sodium azide; 5 mM glutathione reduced (GSH) and glutathione reductase from Sigma (St. Louis, MO). The action was started with 2.2 mM H₂O₂. NADPH oxidation followed at 340 nm absorbance at 20°C in a spectrofluorimeter (FLUOstar Omega - BMG Labtech, USA) and its coefficient of extinction was used to determine the GPx activity. The results were expressed as U/mg protein [40]. One unit of GPx was defined as the amount of protein required to oxidize 1 µmol of NADPH per minute, based on its molecular absorbance.

GST assay

GST activity was measured as described previously by HABIG and JAKOBY (1974) (HABIG, PABST e JAKOBY, 1974). Samples (liver homogenate, 80µg of protein) were incubated in a 0.1 M phosphate buffer, pH 6.5 containing 1 mM EDTA at 30 °C and the assay started with the addition of 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and 1

mM GSH. The formation of 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione was monitored through the absorbance using a Biochrom Libra S12 Visible Spectrophotometer (Biochrom, USA) at 340 nm. One unit of enzymatic activity was defined as the amount of protein required to catalyze the formation of 1 mmol 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione per minute.

Glutathione levels

To assess GSH levels, the samples (100 µg of protein) were firstly diluted in a 0.1 M phosphate buffer containing 5 mM EDTA, pH 8.0. Then, an aliquot from the diluted sample was incubated with o-Phthaldialdehyde at room temperature for exactly 15 min. Fluorescence intensities were measured at 420 nm and excitation at 350 nm in a spectrofluorimeter (FLUOstar Omega - BMG Labtech, USA), and compared with a standard curve of known concentrations of GSH (0.25-10 nM) also incubated with OPT. To determine GSSG levels, the samples (liver homogenate, 80 µg of protein) were incubated with 0.04 M N-ethylmaleimide for 30 min in RT followed by addition of 0.1 M NaOH buffer. When this mixture was ready, the same steps of the GSH assay were followed to determine the GSSG levels. The Redox State was determined by the ratio of GSH/GSSG as previously described Hissin and Hilf (1976) (HISSIN e HILF, 1976).

Measurement of citrate synthase (CS) activity

CS is the first enzyme in the Krebs cycle and catalyzes the condensation of acetyl-CoA with oxaloacetate to form citrate. Enzymatic activity was determined as described previously by ALP et al. (1976) (ALP, NEWSHOLME e ZAMMIT, 1976). Briefly, the citrate synthase activity was evaluated in a reaction mixture containing (in mmol/L) 50 Tris HCl (pH 8.2), 1 mM EDTA, 0.2 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid), 0.1 mM acetyl-CoA, 0.5 oxaloacetate and 80 µg homogenate (muscle and liver). The citrate synthase activity was measured by assessing the rate of change in absorbance at 25°C, for 3 min (30-s intervals) at 412 nm in a spectrofluorimeter (FLUOstar Omega - BMG Labtech, USA). The results were expressed as µmol/min/mg prot.

Phosphofructokinase 1 (PFK1) assay

PFK1 is the enzyme that catalyzes the phosphorylation of fructose-6-phosphate generating fructose-1,6-bisphosphate, the third reaction of the glycolytic pathway. The maximum activity of the enzyme was determined according to the method described by OPIE & NEWSHOLME (1967) e MANSUR (1963) (MANSOUR, 1965; OPIE e NEWSHOLME, 1967). The reaction system consisted of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 1,0 mM EDTA, 5 mM mercaptoetanol, 13 mM NADH⁺, 20mM ATP, 10 mM AMP, 5 mM aldolase, 5 mM glucose-6-phosphate dehydrogenase and 5 mM triose-phosphate isomerase, to which the sample (liver homogenate, 80µg of protein) was added for a final volume of 0.25 mL. The assay was started by the addition of the substrate (1mM fructose-6-phosphate) and the enzymatic determinations were performed at 25°C for 10 min at 340nm in a spectrofluorimeter (FLUOstar Omega - BMG Labtech, USA). The results were expressed as µmol/min/mg prot.

Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) assay

G6PDH activity was measured as previously described by GLOCK and MCLEAN. (1953) (GLOCK e MC, 1953). The continuous enzyme reaction system used 30 mM Tris-HCl, 6.9 mM MgCl₂, 0.4 mM NADP⁺, 1.2 mM glucose-6-phosphate, 0.05% (v /v) Triton X-100, pH 7.6. The reaction was started with addition of the substrate (glucose-6-phosphate) and NADP⁺, (liver homogenate, 80µg of protein). The enzymatic determinations were performed at 25° C for 4 min at 340 nm for a final volume of 0.25 mL in a spectrofluorimeter (FLUOstar Omega - BMG Labtech, USA). The results were expressed as µmol/min/mg prot.

β-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (β-HAD) assay

The activity of β-HAD was determined according to ITO et al. (2010) (ITO *et al.*, 2010). This enzyme, with 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 (FLUOstar Omega - BMG Labtech, USA) at a wavelength of 340nm, final volume of 0.25mL. 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 at 30°C with liver homogenate, 80 µg of protein from each sample. Acetoacetyl CoA (0.1mM) was placed to initiate the reaction. β-HAD was measured at 340 nm by following the

disappearance of NADH ($\epsilon = 6.22 \mu\text{mol.mL}^{-1}\text{.cm}^{-1}$). The results were expressed as $\mu\text{mol/min/mg prot.}$

Statistics

All values are expressed as means $\pm$ SEM. Two-way ANOVA variance analysis was used to compare the data, followed by the TUKEY multiple-comparison post-test. The level of significance was maintained at 5% ($p < 0.05$) for all analyzes. Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism, version 6.0® (GraphPad Software, Inc).

Results

Effects of physical training program on body and liver weight of rats submitted to perinatal protein restriction

We verified a decrease on the weight of male rats at 60 days for the lowprotein sedentary group (LP) when compared to the sedentary normoprotein group (NS). There were no significant differences in body weight between the lowprotein sedentary (LS) group and the lowprotein trained (LT) group, and the normoprotein sedentary (NS) with the normoprotein trained (NT) group. Also no difference was observed between NT and LT (Table 1).

The same was observed in the liver weight of the animals, only the NS group when compared to the LS group showed a significant decrease. There were no significant differences in liver weight when the groups were compared (Table 1).

Effect of moderate physical training on the serum albumin, ALT and AST levels of rats submitted to perinatal protein restriction

We did not observe a significant difference on albumin levels among the analyzed groups. However, ALT and AST levels showed a decrease in LP when compared to NP group. These levels were normalized after exercise in LT group (Table 1).

Effect of moderate physical training on citrate synthase (CS) muscle activity of rats submitted to perinatal protein restriction

Evaluation of the enzyme CS activity was also performed on the soleus and EDL muscles of the animals, in order to evaluate the trainability of the animals with the used physical training protocol. The soleus muscle showed a decrease in CS activity in the LS group when compared to the NS group (NS=35.79±3.58 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6 vs LS=24.89±5.58 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6, $p<0.05$). However, the training protocol used significantly increased the enzyme activity in the other experimental groups (LS=24.89±5.58 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6 vs LT=46.53±3.41 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6, $p<0.001$; NS=35.79±3.58 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6 vs NT=60.29±10.85 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=5, $p<0.0001$) (Figure 1A).

The EDL muscle did not show a significant difference for CS activity between the NS and LS groups (NS=24.42±4.26 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6 vs LS=20.91±4.90 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6, $p=0.072$). An increase in CS activity after the protocol training was observed (LS=20.91±4.90 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6 vs LT=45.49±9.96 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=5, $p<0.0001$; NS=24.42±4.26 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6 vs NT=41.61±4.62 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6, $p<0.001$) (Figure 1B).

Effect of moderate physical training on metabolic enzymes activity of rat liver submitted to perinatal protein restriction

We did not observe a significant difference on phosphofructokinase 1 (PFK1) activity between NS and LS (NS=0.05±0.01 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6 vs LS=0.03±0.01 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6, $p=0.53$) or NT with LT (NT=0.10±0.02 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6 vs LT=0.12±0.01 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6, $p=0.06$). However, the groups that passed through the training period showed an increase in PFK1 activity with a significant difference when compared to their respective sedentary groups (NS=0.05±0.01 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6 vs NT=0.10±0.02 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6, $p<0.001$; LS=0.03±0.01 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6 vs LT=0.12±0.01 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6, $p<0.0001$) (Figure 2A).

We found a significant decrease on Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) between the NS and LS groups (NS=1.30±0.20 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6 vs LS=0.59±0.20 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=9, $p<0.001$), and between NT e LT (NT=2.96±0.39 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6 vs LT=1.87±0.30 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=9, $p<0.0001$). After training, a significant increase was observed when the sedentary groups were compared to the trained groups (NS=1.30±0.20 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6

vs NT=2.96±0.39 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6, $p<0.0001$; LS=0.58±0.20 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=9 vs LT=1.87±0.30 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=9, $p<0.001$) (Figure 2B).

We observed a significant increase in β -HAD activity in the LS animals when compared to the NS group (NS=3.47±1.03 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6 vs LS=10.87±1.42 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=7, $p<0.0001$). There was also a comparative increase between the NS and NT groups (NS=3.47±1.03 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6 vs NT=6.50±0.60 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6, $p<0.001$) and NT vs LT (NT=6.50±0.60 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=6 vs LT=8.09±0.98 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=9, $p<0.05$). When compared to the LS and LT groups, a significant decrease of β -HAD activity was found (LS=10.87±1.42 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=7 vs LT=8.09±0.98 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=9, $p<0.001$) (Figure 2C).

The CS activity evaluated in the hepatic tissue showed a significant decrease in the LS group when compared to the NS group; physical training, however, reversed this effect (NS=6.92±0.92 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=11 vs LS=4.39±1.39 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=5, $p<0.001$; LS=4.39±1.39 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=5 vs LT=12.26±0.89 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=9, $p<0.0001$; NS=6.92±0.92 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=11 vs NT=12.26±0.89 $\mu\text{mol/min/mg prot.}$, n=9, $p<0.0001$) (Figure 2D).

Effect of moderate physical training on mitochondrial oxygen consumption of rat liver submitted to perinatal protein restriction

Evaluation of oxygen consumption in isolated mitochondria showed that basal respiration (state 2) did not present significant a difference among the groups: NS=4.55±0.88 nmol O₂/min/mg prot., n=5 vs LS=3.88±1.04 nmol O₂/min/mg prot., n=6, $p=0.71$; LS=3.88±1.04 nmol O₂/min/mg prot., n=6 vs LT=4.09±0.90 nmol O₂/min/mg prot., n=6, $p=0.98$; NS=4.55±0.88 nmol O₂/min/mg prot., n=5 vs NT=5.44±1.22 nmol O₂/min/mg prot., n=7, $p=0.48$; NT=5.44±1.22 nmol O₂/min/mg prot., n=7 vs LT=4.09±0.90 nmol O₂/min/mg prot., n=6, $p=0.12$ (Figure 3A).

The mitochondrial phosphorylation capacity, when mitochondria were stimulated with ADP (state 3), showed a significant reduction on the LS group when compared with the NS group (NS=26.05±6.32 nmol O₂/min/mg prot., n=5 vs LS=11.98±4.06 nmol O₂/min/mg prot., n=6, $p=0.003$). After training the LT group showed an increase in phosphorylation capacity when compared to LS (LS=11.98±4.06 nmol O₂/min/mg

prot., n=6 vs LT=21.70±5.57 nmol O₂/min/mg prot., n=6, $p<0.05$). No significant difference was observed between the other groups (NS=26.05±6.32 nmol O₂/min/mg prot., n=5 vs NT=30.19±6.89 nmol O₂/min/mg prot., n=7, $p=0.62$; NT=30.19±6.89 nmol O₂/min/mg prot., n=7 vs LT=21.70±5.57 nmol O₂/min/mg prot., n=6, $p=0.07$) (Figure 3B).

