



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

SEVERINA CÁSSIA DE ANDRADE SILVA

**EFEITOS OXIDATIVOS E MOLECULARES DA RESTRIÇÃO PROTEICA
MATERNA POR DUAS GERAÇÕES NO TECIDO CARDÍACO**

**Recife
2019**

SEVERINA CÁSSIA DE ANDRADE SILVA

**EFEITOS OXIDATIVOS E MOLECULARES DA RESTRIÇÃO PROTEICA
MATERNA POR DUAS GERAÇÕES NO TECIDO CARDÍACO**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Área de concentração: Bioquímica e Fisiologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Claudia Jacques Lagranha

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Silva, Severina Cássia de Andrade
Efeitos oxidativos e moleculares oxidativos da restrição proteica materna por duas gerações no tecido cardíaco / Severina Cássia de Andrade Silva - 2019.
49 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Claudia Jacques Lagranha
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2019.

Inclui referências e anexo.

1. Desnutrição 2. Estresse oxidativo 3. Coração
I. Lagranha, Cláudia Jacques (Orientadora) II. Título

616.39

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-002

SEVERINA CÁSSIA DE ANDRADE SILVA

**EFEITOS OXIDATIVOS E MOLECULARES OXIDATIVOS DA RESTRIÇÃO
PROTEICA MATERNA POR DUAS GERAÇÕES NO TECIDO CARDÍACO**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada em: 22/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Claudia Jacques Lagranha (**Orientadora**)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o Dr^o Leucio Duarte Vieira Filho (Membro interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Mariana Pinheiro Fernandes (Membro externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Diórginis José Soares Ferreira (Membro externo)
Universidade Federal do Vale de São Francisco

Dedico aos meus pais: Natalina Maria e Sebastião Soares (*in memórian*). Aos meus irmãos e amigos por estarem sempre ao meu lado

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e a Nossa Senhora das Graças por terem permitido chegar até aqui, por me abençoar e proteger todos esses anos, me fortalecendo, com coragem e fé para superar todos os obstáculos durante toda essa trajetória.

Agradeço a minha mãe e rainha Natalina Maria e ao meu pai Sebastião Soares (*in memórian*), por terem dado o dom da vida. Sou grata por sua paciência, compreensão e ensinamentos dessa mulher incrível, por nunca desistir de mim e acreditar nos meus sonhos, ajudando-os a torna-los possíveis, você é meu alicerce, meu exemplo. Te amo com amor de amiga e de filha, simplesmente te amo.

Aos meus irmãos: Tarcísio Andrade, Tarcila Andrade, Edson Andrade e Thais Andrade, por estarem presentes nos momentos difíceis, ajudando a vencer as barreiras que surgem ao longo do caminho. Obrigada por vocês me fazerem rir quando estava chorando mostrando sempre o lado bom da vida, vocês são meus tesouros. Obrigada em especial, pelos os melhores sobrinhos/afilhados, eles foram os presentes mais lindos que já ganhei.

Agradeço ao meu cunhado, Pedro Barros, pelo apoio, conselhos, chatices e momentos filosóficos que me fazem entrar na realidade e a Anistaldo Martins (*in memórian*), saiba que jamais esquecerei dos seus “gritos”, das suas palhaçadas, do seu cuidado e dedicação comigo e com minha família, queria que estivesse aqui para ver que os estudos ainda não me levaram a “loucura rsrs”, sei que estas feliz no céu. Sou grata ao meu Compadre Fabio Rodrigues, por cuidar da minha irmã e da minha mãe em minha ausência.

Agradeço a minha tia Maria Gomes e ao meu tio Ricardo Januário, por aturarem todas as noites. Que Deus possa abençoar a todos.

Sou grata a minha Orientadora, Claudia Lagranha, pelos ensinamentos, aprendizagem, paciência durante esses últimos anos, dedicação e empenho comigo, obrigada por ser essa profissional maravilhosa, esforçada e acima de tudo humilde, saiba que sua humildade e dedicação com os alunos me faz acreditar no mundo melhor, obrigada por ensinar a olhar além dos muros da Universidade e principalmente por acreditar que sou capaz e que posso fazer mais do que imagino.

Ao melhor laboratório do CAV, LABMEX, pelo aprendizado e conhecimentos que obtivemos juntos, risadas, conversas e brincadeiras durante todo esse tempo, pelos momentos bons e difíceis que passamos.