Evaluation of respiration rate in the resting state (state 4), in the presence of oligomycin (inhibitor of ATP-sintase), did not show a significant difference between the analyzed groups (NS=3.46±0.43 nmolO₂/min/mg prot., n=5 vs LS=3.41±1.20 nmolO₂/min/mg prot., n=6, $p=0.99$; HS=3.41±1.20 nmolO₂/min/mg prot., n=6 vs LT=3.31±0.79 nmolO₂/min/mg prot., n=6, $p=0.99$; NS=3.46±0.43 nmolO₂/min/mg prot., n=5 vs NT=4.52±0.94 nmolO₂/min/mg prot., n=7, $p=0.22$; NT=4.52±0.94 nmolO₂/min/mg prot., n=7 vs LT=3.31±0.79 nmolO₂/min/mg prot., n=6, $p=0.11$) (Figure 3C).

In the presence of the carbonyl cyanide p-(Trifluoromethoxy) hydrazone (CCCP) protonophore, the rate evaluation in the uncoupling state showed no difference between the groups: NS=16.21±8.27 nmol O₂/min/mg prot., n=5 vs LS=11.85±2.10 nmol O₂/min/mg prot., n=6, $p=0.56$ and LS=11.85±2.10 nmol O₂/min/mg prot., n=6 vs LT=8.84±1.92 nmol O₂/min/mg prot., n=6, $p=0.77$. However, an increased rate was observed in the NT group when compared to the NS group (NS=16.21±8.27 nmol O₂/min/mg prot., n=5 vs NT=27.41±6.90 nmol O₂/min/mg prot., n=7, $p=0.01$) and a decrease between the NT and LT groups (NT=27.41±6.90 nmol O₂/min/mg prot., n=7 vs LT=8.84±1.92 nmol O₂/min/mg prot., n=6, $p=0.0001$) (Figure 3D).

Respiratory control (ratio of state 3 / state 4) in the liver mitochondria showed a significant decrease in animals LS (NS=7.50±1.37, n=5 vs LS=3.61±1.16, n=6, $p<0.0001$). No significant difference was observed between the LS and LT groups, with an increase on the RCR of the malnourished animals after the training protocol (LS=3.61±1.16, n=6 vs LT=6.56±0.78, n=6, $p<0.001$). However, no significant difference was observed (Figure 3E) in the other groups.

Effect of moderate physical training on the mitochondrial swelling of rat liver submitted to perinatal protein restriction

Our experiments of mitochondrial swelling revealed that the LS group showed a greater swelling (visualized by absorbance decreasing) in the presence of Ca^{2+} ion (10 μM) when compared with the NS (NS=2.03 $\pm$ 0.80, n=6 vs LS=1.29 $\pm$ 0.44, n=6, $p=0.0001$). This result was also observed, after the training, between the NT and LT groups (NT=6.851 $\pm$ 0.44, n=6 vs LT=5.76 $\pm$ 0.89, n=8, $p=0.0001$). However, in the LS vs LT groups, we observed a indecrease in mitochondrial swelling after the training (LS=1.29 $\pm$ 0.44, n=6 vs LT=5.76 $\pm$ 0.89, n=8, $p=0.0389$) (Figure 4A).

In presence of the EGTA (200 μM), chelator of ion Ca^{2+} , or Cyclosporine A (CsA, 1 μM), a classical inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore, no group showed mitochondrial swelling (Figures 4B and 4C).

Effect of moderate physical training on the ROS production of rat liver submitted to perinatal protein restriction

Evaluation of mitochondrial ROS production showed an increase in the LS group when compared to NS group (NS=13.35 $\pm$ 3.14 F.U., n=6 vs LS=18.26 $\pm$ 2.08 F.U., n=6, $p=0.007$). Between the NS and NT groups, we also observed an increase in ROS production (NS=13.35 $\pm$ 3.14 F.U., n=6 vs NT=19.12 $\pm$ 1.35 F.U., n=7, $p=0.001$). When the NT and LT groups were compared, a significant reduction in the production of reactive species was observed in malnourished animals submitted to the training protocol (NT=19.12 $\pm$ 1.35 F.U., n=7 vs LT=13.65 $\pm$ 2.49 F.U., n=5, $p=0.003$). This result also was observed in the comparison between LS and LT groups (LS=18.26 $\pm$ 2.08 F.U., n=6 vs LT=13.65 $\pm$ 2.49 F.U., n=5, $p=0.017$) (Figure 5A).

In presence of EGTA, no difference among the experimental groups was verified, which indicates the participation of the Ca^{2+} in the increase of ROS production (Figure 5B).

Effect of moderate physical training on oxidative stress biomarkers of rat liver submitted to perinatal protein restriction

The results showed that perinatal protein restriction caused a significant increase on the TBARS levels, as can be observed between NS and LS groups (NS=9.84 $\pm$ 1.53 $\mu\text{M}/\text{mg prot.}$, n=10 vs LS=14.05 $\pm$ 1.59 $\mu\text{M}/\text{mg prot.}$, n=6, $p<0.0001$). When the LS vs LT and LS vs NT groups were compared, a significant decrease in lipid peroxidation was observed in trained animals (LS=14.05 $\pm$ 1.59 $\mu\text{M}/\text{mg prot.}$, n=6 vs LT=5.93 $\pm$ 1.25

$\mu\text{M}/\text{mg prot.}$, $n=8$, $p<0.0001$; $\text{NS}=9.84\pm1.53 \mu\text{M}/\text{mg prot.}$, $n=10$ vs $\text{NT}=4.07\pm1.76 \mu\text{M}/\text{mg prot.}$, $n=9$, $p<0.0001$) (Figure 6A).

The evaluation of protein oxidation showed a significant increase in the animals submitted to the nutritional insult, as can be observed between the NS and LS groups ($\text{NS}=9.12\pm0.77 \mu\text{M}/\text{mg prot.}$, $n=10$ vs $\text{LS}=16.51\pm1.49 \mu\text{M}/\text{mg prot.}$, $n=6$, $p<0.0001$). After training, a significant decrease was observed when these were compared to sedentary groups with trained groups ($\text{LS}=16.51\pm1.49 \mu\text{M}/\text{mg prot.}$, $n=6$ vs $\text{LT}=9.52\pm0.95 \mu\text{M}/\text{mg prot.}$, $n=9$, $p<0.0001$; $\text{NS}=9.12\pm0.77 \mu\text{M}/\text{mg prot.}$, $n=10$ vs $\text{NT}=7.17\pm0.84 \mu\text{M}/\text{mg prot.}$, $n=9$, $p=0.001$) (Figure 6B).

We observed decrease in the total SH content when groups NS and LS were compared ($\text{NS}=0.012\pm0.002 \text{ M}/\text{mg prot.}$, $n=8$ vs $\text{LS}=0.007\pm0.001 \text{ M}/\text{mg prot.}$, $n=6$, $p=0.003$). After training, a significant increase was observed when compared with the LS and LT groups ($\text{LS}=0.007\pm0.001 \text{ M}/\text{mg prot.}$, $n=6$ vs $\text{LT}=0.014\pm0.002 \text{ M}/\text{mg de prot.}$, $n=8$, $p<0.0001$). No significant difference was found in the NS and NT groups ($\text{NS}=0.012\pm0.002 \text{ M}/\text{mg prot.}$, $n=8$ vs $\text{NT}=0.011\pm0.001 \text{ M}/\text{mg prot.}$, $n=8$, $p=0.962$) (Figure 6C).

Effect of moderate physical training on enzymatic antioxidant defense of rat liver submitted to perinatal protein restriction

Evaluating the enzymatic antioxidant system, we observed a decrease in the SOD activity of the LS group when compared to the NS group ($\text{NS}=2.54\pm0.27 \text{ U}/\text{mg prot.}$, $n=12$ vs $\text{LS}=1.68\pm0.30 \text{ U}/\text{mg prot.}$, $n=6$, $p<0.0001$). After training, a significant increase was observed when the sedentary group was compared with the trained groups ($\text{LS}=1.68\pm0.30 \text{ U}/\text{mg prot.}$, $n=6$ vs $\text{LT}=3.18\pm0.16 \text{ U}/\text{mg prot.}$, $n=9$, $p<0.0001$; $\text{NS}=2.54\pm0.27 \text{ U}/\text{mg prot.}$, $n=12$ vs $\text{NT}=3.82\pm0.46 \text{ U}/\text{mg prot.}$, $n=9$, $p<0.0001$) (Figure 7A).

In relation to CAT activity, a decrease on the LS group was also observed when compared to the NS group ($\text{NS}=17.98\pm1.95 \text{ U}/\text{mg prot.}$, $n=12$ vs $\text{LS}=9.34\pm2.67 \text{ U}/\text{mg prot.}$, $n=6$, $p<0.0001$). After training, a significant increase was observed when the sedentary group was compared with the trained groups ($\text{LS}=9.34\pm2.67 \text{ U}/\text{mg prot.}$, $n=6$ vs $\text{LT}=23.24\pm1.41 \text{ U}/\text{mg prot.}$, $n=9$, $p<0.0001$; $\text{NS}=17.98\pm1.95 \text{ U}/\text{mg prot.}$, $n=12$ vs $\text{NT}=31.55\pm4.27 \text{ U}/\text{mg prot.}$, $n=9$, $p<0.0001$) (Figure 7B).

The GPx activity also showed a significant reduction in the LS group when compared to the NS group (NS=23.07±1.82 U/mg prot., n=6 vs LS=11.55±4.93 U/mg prot., n=6, $p=0.0009$). After training, a significant increase was observed when the sedentary group was compared with the trained groups (LS=11.55±4.93 U/mg prot., n=6 vs LT=29.05±2.98 U/mg prot., n=6, $p<0.0001$; NS=23.07±1.82 U/mg prot., n=6 vs NT=37.76±5.08 U/mg prot., n=6, $p<0.0001$) (Figure 7C).

GST activity also decreased as a consequence of the perinatal protein restriction (NS=5.76±1.66 U/mg prot., n=12 vs LS=2.06±0.52 U/mg prot., n=6, $p=0.006$). After training, a significant increase was observed when the sedentary groups were compared with the trained groups (LS=2.06±0.52 U/mg prot., n=6 vs LT=9.33±1.85 U/mg prot., n=9, $p<0.0001$; NS=5.76±1.66 U/mg prot., n=12 vs NT=15.49±2.58 U/mg prot., n=9, $p<0.0001$) (Figure 7D).

Effect of moderate physical training on non-enzymatic antioxidant system of rat liver submitted to perinatal protein restriction

Evaluating the cellular redox status of the animals, we observed a significant decrease in reduced glutathione levels (GSH) between NS and LS groups (NS=907.35±103.85 µmol/mol prot., n=11 vs LS=756.86±54.35 µmol/mol prot., n=6, $p=0.04$). After training, the LT group showed an increase in GSH levels compared with the LS (LS=756.86±54.35 µmol/mol prot., n=6 vs LT=928.96±77.46 µmol/mol prot., n=6, $p=0.04$) (Figure 7E).

The oxidate glutathione levels (GSSG) showed no difference between the NS and LS groups (NS=74.92±10.3 µmol/mol prot, n=11 vs LS=81.82±7.3 µmol/mol prot, n=6, $p=0.455$). After training, a significant decrease was observed when the sedentary group was compared with the trained groups (LS=81.82±7.3 µmol/mol prot, n=6 vs LT=60.25± 7.46 µmol/mol prot, n=6, $p<0.01$; NS=74.91±10.3 µmol/mol prot, n=11 vs NT=38.55±9.6 µmol/mol prot, n=8, $p<0.0001$) (Figure 7F).

Evaluating the GSH/GSSG ratio, we found no significant difference between the NS and LS groups (NS=12.32±0.93, n=12 vs LS=9.29±0.83, n=6, $p=0.061$). After training, a significant increase was observed when the sedentary group was compared with the trained groups (LS=9.29±0.83, n=6 vs LT=16.25±1.48, n=9, $p<0.0001$; NS=12.32±0.93, n=12 vs NT=25.55±3.66, n=9, $p<0.0001$) (Figure 7G).

Discussion

We investigated the effects of a physical training protocol on juvenile rats and evaluated several parameters of mitochondrial function, oxidative stress and metabolic enzymes in the liver of offspring after nutritional insult during critical periods of development. Severe malnutrition as well as overfeeding is associated with a high risk of metabolic disturbances, hepatic steatosis and mitochondrial changes (VAN ZUTPHEN *et al.*, 2016). There is an association between malnutrition and reduction in maternal deposits, commitment of fetal-placental flow rate and cell division in different tissues and organs, that may cause deleterious effects on the formation and development of the fetus and offspring (REBELATO *et al.*, 2013; MORAES *et al.*, 2014), resulting in lower birth weight and organ weight (i.e. liver) which may persist into adulthood.

Data about the effects of exercise on hepatic metabolism are controversial due to the range of protocols adopted in the literature. These vary in relation to the types of exercises, duration, intensity, time of application, age of the study group and the different types of nutritional insults although studies have already observed that physical exercise contributes to the control of weight gain in animals with protein restriction (LEANDRO *et al.*, 2012), and that both treadmill training and voluntary physical activity promote mitochondrial biogenesis and hepatocyte renewal (SANTOS-ALVES *et al.*, 2015). Thus, exercise can positively modulate oxidative stress and the renewal of cellular components (GONCALVES *et al.*, 2013).

The literature has been showed the citrate synthase (CS) activity as marker of cellular oxidative capacity. This enzyme is highly adaptable to aerobic training (BLOMSTRAND, RADEGRAN e SALTIN, 1997; DYCK *et al.*, 2000; LARSEN *et al.*, 2012). Our findings showed an increase in CS activity on the soleus and EDL muscles in training groups, compared to the CS activities of sedentary groups, suggesting more activity in the Krebs cycle after the training protocol demonstrating the effectiveness of our aerobic treadmill training.

The evaluation of the effects of a perinatal protein restriction on the metabolic key pathways of the macromolecules as glycolysis, pentose phosphate, β -oxidation and Krebs cycle showed no difference in glucose catabolism, but a decrease in pentose phosphate pathway, an increase in fatty acids catabolism and a decrease in Krebs

cycle activity. These results together suggests that animals submitted to protein restriction during critical periods of development tend to save glucose and degrade lipids as energetic substrate to preserve organs that mainly use glucose as source of energy. Other studies have observed that a protein restriction diet seems to be responsible for altering glucose metabolism and causes changes in liver fatty acid transport (MARTIN *et al.*, 2004; QASEM *et al.*, 2015). However, after a physical exercise protocol Linden *et al.*, showed mitochondrial function improved, increase in palmitate oxidation and CS activity (LINDEN *et al.*, 2015).

The CS enzyme is directly related to mitochondrial metabolism (CHEN *et al.*, 2015) and its lower activity in LS group can explain the RCR decrease and mitochondrial dysfunction in these animals. Besides this, a β -HAD increase associated with lower CS activity may lead to an accumulation of acetyl-CoA, which may increase the production of lipids or the formation of ketone bodies. Studies have reported that poor maternal nutrition is associated with increased visceral fat mass and obesity in later life (BUDGE *et al.*, 2005; SILVESTRE *et al.*, 2014). Other studies have revealed that chronic exercise reduces intrahepatic fat (JOHNSON *et al.*, 2009; VAN DER HEIJDEN *et al.*, 2010).

The animals that were submitted to the training protocol, however, showed a significant increase in PFK 1 activity, indicating greater activity of the glycolytic pathway. In addition, studies have demonstrated the effects of the exercise on glucose uptake through independent mechanisms of insulin by acting on expression and translocation of GLUT4 (KAPRAVELOU *et al.*, 2015; GURLEY, GRIESEL e OLSON, 2016). This may lead also to an increase of acetyl-CoA, a substrate of the Krebs cycle.

The evaluation of the phosphate pentoses pathway showed a G6PDH activity increase after the exercise, that resulted in more NADPH production, improving the cellular redox state and activity of antioxidant enzymes as GPx. CS also increased after the exercise, suggesting improvement in the oxidative metabolism of these malnourished animals.

We demonstrated in this study that a maternal low protein diet during the early stages of development caused mitochondrial dysfunction, associated with increased ROS production and an increase in oxidative stress biomarkers such as MDA and

carbonyls in rat liver. Previous studies using the same experimental model of protein restriction found similar results with an increased ROS production, a decrease in mitochondrial respiration capacity and an increase in oxidative stress biomarkers in the heart (NASCIMENTO *et al.*, 2014) and brainstem (FERREIRA, D. J. *et al.*, 2016; VEGA *et al.*, 2016) can lead to the initiation and progression of several metabolic alterations and diseases, such as disruptions in insulin signaling (PARK *et al.*, 2003) and hypertension (DE BRITO ALVES *et al.*, 2014).

Mitochondrial swelling is an important indicator of cell death when associated to mitochondrial permeability transition pore opening (MPTP) (KOWALTOWSKI, CASTILHO e VERCESI, 1996; 2001). The MPTP is associated to the onset and progression of several pathologies such as diabetes, some types of cancer, Alzheimer's and other neurodegenerative diseases (BERRIDGE, 2010; SUPNET e BEZPROZVANNY, 2010; RASHEED, TABASSUM e PARVEZ, 2017). Mitochondria from animal of LS group presented MPTP analyzed by increase in mitochondrial swelling and ROS production. The effects of mitochondrial swelling and the production of ROS were prevented when the experiments were carried out in the presence of the drug cyclosporin A, which acts as a classic inhibitor of the pore and EGTA, a Ca²⁺ chelator.

Our results showed that the malnourished animals submitted to the training protocol improved their mitochondrial bioenergetics, visualized by RCR increase e greater mitochondrial coupling, besides preventing the mitochondrial permeability transition pore.

Studies in response to physical training intervention showed beneficial effects on oxidative stress markers (KAKARLA, VADLURI e REDDY KESIREDDY, 2005; SANTOS *et al.*, 2015). Our results support the idea that perinatal lowprotein diet increases oxidant formation and induces oxidative stress associated with lower antioxidant enzymes activities such as SOD, CAT, GPx and GST and also increases ROS production. GST is an enzyme responsible for catalyzing the conjugation of GSH, via a sulfhydryl group, detoxifying endogenous compounds (SUN *et al.*, 2010). Our results agree with a work that found a decrease in SOD activity in the study of the hippocampus and cerebellum of young rats that suffered protein restriction (8% casein) compared with a normal diet (BONATTO *et al.*, 2005; BONATTO *et al.*, 2006).

Other study in isolated mitochondria showed that moderate training produces changes in liver metabolism, an increase in the GSH/GSSG ratio and MnSOD activity and promotes a decrease in MDA levels (LIMA *et al.*, 2013).

Glutathione is a major endogenous antioxidant that is synthesized using glutamate, cysteine, and glycine, providing protection from oxidative stress-induced damage by reduction of ROS production. GSH is an important intracellular non-enzymatic antioxidant that minimizes ROS formation and oxidative stress process. It is involved in cell protection and acts as a cofactor of GPx and in reactions that generate oxidized glutathione (GSSG) (POMPELLA *et al.*, 2003). Our model showed decreased GSH levels in the LS group. Some studies suggest that increased lipid peroxidation is a consequence of depleted GSH stores (CHADHA, BHALLA e DHAWAN, 2008). Negative effects in both enzymatic and non-enzymatic oxidant systems resulting from protein restriction were attenuated by physical training of young rats. The GSH levels increase after exercise, suggesting improvement in antioxidant defenses (KAKARLA, VADLURI e REDDY KESIREDDY, 2005; LIMA *et al.*, 2013).

All together, we observed that after the moderate physical training in treadmill was observed a significant improvement or reversal of the deleterious effects of perinatal protein restriction on hepatic metabolism in trained animals. Our results suggest that the physical training acted as a non-pharmacological therapeutic agent capable of minimize the detrimental effects of a protein restriction in the early life of these juvenile animals.

Acknowledgments

The acquisition of the reagents used in this work was supported by the financial support from the Foundation to Support Science and Research from Pernambuco State —Brazil (FACEPE) and National Council for Scientific and Technological Development – Brazil (CNPq) for the support (APQ n° 0765-4.05/10 and CNPq n° 449521/2014-1). We are also grateful to FACEPE, CNPq and CAPES, which provided scholar ships for TRL, CMF, RCSF and GRFB.

Referencias

- [1] FAO, *The State of Food Insecurity in the World 2015. Meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress*. 2015.
- [2] Writing Group, M., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation, 2016. 133(4): p. e38-360.
- [3] Tappia, P.S. and C.A. Gabriel, *Role of nutrition in the development of the fetal cardiovascular system*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2006. 4(2): p. 211-25.
- [4] Barouki, R., et al., *Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health*. Environ Health, 2012. 11: p. 42.
- [5] Leandro, C.G., et al., *A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption*. J Strength Cond Res, 2007. 21(3): p. 751-6.
- [6] Wells, J.C., *Maternal capital and the metabolic ghetto: An evolutionary perspective on the transgenerational basis of health inequalities*. Am J Hum Biol, 2010. 22(1): p. 1-17.
- [7] Gebhardt, R., *Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function*. Pharmacol Ther, 1992. 53(3): p. 275-354.
- [8] Ghafoory, S., et al., *Zonation of nitrogen and glucose metabolism gene expression upon acute liver damage in mouse*. PLoS One, 2013. 8(10): p. e78262.
- [9] Burns, S.P., et al., *Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation*. J Clin Invest, 1997. 100(7): p. 1768-74.
- [10] Hall, A.P., et al., *Liver hypertrophy: a review of adaptive (adverse and non-adverse) changes--conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop*. Toxicol Pathol, 2012. 40(7): p. 971-94.
- [11] Shankar, K., et al., *Maternal overweight programs insulin and adiponectin signaling in the offspring*. Endocrinology, 2010. 151(6): p. 2577-89.
- [12] Samuelsson, A.M., et al., *Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming*. Hypertension, 2008. 51(2): p. 383-92.
- [13] 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, 2016. 594(5): p. 1483-99.
- [14] 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, 2016. 2016: p. 9307064.
- [15] Figueira, T.R., et al., *Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health*. Antioxid Redox Signal, 2013. 18(16): p. 2029-74.
- [16] Kowaltowski, A.J., et al., *Mitochondria and reactive oxygen species*. Free Radic Biol Med, 2009. 47(4): p. 333-43.
- [17] Goncalves, I.O., et al., *Exercise as a therapeutic tool to prevent mitochondrial degeneration in nonalcoholic steatohepatitis*. Eur J Clin Invest, 2013. 43(11): p. 1184-94.
- [18] Serviddio, G., et al., *Mitochondrial dysfunction in nonalcoholic steatohepatitis*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2011. 5(2): p. 233-44.
- [19] Hashida, R., et al., *Aerobic vs. resistance exercise in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review*. J Hepatol, 2017. 66(1): p. 142-152.

- [20] Cuthbertson, D.J., et al., *Dissociation between exercise-induced reduction in liver fat and changes in hepatic and peripheral glucose homeostasis in obese patients with non-alcoholic fatty liver disease*. Clin Sci (Lond), 2016. 130(2): p. 93-104.
- [21] Okudan, N. and M. Belviranli, *Effects of exercise training on hepatic oxidative stress and antioxidant status in aged rats*. Arch Physiol Biochem, 2016. 122(4): p. 180-185.
- [22] Liu, J., et al., *Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants*. J Appl Physiol (1985), 2000. 89(1): p. 21-8.
- [23] Reeves, P.G., F.H. Nielsen, and G.C. Fahey, 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, 1993. 123(11): p. 1939-51.
- [24] Nascimento, L., et al., *The effect of maternal low-protein diet on the heart of adult offspring: role of mitochondria and oxidative stress*. Appl Physiol Nutr Metab, 2014. 39(8): p. 880-7.
- [25] Rodrigues, B., et al., *Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats*. Cardiovasc Diabetol, 2007. 6: p. 38.
- [26] Brooks, G.A. and T.P. White, *Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise*. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1978. 45(6): p. 1009-15.
- [27] Braz, G.R., et al., *Effect of moderate exercise on peritoneal neutrophils from juvenile rats*. Appl Physiol Nutr Metab, 2015. 40(9): p. 959-62.
- [28] Belló-Kein, A., et al., *Submaximal exercise training in postnatal rats: Hemodynamic and oxidative stress changes*. Exp. Clin. Cardiol, 2000. Vol 5: p. 149-153.
- [29] Schneider, W.C. and G.H. Hogeboom, *Cytochemical studies of mammalian tissues; the isolation of cell components by differential centrifugation: a review*. Cancer Res, 1951. 11(1): p. 1-22.
- [30] Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. 72: p. 248-54.
- [31] Robinson, J. and J.M. Cooper, *Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode*. Anal Biochem, 1970. 33(2): p. 390-9.
- [32] Vercesi, A.E., et al., *Ca²⁺-dependent NAD(P)⁺-induced alterations of rat liver and hepatoma mitochondrial membrane permeability*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. 154(3): p. 934-41.
- [33] LeBel, C.P., H. Ischiropoulos, and S.C. Bondy, *Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress*. Chem Res Toxicol, 1992. 5(2): p. 227-31.
- [34] 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, 1997. 272(17): p. 11369-77.
- [35] Buege, J.A. and S.D. Aust, *Microsomal lipid peroxidation*. Methods Enzymol, 1978. 52: p. 302-10.