Aos “Pós da Jacques, pq sim”, (Anderson e Ruda) pela amizade, por dividirem comigo suas preocupações e alegrias. Obrigada por toda sinceridade, humildade, confiança de vocês. Difícil mensurar o amor que sinto por cada um. Saibam que vocês tornam meus dias mais fáceis. Amo cada um com amor de irmão, de amiga. Que Deus possa ilumina-los sempre.

Sou grata as minhas co-orientandas, Dani e Flavia, por toda ajuda e ensinamentos, com vocês aprendi a aprender, aprendi que vocês tem muito mais a mim ensinar do que eu a vocês oferecer. Aprendi com vocês que não faz sentido ter conhecimentos e não transmiti-los. Obrigada por fazer de mim uma pessoa melhor. Amo vocês!!!

A professora Mariana Fernandes, por suas críticas construtivas durante o estágio e por estar sempre a disposta a ajudar, por sua simplicidade e coração gigante.

Aos que fazem parte do Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Fisiologia, e ao Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão, por todo suporte para a realização e conclusão desse lindo trabalho.

Agradeço à FACEPE e ao CNPq pelo apoio e financiamento.

RESUMO

A Organização Mundial de Saúde destaca atualmente o crescente avanço das doenças crônicas. Da mesma forma, a OMS relata que insultos nutricionais precoces (por exemplo, durante a gestação e a lactação) podem ser cruciais para o desenvolvimento de doenças na vida adulta. Em vista disso, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar os efeitos da restrição proteica materna por duas gerações seguidas em ratas fêmeas em relação a expressão gênica e o balanço oxidativo no tecido cardíaco. O presente estudo seguiu as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), (protocolo nº: 0026/2017). Ratas Wistar prenhes foram divididas em dois grupos experimentais de acordo com a dieta: normoproteica (NP, 17% de caseína) e hipoproteica (LP, 8% de caseína). A dieta foi mantida durante a gestação e a lactação *ad libitum*. Aos 30 dias de vida parte da prole fêmeas foram eutanasiadas e o tecido cardíaco coletado para as análises moleculares e bioquímicas e a outra metade foi mantida no biotério onde receberam ração comercial (Presence) até os 80 dias de idade. Nessa idade, as ratas foram colocadas para acasalar para compor a segunda geração (F2) que foram divididas novamente em dois grupos de acordo com a dieta: dieta Reexposta - LP (F2) e não reexposta - labina (F2L). Nossos principais resultados mostraram uma redução na peroxidação lipídica em F1-LP (49%) e em F2-LP (59%) e aumento na atividade das enzimas SOD (79%) e CAT (40%) em F1-LP. Além disso, o conteúdo de GSH aumentou em F2 tanto em F2-NP (491%) quanto em F2-LP (546%). Em adição aos dados de estresse oxidativo, observamos um aumento na expressão gênica de PGC1 α (340%) e redução de AMPK (60%) em F1-LP comparado com F1-NP. Dessa forma, sugere-se que a restrição proteica materna durante duas gerações, não induz o estresse oxidativo no tecido cardíaco de ratas fêmeas jovens. Acreditamos que elas sejam protegidas da desnutrição devido a presença de estrogênio garantindo o equilíbrio dinâmico do organismo.

Palavras - Chave: Intergeracional. Coração. Fêmeas. Estresse Oxidativo. Estrógeno

ABSTRACT

The World Health Organization has highlighted the epidemic advance of chronic diseases. Similarly, WHO reports that early nutritional insults (e.g. during pregnancy and lactation) can be a critical development factor for adult life diseases. Thus, the present study aimed to evaluate the effects of maternal protein restriction for two subsequent generations in female rats, related to the oxidative balance and gene expression of mitochondrial biogenesis transcription factors in the heart. The present study followed the recommendations of the Brazilian Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA) and was approved by the Local Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco (Protocol nº 0026/2017). Pregnant Wistar rats (n=8) were divided into two experimental groups according to the diet: Normoprotein (NP, 17% casein) and Low-protein (LP, 8% casein). The diet was maintained during gestation and lactation ad libitum. At 30 days of age, part of the offspring were euthanized and the heart collected for the biochemical and molecular analyzes and the other half received commercial chow until 80 days of age. At this age, rats were mated to the second generation (F2) according to the diet: Re-exposed - LP (F2) and not re-exposed (F2L). Our results showed a reduction in lipid peroxidation about 49% in the LP-F1 group and 59% in the LP-F2. In enzymatic defense, we observe increase in SOD activity in the LP-F1 group (79%) and in CAT activity around 40%. GSH increased in F2 in both groups (LP: 546%, NP: 491%). Related to mitochondrial biogenesis gene transcription, we observe an increase in PGC-1 α (340%) and a reduction in AMPK (60%) in LP compared to NP in F1 generation. Thus, it is suggested that maternal protein restriction during two generations did not induce oxidative stress in the heart of young female rats possibly by the presence of endogenous estrogen that guarantee the dynamic balance of the organism.