- [36] Zanatta, A., 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, 2013. 33(1): p. 137-46.
- [37] Ellman, G.L., *Tissue sulfhydryl groups*. Arch Biochem Biophys, 1959. 82(1): p. 70-7.
- [38] Misra, H.P. and I. Fridovich, *The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase*. J Biol Chem, 1972. 247(10): p. 3170-5.
- [39] Aebi, H., *Catalase in vitro*. Methods Enzymol, 1984. 105: p. 121-6.
- [40] PAGLIA, D.E., VALENTINE, W.N., *Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase*. J. Lab. Clin. Med. , 1967. 70: p. 158-169.
- [41] Habig, W.H., M.J. Pabst, and W.B. Jakoby, *Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation*. J Biol Chem, 1974. 249(22): p. 7130-9.
- [42] Hissin, P.J. and R. Hilf, *A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues*. Anal Biochem, 1976. 74(1): p. 214-26.
- [43] Alp, P.R., E.A. Newsholme, and V.A. Zammit, *Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates*. Biochem J, 1976. 154(3): p. 689-700.
- [44] Opie, L.H. and E.A. Newsholme, *The activities of fructose 1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in white muscle and red muscle*. Biochem J, 1967. 103(2): p. 391-9.
- [45] Mansour, T.E., *Studies on Heart Phosphofructokinase. Active and Inactive Forms of the Enzyme*. J Biol Chem, 1965. 240: p. 2165-72.
- [46] Glock, G.E. and L.P. Mc, *Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver*. Biochem J, 1953. 55(3): p. 400-8.
- [47] 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, 2010. 298(5): p. H1426-37.
- [48] van Zutphen, T., et al., *Malnutrition-associated liver steatosis and ATP depletion is caused by peroxisomal and mitochondrial dysfunction*. J Hepatol, 2016. 65(6): p. 1198-1208.
- [49] Rebelato, H.J., et al., *Gestational protein restriction induces alterations in placental morphology and mitochondrial function in rats during late pregnancy*. J Mol Histol, 2013. 44(6): p. 629-37.
- [50] Moraes, C., et al., *Effect of maternal protein restriction on liver metabolism in rat offspring*. J Physiol Sci, 2014. 64(5): p. 347-55.
- [51] Leandro, C.G., et al., *Moderate physical training attenuates muscle-specific effects on fibre type composition in adult rats submitted to a perinatal maternal low-protein diet*. Eur J Nutr, 2012. 51(7): p. 807-15.
- [52] Santos-Alves, E., et al., *Exercise modulates liver cellular and mitochondrial proteins related to quality control signaling*. Life Sci, 2015. 135: p. 124-30.
- [53] Larsen, S., et al., *Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects*. J Physiol, 2012. 590(14): p. 3349-60.
- [54] Blomstrand, E., G. Radegran, and B. Saltin, *Maximum rate of oxygen uptake by human skeletal muscle in relation to maximal activities of enzymes in the Krebs cycle*. J Physiol, 1997. 501 (Pt 2): p. 455-60.

- [55] Dyck, D.J., et al., *Endurance training increases FFA oxidation and reduces triacylglycerol utilization in contracting rat soleus*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. 278(5): p. E778-85.
- [56] Martin, M.A., et al., *Protein calorie restriction has opposite effects on glucose metabolism and insulin gene expression in fetal and adult rat endocrine pancreas*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. 286(4): p. E542-50.
- [57] 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, 2015. 42(4): p. 380-8.
- [58] Linden, M.A., et al., *Treating NAFLD in OLETF rats with vigorous-intensity interval exercise training*. Med Sci Sports Exerc, 2015. 47(3): p. 556-67.
- [59] Chen, L.Y., et al., *Promotion of mitochondrial energy metabolism during hepatocyte apoptosis in a rat model of acute liver failure*. Mol Med Rep, 2015. 12(4): p. 5035-41.
- [60] Budge, H., et al., *Maternal nutritional programming of fetal adipose tissue development: long-term consequences for later obesity*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2005. 75(3): p. 193-9.
- [61] Silvestre, M.F., et al., *A key role for interferon regulatory factors in mediating early-life metabolic defects in male offspring of maternal protein restricted rats*. Horm Metab Res, 2014. 46(4): p. 252-8.
- [62] van der Heijden, G.J., et al., *A 12-week aerobic exercise program reduces hepatic fat accumulation and insulin resistance in obese, Hispanic adolescents*. Obesity (Silver Spring), 2010. 18(2): p. 384-90.
- [63] Johnson, N.A., et al., *Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weight loss*. Hepatology, 2009. 50(4): p. 1105-12.
- [64] Kapravelou, G., et al., *Aerobic interval exercise improves parameters of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and other alterations of metabolic syndrome in obese Zucker rats*. Appl Physiol Nutr Metab, 2015. 40(12): p. 1242-52.
- [65] Gurley, J.M., B.A. Griesel, and A.L. Olson, *Increased Skeletal Muscle GLUT4 Expression in Obese Mice After Voluntary Wheel Running Exercise Is Posttranscriptional*. Diabetes, 2016. 65(10): p. 2911-9.
- [66] Ferreira, D.J., et al., *Mitochondrial bioenergetics and oxidative status disruption in brainstem of weaned rats: Immediate response to maternal protein restriction*. Brain Res, 2016. 1642: p. 553-61.
- [67] Park, K.S., et al., *Fetal and early postnatal protein malnutrition cause long-term changes in rat liver and muscle mitochondria*. J Nutr, 2003. 133(10): p. 3085-90.
- [68] de Brito Alves, J.L., et al., *Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring*. Br J Nutr, 2014. 111(4): p. 606-15.
- [69] Kowaltowski, A.J., R.F. Castilho, and A.E. Vercesi, *Mitochondrial permeability transition and oxidative stress*. FEBS Lett, 2001. 495(1-2): p. 12-5.
- [70] Kowaltowski, A.J., R.F. Castilho, and A.E. Vercesi, *Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca²⁺ is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species*. FEBS Lett, 1996. 378(2): p. 150-2.
- [71] Berridge, M.J., *Calcium hypothesis of Alzheimer's disease*. Pflugers Arch, 2010. 459(3): p. 441-9.

- [72] Supnet, C. and I. Bezprozvanny, *Neuronal calcium signaling, mitochondrial dysfunction, and Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis, 2010. 20 Suppl 2: p. S487-98.
- [73] Rasheed, M.Z., H. Tabassum, and S. Parvez, *Mitochondrial permeability transition pore: a promising target for the treatment of Parkinson's disease*. Protoplasma, 2017. 254(1): p. 33-42.
- [74] Kakarla, P., G. Vadhuri, and S. Reddy Kesireddy, *Response of hepatic antioxidant system to exercise training in aging female rat*. J Exp Zool A Comp Exp Biol, 2005. 303(3): p. 203-8.
- [75] Santos, M., et al., *Adult exercise effects on oxidative stress and reproductive programming in male offspring of obese rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2015. 308(3): p. R219-25.
- [76] Sun, L., et al., *Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients*. Life Sci, 2010. 86(1-2): p. 39-44.
- [77] Bonatto, F., et al., *Effects of maternal protein malnutrition on oxidative markers in the young rat cortex and cerebellum*. Neurosci Lett, 2006. 406(3): p. 281-4.
- [78] Bonatto, F., et al., *Effect of protein malnutrition on redox state of the hippocampus of rat*. Brain Res, 2005. 1042(1): p. 17-22.
- [79] Lima, F.D., et al., *Swimming training induces liver mitochondrial adaptations to oxidative stress in rats submitted to repeated exhaustive swimming bouts*. PLoS One, 2013. 8(2): p. e55668.
- [80] Pompella, A., et al., *The changing faces of glutathione, a cellular protagonist*. Biochem Pharmacol, 2003. 66(8): p. 1499-503.
- [81] Chadha, V.D., P. Bhalla, and D.K. Dhawan, *Zinc modulates lithium-induced hepatotoxicity in rats*. Liver Int, 2008. 28(4): p. 558-65.

Table

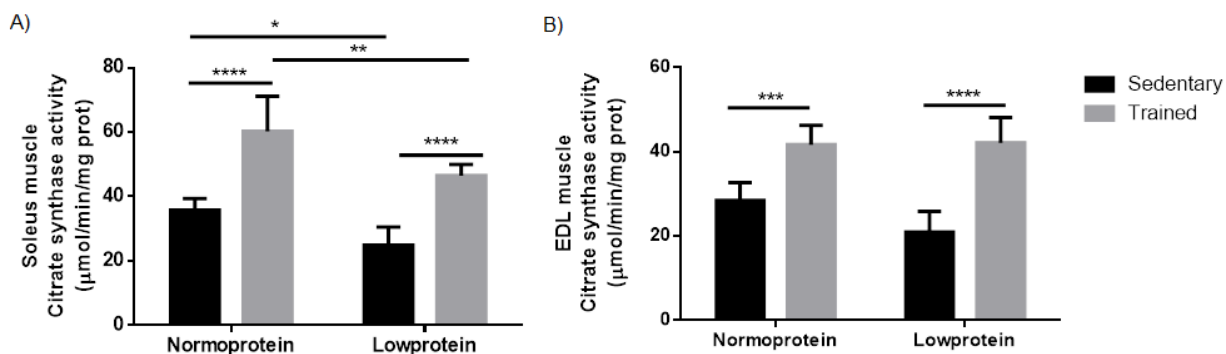
Table 1 - Body, liver weight evaluations and serum albumin, ALT and AST levels.

	NS	LS	NT	LT
Body weight	243.82 ± 29.23	207.16 ± 28.87*	227.12 ± 22.77	204.12 ± 4.38
Liver weight	11.16 ± 1.41	8.71 ± 1.56*	9.92 ± 1.87	8.81 ± 1.42
Serum albumin	3.85 ± 0.43	3.71 ± 0.25	3.56 ± 0.31	3.93 ± 0.39
ALT	83.18 ± 6.12	89.31 ± 36.14	85.11 ± 25.24	83.62 ± 26.74
AST	83.18 ± 6.12	67.33 ± 7.24	87.82 ± 7.24	78.09 ± 6.30

The analyses were determined in male rats at 60 days old born to dams fed through perinatal period with either normo protein (17% casein) or low protein (8% casein) diet; n= 4-11. The trained animals were submitted to a training protocol (60 min day/ 5 days/week and 4 weeks). All values were expressed as mean ± SEM. Performed with two-way ANOVA test followed in the TUKEY multiple comparison test.

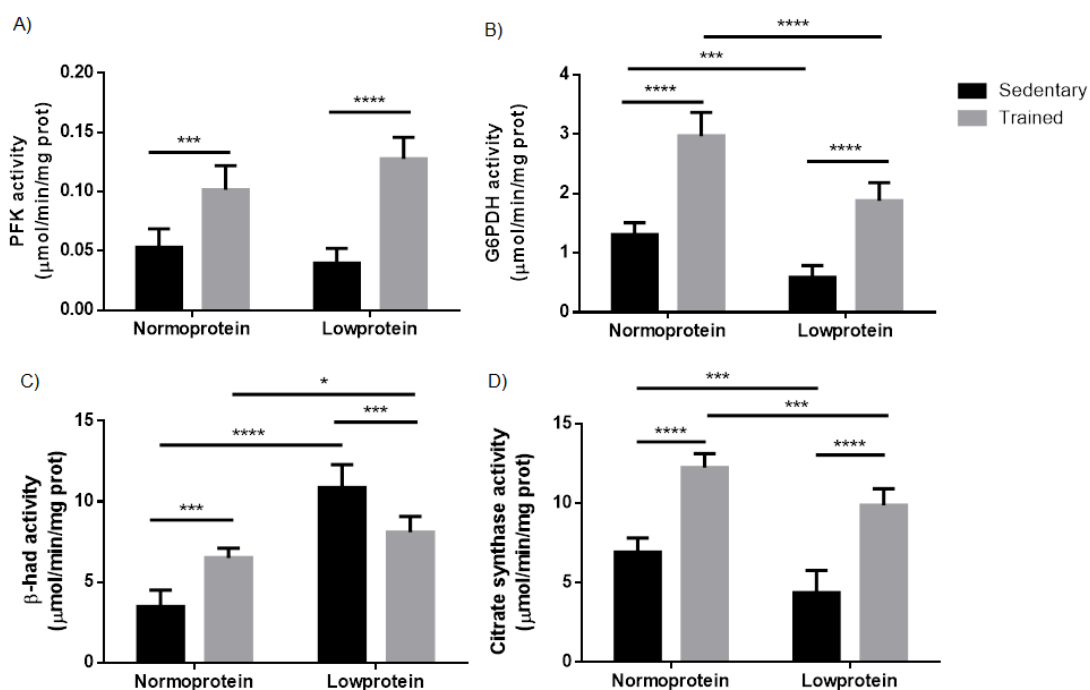
Figures

Figure 1 - Citrate synthase activity in muscles.



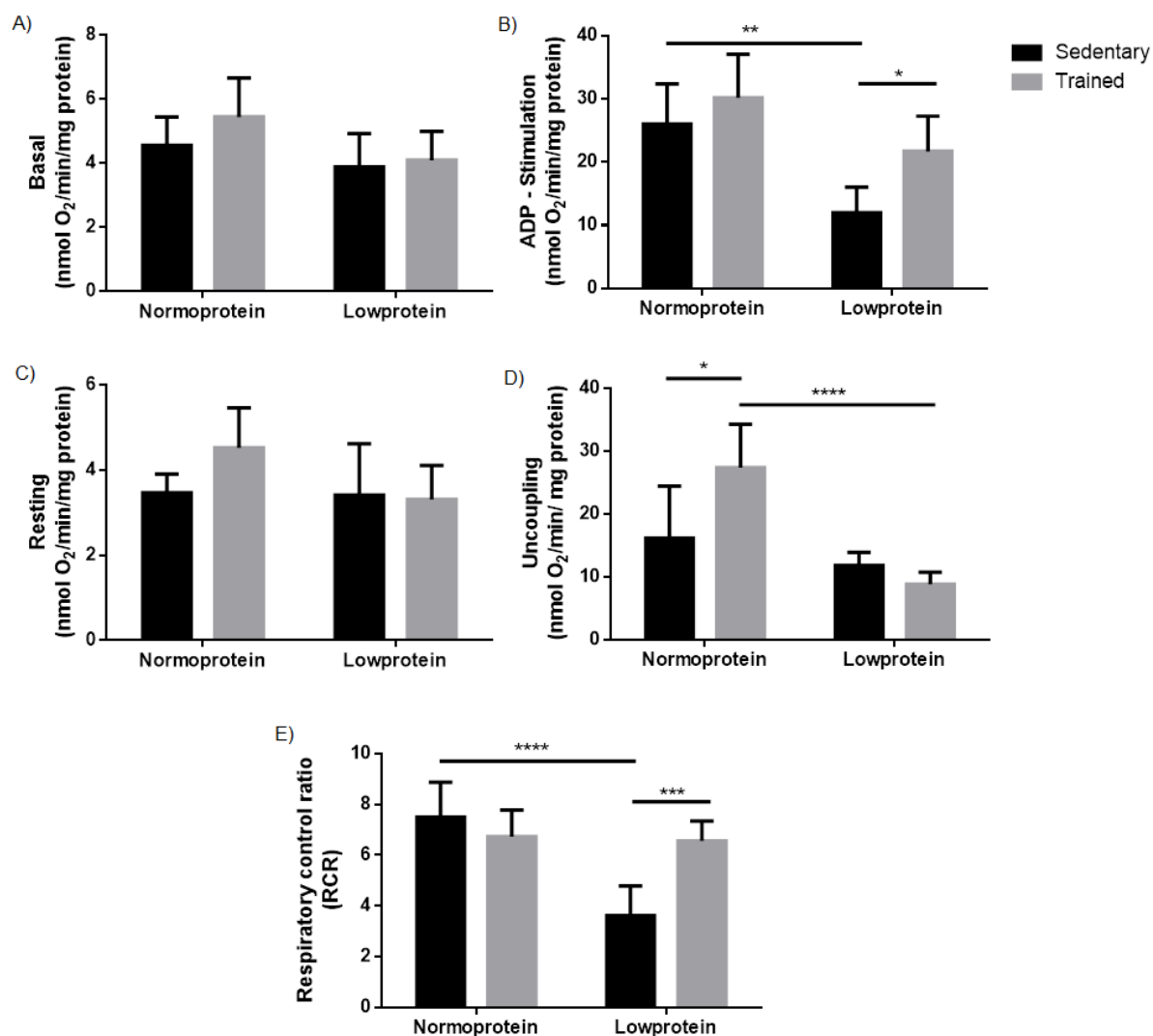
Citrate synthase activity was determined in soleus (A) and EDL (B) muscles of male rats at 60 days old born to dams fed through perinatal period with either normo protein (17% casein) or low protein (8% casein) diet; $n=5-6$. The trained animals were submitted to a training protocol (60 min day/ 5 days/week and 4 weeks). All values were expressed as mean $\pm$ SEM. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; **** $p<0.0001$ performed with two-way ANOVA test followed in the TUKEY multiple comparison test.

Figure 2 - Metabolic enzymes activities.



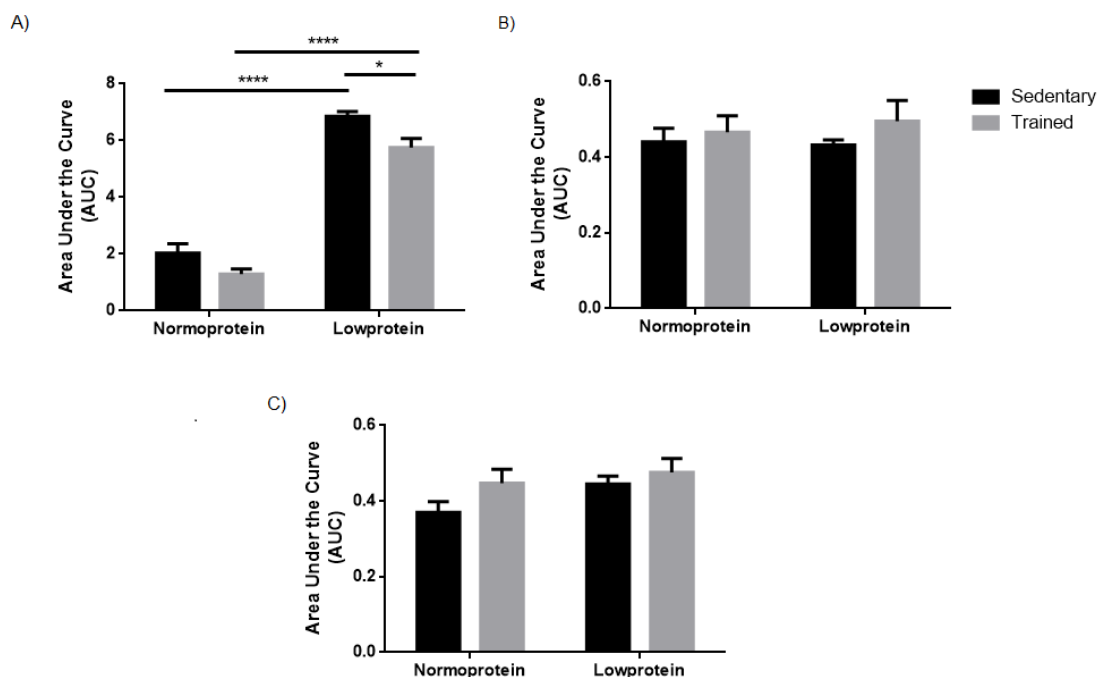
Enzymatic activity of the PFK (A), G6PDH activity (B), β -HAD activity (C) and Citrate Synthase activity (D) in liver homogenate of male rats at 60 days old born to dams fed through perinatal period with either normo protein (17% casein) or low protein (8% casein) diet; $n=6-9$. The trained animals were submitted to a training protocol (60 min day/ 5 days/week and 4 weeks). All values were expressed as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ performed with two-way ANOVA test followed in the TUKEY multiple comparison test.

Figure 3 - Mitochondrial oxygen consumption.



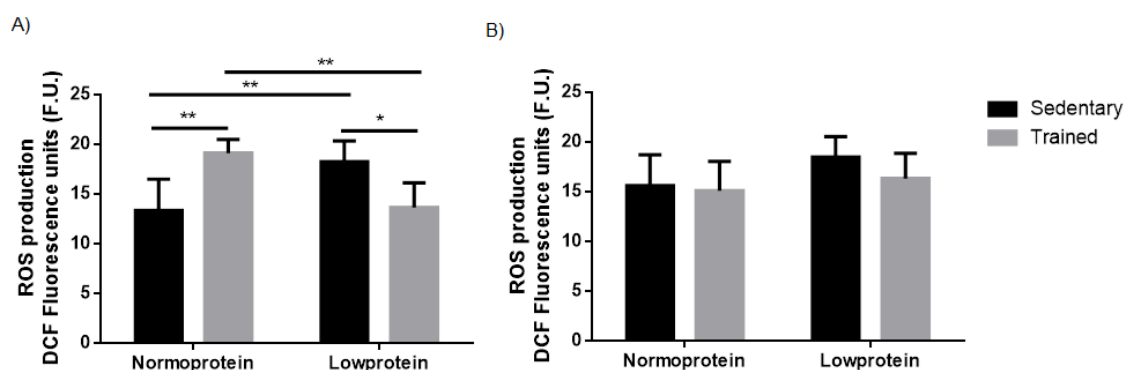
Mitochondrial O₂ consumption on the basal state (State 2), stimulated with ADP (State 3), resting state (State 4), uncoupled with CCCP and respiratory control ratio were determined in liver mitochondria of male rats at 60 days old born to dams fed through perinatal period with either normoprotein (17% casein) or low protein (8% casein) diet; n=5-7. The trained animals were submitted to a training protocol (60 min day/ 5 days/week and 4 weeks). All values were expressed as mean $\pm$ SEM. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$ performed with two-way ANOVA test followed in the TUKEY multiple comparison test.

Figure 4 - Mitochondrial swelling.



Mitochondrial swelling in the presence of Ca²⁺ ion (10µM) (A), EGTA (200µM) a chelator of Ca²⁺ (B) or Cyclosporin A (CsA, 1 µM) (C), an inhibitor of mitochondrial permeability transition pore in the liver mitochondria of male rats at 60 days old born to dams fed through perinatal period with either normo protein (17% casein) or low protein (8% casein) diet; n=6-8. The trained animals were submitted to a training protocol (60 min day/ 5 days/week and 4 weeks). All values were expressed as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$ performed with two-way ANOVA test followed in the TUKEY multiple comparison test.

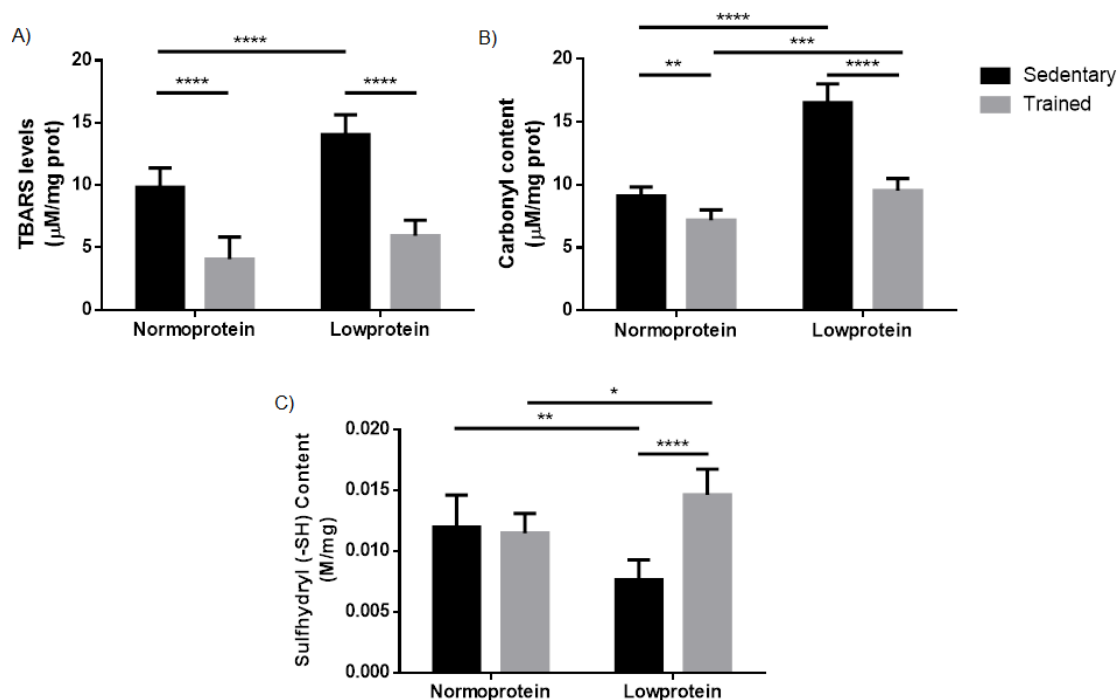
Figure 5 - Reactive oxygen species production.