Keywords: Intergenerational. Heart. Females. Oxidative Stress. Estrogen.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1 – Schematic representation of the experimental model..... 29

Figure 2 – Biomarkers levels: Levels of lipid peroxidation (A) and protein oxidation (B) in the hearts of 30-day-old female rats of F1, F2L and F2 groups. Values are presented as mean \pm SEM compared using two-way ANOVA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$; **** $p < 0.00001$. LP = low protein group; NP = normoprotein group; F1= first generation; F2L = second generation without protein deprivation re-exposure; F2 = second generation with protein deprivation re-exposure 30

Figure 3 - Enzymatic antioxidant activities: Superoxide Dismutase (SOD) activity (A); Catalase (CAT) activity (B) and Glutathione - S – Transferase (GST) activity (C) in the heart of 30-day-old female rats of F1, F2L and F2 groups. Values presented as mean \pm SEM compared with two-way ANOVA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$; **** $p < 0.00001$. LP = low protein group; NP= normoprotein group; F1= first 449 generation; F2L = second generation without protein deprivation re-exposure; F2 = 450 second generation with protein deprivation re-exposure 30

Figure 4 - Non-enzymatic antioxidant defense: Levels of Reduced Glutathione (GSH) (A) and total thiol groups (B) and in the heart of 30-day-old female rats of F1, F2L and F2 groups. Values presented as mean \pm SEM compared with two-way ANOVA. * $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$; **** $p < 0.00001$. LP = low protein group; NP= normoprotein group; F1= first generation; F2L = second generation without protein deprivation re exposure 31

Figure 5 - Gene expression: PGC1 α (A) and AMPK (B) in the heart of 30-day-old female rats of F1, F2L and F2 groups. Values presented as mean \pm SEM compared with two-way ANOVA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$; **** $p < 0.00001$; * $p < 0.05$; $p < 0.001$; LP = low protein group; NP= normoprotein group; F1= first generation; F2L

= second generation without protein deprivation re-exposure; F2 = second generation with protein deprivation re-exposure 31

Figura 6 - Níveis de estradiol em soro de ratas aos 20, 30 e 122 dias de idade que foram submetidos a dieta Normoproteica (NP, 17 % de proteína, n:4) ou Hipoproteica (HP, 8 % de proteína, n:4) durante a gestação e lactação na primeira geração (F1). *a* – foi considerada diferença significativa entre o grupo NP com 30 ou 122 dias de vida quando comparado com o grupo NP aos 20 dias de vida; *b* - foi considerada diferença significativa entre o grupo HP com 30 ou 122 dias de vida quando comparado com o grupo NP aos 20 dias de vida ($p < 0.005$; test t de Student não pareado) 33