Mitochondrial ROS production in the presence of Ca²⁺ ion (10µM) (A) and EGTA (200µM) a chelator of Ca²⁺ (B) in liver mitochondria of male rats at 60 days old born to dams fed through perinatal period

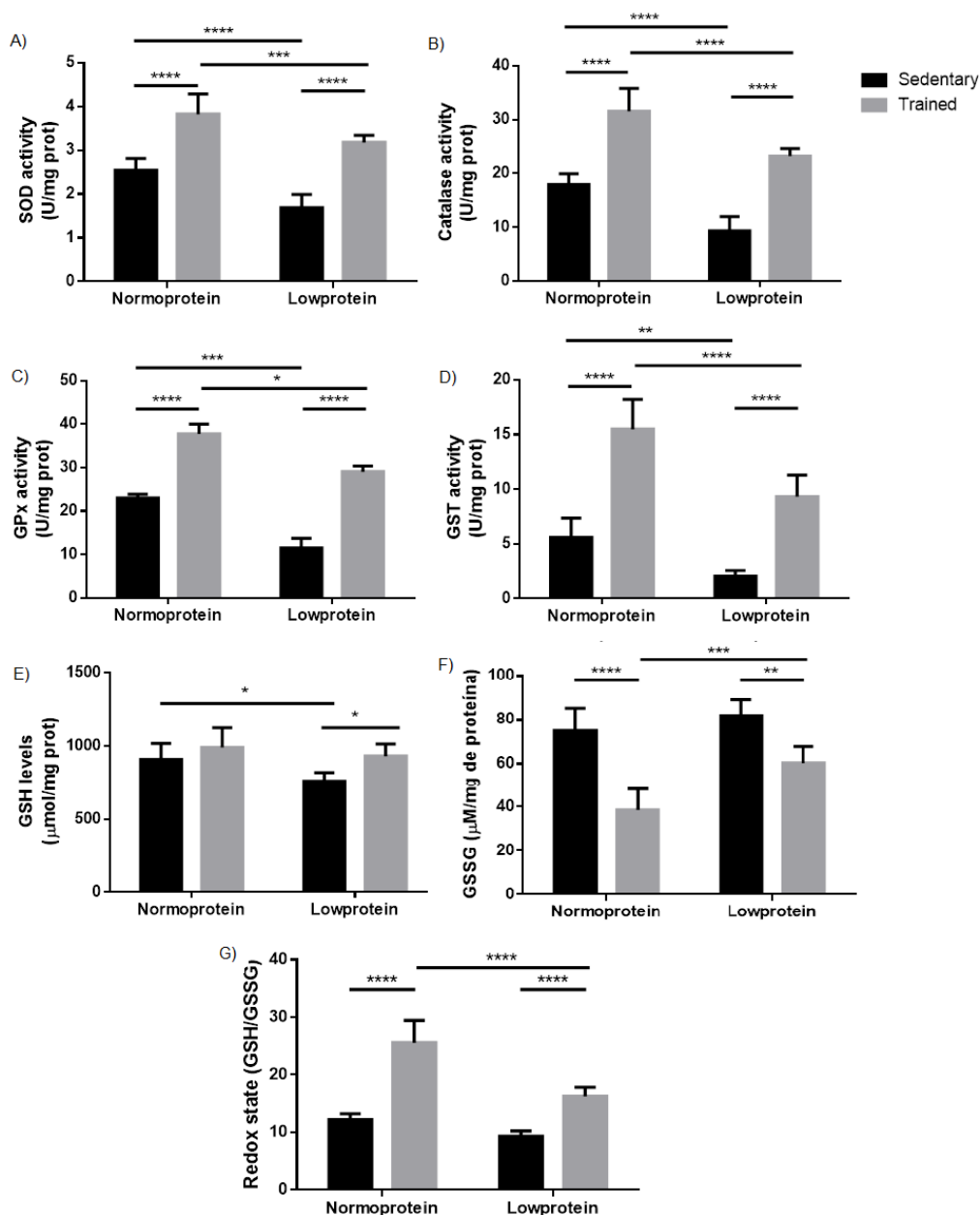
with either normo protein (17% casein) or low protein (8% casein) diet; $n=6-7$. The trained animals were submitted to a training protocol (60 min day/ 5 days/week and 4 weeks). All values were expressed as mean $\pm$ SEM. $*p<0.05$; $**p<0.01$ performed with two-way ANOVA test followed in the TUKEY multiple comparison test.

Figure 6 - Oxidative stress biomarkers.



A) TBARS levels, B) Carbonyl content and Sulfhydryl (-SH) content in liver homogenate of male rats at 60 days old born to dams fed through perinatal period with either normo protein (17% casein) or low protein (8% casein) diet; $n=6-8$. The trained animals were submitted to a training protocol (60 min day/ 5 days/week and 4 weeks). All values were expressed as mean $\pm$ SEM. $*p<0.05$; $**p<0.01$; $***p<0.001$; $****p<0.0001$ performed with two-way ANOVA test followed in the TUKEY multiple comparison test.

Figure 7 - Enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems.



A) Superoxide dismutase (SOD) activity, B) Catalase (CAT) activity, C) Glutathione peroxidase (GPx) activity, D) Glutathione-S-transferase (GST) activity E) Reduced Glutathione (GSH) levels F) oxidized glutathione (GSSG) levels and G) Redox state in liver homogenate of male rats at 60 days old born to dams fed through perinatal period with either normo protein (17% casein) or low protein (8% casein) diet; n=6-12. The trained animals were submitted to a training protocol (60 min day/ 5 days/week and 4 weeks). All values were expressed as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ performed with two-way ANOVA test followed in the TUKEY multiple comparison test.

Complementary table

Table 2 - Physical training program according to the speed and duration of the sessions during 4 weeks of training

Week	Maximum test speed		50% of the maximum capacity		Time (min)
	LT	NT	LT	NT	
1°	6m/min	6m/min	3m/min	3m/min	60*
2°	12m/min	9m/min	6m/min	4,5m/min	5/50/5**
3°	15m/min	12m/min	7,5m/min	6m/min	5/50/5**
4°	18m/min	15m/min	9m/min	7,5m/min	5/50/5**

* Running time of the animal on the treadmill daily.

** 5 minutes before and after of the previous week's speed training.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos dados sugerem que o treinamento físico moderado, modulou de forma positiva alguns efeitos deletérios da restrição proteica perinatal na bioenergetica mitocondrial e metabolismo hepático de ratos jovens, permitindo o conhecimento de alguns mecanismos mitocondriais associados à restrição proteica. Foi observado que o treinamento físico moderado resultou em modificações metabólicas que refletiram numa maior atividade de enzimas antioxidantes, acompanhada de uma diminuição dos níveis de biomarcadores de estresse oxidativo e melhora do estado redox hepático dos animais submetidos ao protocolo de treinamento físico, atenuando efeitos negativos induzidos pelo insulto nutricional durante as fases iniciais do desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, New York, v. 105, p. 121-6, 1984.

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**, London, v. 154, n. 3, p. 689-700, Mar 15 1976.

AMBRUS, A.; *et al.* Formation of reactive oxygen species by human and bacterial pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complexes reconstituted from recombinant components. **Free Radic Biol Med**, New York, v. 89, p. 642-50, Dec 2015.

AMORIM, M. F.; *et al.* Can physical exercise during gestation attenuate the effects of a maternal perinatal low-protein diet on oxygen consumption in rats? **Exp Physiol**, England, v. 94, n. 8, p. 906-13, Aug 2009.

ARRUDA, A. P.; *et al.* Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. **Nat Med**, New York, v. 20, n. 12, p. 1427-35, Dec 2014.

BARKER, D. J.; *et al.* Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. **BMJ**, London, v. 298, n. 6673, p. 564-7, Mar 04 1989.

BARNES, S. K.; OZANNE, S. E. Pathways linking the early environment to long-term health and lifespan. **Prog Biophys Mol Biol**, London, v. 106, n. 1, p. 323-36, Jul 2011.

BAROUKI, R.; *et al.* Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. **Environ Health**, London, v. 11, p. 42, Jun 27 2012.

BAYIR, H.; KAGAN, V. E. Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis--there is nothing more practical than a good theory. **Crit Care**, London, v. 12, n. 1, p. 206, 2008.

BELLÓ-KEIN, A.; *et al.* Submaximal exercise training in postnatal rats: Hemodynamic and oxidative stress changes. **Exp. Clin. Cardiol**, Bern-Switzerland, v. Vol 5, p. 149-153, 2000.

BERRIDGE, M. J. Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. **Pflugers Arch**, Berlin, v. 459, n. 3, p. 441-9, Feb 2010.

BEVILACQUA, L.; *et al.* Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, Bethesda-MD, v. 286, n. 5, p. E852-61, May 2004.

BLOMSTRAND, E.; RADEGRAN, G.; SALTIN, B. Maximum rate of oxygen uptake by human skeletal muscle in relation to maximal activities of enzymes in the Krebs cycle. **J Physiol**, London, v. 501, Pt 2, p. 455-60, Jun. 1997.

BONATTO, F.; *et al.* Effects of maternal protein malnutrition on oxidative markers in the young rat cortex and cerebellum. **Neurosci Lett**, Amsterdam, v. 406, n. 3, p. 281-4, Oct 09 2006.

BONATTO, F.; *et al.* Effect of protein malnutrition on redox state of the hippocampus of rat. **Brain Res**, Amsterdam, v. 1042, n. 1, p. 17-22, Apr 25 2005.

BONORA, M.; PINTON, P. The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death. **Front Oncol**, Lausanne, v. 4, p. 302, 2014.

BOUSQUET-SANTOS, K.; *et al.* Resistance training improves muscle function and body composition in patients with hyperthyroidism. **Arch Phys Med Rehabil**, Philadelphia, v. 87, n. 8, p. 1123-30, Aug 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, Orland, v. 72, p. 248-54, May 1976.

BRAUTIGAM, C. A.; *et al.* Subunit and catalytic component stoichiometries of an in vitro reconstituted human pyruvate dehydrogenase complex. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 284, n. 19, p. 13086-98, May 2009.

BRAZ, G. R.; *et al.* Effect of moderate exercise on peritoneal neutrophils from juvenile rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, Ottawa, v. 40, n. 9, p. 959-62, Sep 2015.

BROOKES, P. S.; *et al.* Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. **Am J Physiol Cell Physiol**, Bethesda-Md, v. 287, n. 4, p. C817-33, Oct 2004.

BROOKS, G. A.; WHITE, T. P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, Bethesda-Md, v. 45, n. 6, p. 1009-15, Dec 1978.

BUDGE, H.; *et al.* Maternal nutritional programming of fetal adipose tissue development: long-term consequences for later obesity. **Birth Defects Res C Embryo Today**, Hoboken-NJ, v. 75, n. 3, p. 193-9, Sep 2005.

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

BURNS, S. P.; *et al.* Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. **J Clin Invest**, Berlin, v. 100, n. 7, p. 1768-74, Oct 01 1997.

CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public Health Rep**, Thousand Oaks-CA, v. 100, n. 2, p. 126-31, Mar./Apr. 1985.

CHADHA, V. D.; BHALLA, P.; DHAWAN, D. K. Zinc modulates lithium-induced hepatotoxicity in rats. **Liver Int**, Malden-MA, v. 28, n. 4, p. 558-65, Apr. 2008.

CHEN, L. Y.; *et al.* Promotion of mitochondrial energy metabolism during hepatocyte apoptosis in a rat model of acute liver failure. **Mol Med Rep**, Athens, v. 12, n. 4, p. 5035-41, Oct. 2015.

CRIDDLE, D. N. Reactive oxygen species, Ca(2+) stores and acute pancreatitis; a step closer to therapy? **Cell Calcium**, Amsterdam, v. 60, n. 3, p. 180-9, Sep 2016.

CROMPTON, M.; *et al.* The mitochondrial permeability transition pore. **Biochem Soc Symp**, London, v. 66, p. 167-79, 1999.

CUTHBERTSON, D. J.; *et al.* Dissociation between exercise-induced reduction in liver fat and changes in hepatic and peripheral glucose homeostasis in obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Clin. Sci.**, London, v. 130, n. 2, p. 93-104, Jan. 2016.

D'AQUILA, P.; BELLIZZI, D.; PASSARINO, G. Mitochondria in health, aging and diseases: the epigenetic perspective. **Biogerontology**, Amsterdam, v. 16, n. 5, p. 569-85, Oct 2015.

ALVES, J. L.; *et al.* Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. **Br J Nutr**, London, v. 111, n. 4, p. 606-15, Feb 2014.

LISA, F.; *et al.* Mitochondria and vascular pathology. **Pharmacol Rep**, Kraków,, v. 61, n. 1, p. 123-30, Jan-Feb 2009.

DIKALOV, S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. **Free Radic Biol Med**, New York, v. 51, n. 7, p. 1289-301, Oct 01 2011.

DYCK, D. J.; *et al.* Endurance training increases FFA oxidation and reduces triacylglycerol utilization in contracting rat soleus. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, Bethesda-MD, v. 278, n. 5, p. E778-85, May 2000.

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

ENNS, G. M. The contribution of mitochondria to common disorders. **Mol Genet Metab**, Orlando, v. 80, n. 1-2, p. 11-26, Sep-Oct 2003.

ERNSTER, L.; SCHATZ, G. Mitochondria: a historical review. **J Cell Biol**, New York ,v. 91, n. 3 Pt 2, p. 227s-255s, Dec 1981.

FAO. The State of Food Insecurity in the World 2015. **Adv Nutr**. Bethesda-MD, v.6, n. 5, p. 623-4, Sep 2015.

Meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress., 2015. **Adv Nutr**. Bethesda-MD, v.6, n. 5, p. 623-4, Sep 2015.

FARRELL, P. A.; *et al.* Effects of intensity of acute-resistance exercise on rates of protein synthesis in moderately diabetic rats. **J Appl Physiol**, Bethesda-MD, v. 85, n. 6, p. 2291-7, Dec 1998.

FERREIRA, D. S.; *et al.* Perinatal low-protein diet alters brainstem antioxidant metabolism in adult offspring. **Nutr Neurosci**, Abingdon, v. 19, n. 8, p. 369-375, Oct 2016.

FERREIRA, D. J.; *et al.* Mitochondrial bioenergetics and oxidative status disruption in brainstem of weaned rats: Immediate response to maternal protein restriction. **Brain Res**, Amsterdam, v. 1642, p. 553-61, Jul 01 2016.

FIGUEIRA, T. R.; *et al.* Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. **Antioxid Redox Signal**, Larchmont, v. 18, n. 16, p. 2029-74, Jun 01 2013.

FISHER-WELLMAN, K. H.; *et al.* Mitochondrial glutathione depletion reveals a novel role for the pyruvate dehydrogenase complex as a key H₂O₂-emitting source under conditions of nutrient overload. **Free Radic Biol Med**, New York, v. 65, p. 1201-8, Dec 2013.

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**, New York, v. 2016, p. 9307064, 2016.

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**, Baltimore, v. 272, n. 17, p. 11369-77, Apr 25 1997.

GEBHARDT, R. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. **Pharmacol Ther**, Oxford, v. 53, n. 3, p. 275-354, 1992.

GHAFOORY, S.; *et al.* Zonation of nitrogen and glucose metabolism gene expression upon acute liver damage in mouse. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 10, p. e78262, 2013.

GLOCK, G. E.; MC, L. P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochem J**, London, v. 55, n. 3, p. 400-8, Oct 1953.

GLUCKMAN, P. D.; *et al.* The fetal, neonatal, and infant environments-the long-term consequences for disease risk. **Early Hum Dev**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 51-9, Jan 2005.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; LOW, F. M. The role of developmental plasticity and epigenetics in human health. **Birth Defects Res C Embryo Today**, Hoboken-NJ, v. 93, n. 1, p. 12-8, Mar 2011.

GONCALVES, I. O.; *et al.* Exercise as a therapeutic tool to prevent mitochondrial degeneration in nonalcoholic steatohepatitis. **Eur J Clin Invest**, Berlin, v. 43, n. 11, p. 1184-94, Nov 2013.

GRAY, M. W.; BURGER, G.; LANG, B. F. Mitochondrial evolution. **Science**, New York, v. 283, n. 5407, p. 1476-81, Mar 1999.

GREENGARD, O.; FEDERMAN, M.; KNOX, W. E. Cytomorphometry of developing rat liver and its application to enzymic differentiation. **J Cell Biol**, New York, v. 52, n. 2, p. 261-72, Feb 1972.

GURLEY, J. M.; GRIESEL, B. A.; OLSON, A. L. Increased Skeletal Muscle GLUT4 Expression in Obese Mice After Voluntary Wheel Running Exercise Is Posttranscriptional. **Diabetes**, Alexandria, v. 65, n. 10, p. 2911-9, Oct 2016.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 249, n. 22, p. 7130-9, Nov 25 1974.

HALES, C. N. Metabolic consequences of intrauterine growth retardation. **Acta Paediatr Suppl**, Oslo, v. 423, p. 184-7; discussion 188, Nov 1997.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. The thrifty phenotype hypothesis. **Br Med Bull**, London, v. 60, p. 5-20, 2001.

HALESTRAP, A. P.; PASDOIS, P. The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1787, n. 11, p. 1402-15, Nov 2009.

HALL, A. P.; *et al.* Liver hypertrophy: a review of adaptive (adverse and non-adverse) changes--conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop. **Toxicol Pathol**, Thousand Oaks-CA, v. 40, n. 7, p. 971-94, Oct 2012.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutr Rev**, Washington, v. 52, n. 8 Pt 1, p. 253-65, Aug 1994.

_____. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutr Rev**, Washington, v. 70, n. 5, p. 257-65, May 2012.

HAMANAKA, R. B.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. **Trends Biochem Sci**, Amsterdam, v. 35, n. 9, p. 505-13, Sep 2010.

HAN, D.; *et al.* Mitochondrial remodeling in the liver following chronic alcohol feeding to rats. **Free Radic Biol Med**, New York, v. 102, p. 100-110, Jan 2017.

HASHIDA, R.; *et al.* Aerobic vs. resistance exercise in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. **J Hepatol**, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 142-152, Jan 2017.

HATEFI, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Annu Rev Biochem**, Palo Alto-CA, v. 54, p. 1015-69, 1985.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal Biochem**, Orlando, v. 74, n. 1, p. 214-26, Jul 1976.

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**, Bethesda-Md, v. 298, n. 5, p. H1426-37, May 2010.

JIMENEZ-CHILLARON, J. C.; *et al.* The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. **Biochimie**, Paris, v. 94, n. 11, p. 2242-63, Nov 2012.

JOHNSON, N. A.; *et al.* Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weight loss. **Hepatology**, Baltimore, v. 50, n. 4, p. 1105-12, Oct 2009.

KAKARLA, P.; VADLURI, G.; REDDY KESIREDDY, S. Response of hepatic antioxidant system to exercise training in aging female rat. **J Exp Zool A Comp Exp Biol**, Hoboken-NJ, v. 303, n. 3, p. 203-8, Mar 01 2005.

KALUDERCIC, N.; GIORGIO, V. The Dual Function of Reactive Oxygen/Nitrogen Species in Bioenergetics and Cell Death: The Role of ATP Synthase. **Oxid Med Cell Longev**, New York, v. 2016, p. 3869610, 2016.

KAPRAVELOU, G.; *et al.* Aerobic interval exercise improves parameters of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and other alterations of metabolic syndrome in obese Zucker rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, Ottawa, v. 40, n. 12, p. 1242-52, Dec 2015.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca²⁺ is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. **FEBS Lett**, Amsterdam, v. 378, n. 2, p. 150-2, Jan 08 1996.

_____. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett**, Amsterdam, v. 495, n. 1-2, p. 12-5, Apr 20 2001.

KOWALTOWSKI, A. J.; *et al.* Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radic Biol Med**, New York, v. 47, n. 4, p. 333-43, Aug 15 2009.

LARSEN, S.; *et al.* Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. **J Physiol**, London, v. 590, n. 14, p. 3349-60, Jul 15 2012.

LE CLAIR, C.; *et al.* Impact of maternal undernutrition on diabetes and cardiovascular disease risk in adult offspring. **Can J Physiol Pharmacol**, Ottawa, v. 87, n. 3, p. 161-79, Mar 2009.

LEANDRO, C. G.; *et al.* Moderate physical training attenuates muscle-specific effects on fibre type composition in adult rats submitted to a perinatal maternal low-protein diet. **Eur J Nutr**, Darmstadt-Germany, v. 51, n. 7, p. 807-15, Oct 2012.

LEANDRO, C. G.; *et al.* A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. **J Strength Cond Res**, Champaign, v. 21, n. 3, p. 751-6, Aug 2007.

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**, Washington, v. 5, n. 2, p. 227-31, Mar-Apr 1992.

LEVERVE, X. M. Mitochondrial function and substrate availability. **Crit Care Med**, New York, v. 35, n. 9 Suppl, p. S454-60, Sep 2007.

LIMA, F. D.; *et al.* Swimming training induces liver mitochondrial adaptations to oxidative stress in rats submitted to repeated exhaustive swimming bouts. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 2, p. e55668, 2013.

LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, London, v. 443, n. 7113, p. 787-95, Oct 19 2006.

LINDEN, M. A.; *et al.* Treating NAFLD in OLETF rats with vigorous-intensity interval exercise training. **Med Sci Sports Exerc**, Hagerstown- Md, v. 47, n. 3, p. 556-67, Mar 2015.

LIU, J.; *et al.* Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. **J Appl Physiol**, Bethesda-MD, v. 89, n. 1, p. 21-8, Jul 2000.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Found Symp**, Amsterdam, v. 156, p. 38-50; discussion 50-5, 1991.

_____. Long-term programming effects of early nutrition -- implications for the preterm infant. **J Perinatol**, New York, v. 25 Suppl 2, p. S2-6, May 2005.

MALETH, J.; HEGYI, P. Ca²⁺ toxicity and mitochondrial damage in acute pancreatitis: translational overview. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, London, v. 371, n. 1700, Aug 05 2016.

MANSOUR, T. E. Studies on Heart Phosphofructokinase. Active and Inactive Forms of the Enzyme. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 240, p. 2165-72, May 1965.

MARGULIS, M. S.; *et al.* [Biochemical and morphologic changes during the removal of the liver for extracorporeal perfusion]. **Vestn Khir Im I I Grek**, Leningrand, v. 105, n. 10, p. 30-4, Oct 1970.

MARTIN-GRONERT, M. S.; OZANNE, S. E. Mechanisms underlying the developmental origins of disease. **Rev Endocr Metab Disord**, Heidelberg, v. 13, n. 2, p. 85-92, Jun 2012.

MARTIN, M. A.; *et al.* Protein calorie restriction has opposite effects on glucose metabolism and insulin gene expression in fetal and adult rat endocrine pancreas. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, Bethesda-MD, v. 286, n. 4, p. E542-50, Apr 2004.

MATTEONI, C. A.; *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 116, n. 6, p. 1413-9, Jun 1999.

MCCANCE, R. A. Food, growth, and time. **Lancet**, London, v. 2, n. 7258, p. 671-6, Oct 06 1962.