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|---|
| AMPK | Proteína Kinase Ativada por Adenosina monofosfato |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| CAT | Catalase |
| DC's | Doenças Crônicas |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DOHaD | Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| ERO's ou EROS | Espécies Reativas de Oxigênio |
| F1 | Primeira Geração |
| F2 | Segunda Geração |
| F2L | Segunda Geração sem Reexposição da dieta |
| GPX | Glutathione Peroxidase |
| GSH | Glutathione Reduzida |
| GSSG | Glutathione Oxidada |
| GST | Glutathione-S-transferase |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| H ₂ O | Água |
| MDA | Malondialdeído |
| NRF1 | Fator Respiratório Nuclear 1 |
| OH° | Radical Hidroxila |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PGC-1 α | Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama coactivator 1-alpha |
| PMSF | Fluoreto de Fenilmetanosulfonil |
| SH | Tióis Totais |
| SOD | Superóxido Dismutase |
| TBARs | Substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico |
| TFAM | Fator de Transcrição Mitocondrial A |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 17 |
| 2.1 | Efeitos da desnutrição no tecido cardíaco | 17 |
| 2.2 | Desnutrição e Estresse oxidativo | 18 |
| 2.3 | Estrógeno e Cardioproteção..... | 20 |
| 2.4 | Efeitos intergeracionais e Desnutrição | 22 |
| 2.5 | Biogênese Mitocondrial e Coração..... | 23 |
| 3 | “INFLUENCE OF MATERNAL PROTEIN MALNUTRITION ON OXIDATIVE STRESS AND REGULATORS OF MITOCHONDRIAL BIOGENESIS IN FEMALE RAT HEARTS IN SUCCEEDING GENERATIONS” | 27 |
| 4 | RESULTADO COMPLEMENTAR | 33 |
| 5 | CONCLUSÃO | 34 |
| | REFERÊNCIAS | 35 |
| | ANEXO – COMITÊ DE ÉTICA | 50 |

1 INTRODUÇÃO

Evidências epidemiológicas e experimentais têm mostrado que a deficiência nutricional, durante o período crítico do desenvolvimento de órgãos e sistemas, podem predispor o organismo ao desenvolvimento de doenças como diabetes tipo 2, alguns tipos de cânceres (ASSOCIATION, 2009), hipertensão arterial e doenças cardiovasculares na vida adulta (BARKER, 1999). Além disso, estudos comprovaram que a prole de ratos machos de mães que receberam insultos nutricionais apresentaram uma maior pressão arterial quando comparada a prole adulta que não foi exposta a tais insultos (VILLAR-MARTINI *et al.*, 2009; BARROS *et al.*, 2015; ALVES *et al.*, 2016).

Nesse contexto, entre os mecanismos subjacentes associados, estudos têm sugerido que a desnutrição proteica promove disfunção mitocondrial, levando ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), (SIMMONS, 2005; FERREIRA *et al.*, 2016) e diminuição na defesa antioxidante enzimática e não enzimática (NASCIMENTO *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2017), processo conhecido como estresse oxidativo. Como consequência, pode ocorrer oxidação de biomoléculas tais como lipídios, proteínas e DNA, contribuindo para a perda de funções biológicas (SCHNEIDER, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2014; ALVES *et al.*, 2016; BRAZ *et al.*, 2017). Esses danos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo doenças crônico-degenerativas (AMES *et al.*, 1993) e doenças metabólicas, diabetes tipo 2 e hipertensão (ALVES *et al.*, 2016)

Sabe-se que as mitocôndrias são “usinas” de energia celular relacionadas a manutenção da saúde ou indução de doença. Dessa forma, sua atividade é crucial para o bom funcionamento dos órgãos (NELSON; COX, 2008). Sendo o coração um órgão em ritmo de constante funcionamento, é altamente dependente de energia e suas mitocôndrias ocupam grande parte dos cardiomiócitos (INGWALL, 2002; VENTURA-CLAPIER *et al.*, 2011) produzindo grandes quantidades de ATP para garantir um desempenho cardíaco eficaz.

Recentemente, foi demonstrado que em ratos machos submetidos à desnutrição proteica durante a gestação e lactação na primeira geração (F1), houve disfunção na bioenergética mitocondrial e estresse oxidativo no tecido cardíaco aos 100 dias de vida (NASCIMENTO *et al.*, 2014). No entanto, estudo recente do nosso

grupo de pesquisa observou que a restrição proteica durante a gestação e lactação prejudica o equilíbrio oxidativo do tecido cardíaco em fêmeas com idade não reprodutiva (22 dias de vida). Em contrapartida, nas fêmeas em idade reprodutiva (122 dias de vida) que também sofreram a restrição proteica durante o mesmo período, houve uma redução do estresse oxidativo. Os autores acreditam que esse efeito seja devido aos maiores níveis de estrógeno observados em idade reprodutiva, conferindo assim uma maior proteção no tecido cardíaco de fêmeas (BRAZ *et al.* 2017).