MELOV, S. Mitochondrial oxidative stress. Physiologic consequences and potential for a role in aging. **Ann N Y Acad Sci**, New York, v. 908, p. 219-25, Jun 2000.

MELOV, S.; *et al.* Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. **Science**, New York, v. 289, n. 5484, p. 1567-9, Sep 01 2000.

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**, Baltimore, v. 247, n. 10, p. 3170-5, May 25 1972.

MIYAJIMA, A.; TANAKA, M.; ITOH, T. Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 14, n. 5, p. 561-74, May 01 2014.

MORAES, C.; *et al.* Effect of maternal protein restriction on liver metabolism in rat offspring. **J Physiol Sci**, Tokyo, v. 64, n. 5, p. 347-55, Sep 2014.

NASCIMENTO, L.; *et al.* The effect of maternal low-protein diet on the heart of adult offspring: role of mitochondria and oxidative stress. **Appl Physiol Nutr Metab**, Ottawa, v. 39, n. 8, p. 880-7, Aug 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. v. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OKUDAN, N.; BELVIRANLI, M. Effects of exercise training on hepatic oxidative stress and antioxidant status in aged rats. **Arch Physiol Biochem**, London, v. 122, n. 4, p. 180-185, Oct 2016.

OLIVEIRA, E. A.; OLIVEIRA, L. M. Acquisition and reversal of discriminations in malnourished rats. **Brazilian Journal of Behavior Analysis**, São Paulo, v. 3, p. 79-95, 2007.

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**, London, v. 103, n. 2, p. 391-9, May 1967.

OROZCO-SOLIS, R.; *et al.* Perinatal nutrient restriction induces long-lasting alterations in the circadian expression pattern of genes regulating food intake and energy metabolism. **Int J Obes**, London, v. 35, n. 7, p. 990-1000, Jul 2011.

ORR, A. L.; *et al.* A refined analysis of superoxide production by mitochondrial sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 287, n. 51, p. 42921-35, Dec 14 2012.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J. Lab. Clin. Med.**, Milpitas-CA, v. 70, p. 158-169, 1967.

PARK, K. S.; *et al.* Fetal and early postnatal protein malnutrition cause long-term changes in rat liver and muscle mitochondria. **J Nutr**, Rockville- MD, v. 133, n. 10, p. 3085-90, Oct 2003.

POMPELLA, A.; *et al.* The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. **Biochem Pharmacol**, England, v. 66, n. 8, p. 1499-503, Oct. 2003.

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**, Melbourne, v. 42, n. 4, p. 380-8, Apr 2015.

QUINLAN, C. L.; *et al.* Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 287, n. 32, p. 27255-64, Aug 03 2012.

RASHEED, M. Z.; TABASSUM, H.; PARVEZ, S. Mitochondrial permeability transition pore: a promising target for the treatment of Parkinson's disease. **Protoplasma**, Leipzig, v. 254, n. 1, p. 33-42, Jan 2017.

RASOLA, A.; BERNARDI, P. The mitochondrial permeability transition pore and its adaptive responses in tumor cells. **Cell Calcium**, Amsterdam, v. 56, n. 6, p. 437-45, Dec 2014.

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**, Boston, v. 295, n. 7, p. 349-53, Aug 12 1976.

REBELATO, H. J.; *et al.* Gestational protein restriction induces alterations in placental morphology and mitochondrial function in rats during late pregnancy. **J Mol Histol**, Amsterdam, v. 44, n. 6, p. 629-37, Dec 2013.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JÚNIOR, G. C. 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**, Rockville- MD, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993.

REUTER, S.; *et al.* Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic Biol Med**, New York, v. 49, n. 11, p. 1603-16, Dec 01 2010.

ROBINSON, J.; COOPER, J. M. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. **Anal Biochem**, Orlando, v. 33, n. 2, p. 390-9, 1970.

RODRIGUES, B.; *et al.* Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. **Cardiovasc Diabetol**, London, v. 6, p. 38, Dec 13 2007.

RUI, L. Energy metabolism in the liver. **Compr Physiol**, Bethesda-Md, v. 4, n. 1, p. 177-97, Jan 2014.

RUSZKIEWICZ, J.; ALBRECHT, J. Changes of the thioredoxin system, glutathione peroxidase activity and total antioxidant capacity in rat brain cortex during acute liver failure: modulation by L-histidine. **Neurochem Res**, New York, v. 40, n. 2, p. 293-300, Feb 2015.

SAMUELSSON, A. M.; *et al.* Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. **Hypertension**, Hagerstown-MD, v. 51, n. 2, p. 383-92, Feb 2008.

SANTO-DOMINGO, J.; DEMAUREX, N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1797, n. 6-7, p. 907-12, Jun-Jul 2010.

SANTOS-ALVES, E.; *et al.* Exercise modulates liver cellular and mitochondrial proteins related to quality control signaling. **Life Sci**, Amsterdam, v. 135, p. 124-30, Aug. 2015.

SANTOS, M.; *et al.* Adult exercise effects on oxidative stress and reproductive programming in male offspring of obese rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, Bethesda-Md, v. 308, n. 3, p. R219-25, Feb. 2015.

SCARPULLA, R. C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. **Physiol Rev**, Washington, v. 88, n. 2, p. 611-38, Apr 2008.

SCHNEIDER, W. C.; HOGEBOM, G. H. Cytochemical studies of mammalian tissues; the isolation of cell components by differential centrifugation: a review. **Cancer Res**, Chicargo, v. 11, n. 1, p. 1-22, Jan 1951.

SERVIDDIO, G.; *et al.* Mitochondrial dysfunction in nonalcoholic steatohepatitis. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**, London, v. 5, n. 2, p. 233-44, Apr. 2011.

SERVIDDIO, G.; *et al.* Principles and therapeutic relevance for targeting mitochondria in aging and neurodegenerative diseases. **Curr Pharm Des**, Netherlands, v. 17, n. 20, p. 2036-55, 2011.

SHANKAR, K.; *et al.* Maternal overweight programs insulin and adiponectin signaling in the offspring. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 151, n. 6, p. 2577-89, Jun 2010.

SIES, H.; CADENAS, E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, London, v. 311, n. 1152, p. 617-31, Dec 17 1985.

SILVA-FILHO, R. **Maternal protein restriction induce liver mitochondrial dysfunction on young rats**. 2014. (Trabalho de conclusão de curso de Bacharelado em Educação Física) - Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão , 2014.

SILVESTRE, M. F.; *et al.* A key role for interferon regulatory factors in mediating early-life metabolic defects in male offspring of maternal protein restricted rats. **Horm Metab Res**, Stuttgart, v. 46, n. 4, p. 252-8, Apr 2014.

SIU, P. M.; *et al.* Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. **J Appl Physiol**, Bethesda-MD, v. 94, n. 2, p. 555-60, Feb 2003.

SPINA, R. J.; *et al.* Mitochondrial enzymes increase in muscle in response to 7-10 days of cycle exercise. **J Appl Physiol**, Bethesda-MD, v. 80, n. 6, p. 2250-4, Jun 1996.

STARKOV, A. A.; *et al.* Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. **J Neurosci**, Washington, v. 24, n. 36, p. 7779-88, Sep 08 2004.

SUN, L.; *et al.* Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. **Life Sci**, Amsterdam, v. 86, n. 1-2, p. 39-44, Jan 02 2010.

SUPNET, C.; BEZPROZVANNY, I. Neuronal calcium signaling, mitochondrial dysfunction, and Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, Amsterdam, v. 20 Suppl 2, p. S487-98, 2010.

TAANMAN, J. W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1410, n. 2, p. 103-23, Feb 09 1999.

TAPPIA, P. S.; GABRIEL, C. A. Role of nutrition in the development of the fetal cardiovascular system. **Expert Rev Cardiovasc Ther**, London, v. 4, n. 2, p. 211-25, Mar 2006.

TARGHER, G.; MARRA, F.; MARCHESINI, G. Increased risk of cardiovascular disease in non-alcoholic fatty liver disease: causal effect or epiphenomenon? **Diabetologia**, Berlin, v. 51, n. 11, p. 1947-53, Nov 2008.

TIPTON, K. F.; *et al.* Monoamine oxidases: certainties and uncertainties. **Curr Med Chem**, Amsterdam, v. 11, n. 15, p. 1965-82, Aug 2004.

TOCCHETTI, C. G.; *et al.* Playing with cardiac "redox switches": the "HNO way" to modulate cardiac function. **Antioxid Redox Signal**, Larchmont, v. 14, n. 9, p. 1687-98, May 01 2011.

TONINELLO, A.; *et al.* Biogenic amines and apoptosis: minireview article. **Amino Acids**, New York, v. 26, n. 4, p. 339-43, Jul 2004.

TRETTER, L.; SIPOS, I.; ADAM-VIZI, V. Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease. **Neurochem Res**, New York, v. 29, n. 3, p. 569-77, Mar 2004.

TRETTER, L.; *et al.* Characteristics of alpha-glycerophosphate-evoked H₂O₂ generation in brain mitochondria. **J Neurochem**, New York, v. 100, n. 3, p. 650-63, Feb 2007.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol**, London, v. 552, n. Pt 2, p. 335-44, Oct 15 2003.

VAN DER HEIJDEN, G. J.; *et al.* A 12-week aerobic exercise program reduces hepatic fat accumulation and insulin resistance in obese, Hispanic adolescents. **Obesity (Silver Spring)**, Malden-MA, v. 18, n. 2, p. 384-90, Feb 2010.

VAN ZUTPHEN, T.; *et al.* Malnutrition-associated liver steatosis and ATP depletion is caused by peroxisomal and mitochondrial dysfunction. **J Hepatol**, Copenhagen, v. 65, n. 6, p. 1198-1208, Dec 2016.

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**, London, v. 594, n. 5, p. 1483-99, Mar 01 2016.

VENDITTI, P.; DI MEO, S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. **Arch Biochem Biophys**, New York, v. 331, n. 1, p. 63-8, Jul 01 1996.

VERCESI, A. E.; *et al.* Ca²⁺-dependent NAD(P)⁺-induced alterations of rat liver and hepatoma mitochondrial membrane permeability. **Biochem Biophys Res Commun**, New York, v. 154, n. 3, p. 934-41, Aug 15 1988.

WALLACE, D. C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. **Annu Rev Genet**, Califórnia, v. 39, p. 359-407, 2005.

WARNER, M. J.; OZANNE, S. E. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. **Biochem J**, London, v. 427, n. 3, p. 333-47, May 1 2010.

WELLS, J. C. Maternal capital and the metabolic ghetto: An evolutionary perspective on the transgenerational basis of health inequalities. **Am J Hum Biol**, New York. v. 22, n. 1, p. 1-17, Jan-Feb 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Noncommunicable Diseases Country Profiles 2011. **WHO Library Cataloguing in Publication Data**, Geneva. p. 209, 2011.

WRITING GROUP, M.; *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, Hagerstown-MD, v. 133, n. 4, p. e38-360, Jan 26 2016.

YIN, F.; CADENAS, E. Mitochondria: the cellular hub of the dynamic coordinated network. **Antioxid Redox Signal**, Larchmont, v. 22, n. 12, p. 961-4, Apr 20 2015.

YOUDIM, M. B.; EDMONDSON, D.; TIPTON, K. F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. **Nat Rev Neurosci**, London, v. 7, n. 4, p. 295-309, Apr 2006.

ZANATTA, A.; *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**, New York, v. 33, n. 1, p. 137-46, Jan 2013.

ANEXO A - Comitê de Ética no uso de animais da UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 10 de julho de 2014.

Ofício nº 26/14

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Mariana Pinheiro Fernandes**
Centro Acadêmico de Vitória (CAV)
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.017809/2014-04

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, *"Avaliação do efeito da desnutrição protéica perinatal no metabolismo hepático e bioenergético mitocondrial de ratos treinados."*

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 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

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

Origem dos animais: Biotério; Animais: rato heterogêneo;
Linhagem; Wistar; Idade; 50 dias; Sexo; macho e fêmea;
Peso; 70-80g; Número de animais previsto no protocolo: 44.

Atenciosamente,

Prof.ª Marcia Vasconcelos
Vice-Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 2190636

CCB: Integrar para desenvolver

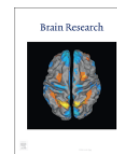
ANEXO B - Artigo produzido em colaboração

Brain Research 1642 (2016) 553–561



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