Um possível mecanismo atrelado à baixa incidência de doenças cardíacas em fêmeas reside na capacidade dos estrogênios em combater as espécies reativas de oxigênio, apresentando assim uma propriedade antioxidante reduzindo possíveis efeitos deletérios no metabolismo celular (HALLIWELL; GROOTVELD, 1987). Bellanti *et al.* (2013) mostraram que os estrogênios têm um papel importante na regulação do equilíbrio REDOX, por aumentar a expressão das enzimas antioxidantes e restaurar a capacidade antioxidante (BELLANTI *et al.*, 2013).

Sabe-se que a biogênese mitocondrial é um importante fator para a manutenção dos níveis de ATP em função da demanda de cada órgão e ocorre de maneira natural em nosso organismo, entretanto alguns estímulos são cruciais para uma maior ou menor ativação de biogênese mitocondrial, como o estresse oxidativo (JORNAYVAZ; SHULMAN, 2010). Um regulador chave da biogênese mitocondrial é a AMPK (proteína quinase ativada por AMP) (HARDIE, 2007) e sua expressão está relacionada com a homeostase energética (CARLING, 2004). Bem como a AMPK, PGC-1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gama coactivator 1-alpha*), também contribui para biogênese mitocôndrial e é o regulador da expressão de genes envolvidos nesse processo (PUIGSERVER *et al.*, 1998). PGC-1 α é altamente expresso em órgãos com elevada taxa metabólica e capacidade oxidativa, como o tecido cardíaco (LEHMAN *et al.*, 2000; RIEHLE; ABEL, 2012).

Outro fator essencial para a biogênese mitocondrial é o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), no qual, estudos mostraram que nos cardiomiócitos o TFAM atua beneficiando suas funções celulares como a produção de ATP, além de promover a manutenção, equilíbrio e estabilidade do DNA mitocondrial (DNAMt) (ALAM *et al.*, 2003; EKSTRAND *et al.*, 2004; KANKI *et al.*, 2004) e auxiliar na recuperação de tecidos lesionados (KUNKEL *et al.*, 2016). Segundo Barbosa *et al.*, (2016), a diminuição dos níveis de estradiol, diminui os níveis de PGC1 α e TFAM no tecido

muscular de ratos jovens (BARBOSA *et al.*, 2016). No entanto, ainda há escassez de publicações sobre a influência de insultos nutricionais em estágios iniciais da vida sobre a expressão de importantes fatores de transcrição de biogênese mitocondrial a longo prazo. Assim sendo, hipotetizamos que a restrição proteica materna no período crítico do desenvolvimento é capaz de reduzir os níveis de estresse oxidativo com uma modulação positiva nas defesas antioxidantes de fêmeas da segunda geração (F2) e aumentar a expressão dos indicadores de biogênese mitocondrial. Trazendo como objetivo principal investigar os efeitos da desnutrição proteica durante a gestação e lactação sobre o balanço oxidativo e expressão de fatores de transcrição para biogênese mitocondrial por duas gerações no coração de ratas, permitindo a elaboração do artigo científico intitulado *“Influence of maternal protein malnutrition on oxidative stress and regulators of mitochondrial biogenesis in female rat hearts in succeeding generations”*, o qual foi enviado a revista *Life Science*, com fator de impacto 2,93 e Quallis B1 em Ciências Biológicas II.

- Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da restrição proteica materna por duas gerações seguidas em ratas fêmeas em relação ao balanço oxidativo e a expressão gênica de fatores de transcrição para biogênese mitocondrial no tecido cardíaco.

- Objetivos Específicos

Avaliar em ratas fêmeas F1, F2 re-exposto e F2 Labina, dos grupos controle e desnutrido, aos 30 dias de vida:

- Os níveis dos biomarcadores de estresse oxidativo: Malondialdeído e Carbonilas;
- A atividade das enzimas antioxidantes: Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione-S-Transferase (GST);
- Os níveis de Glutathione reduzida (GSH) e dos grupos de Tióis totais.
- Expressão gênica de AMPK e PGC-1 α .

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Efeitos da desnutrição no tecido cardíaco

A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem reportado um aumento na incidência de doenças crônicas (DCs), entre elas as doenças cardiovasculares, que ainda predominam entre as maiores causas de mortes no mundo (WHO, 2016). Algumas estratégias são propostas afim de combater as DCs, como alimentação adequada e mudanças do estilo de vida que devem ser priorizadas desde o início da vida. Associações entre saúde e baixo peso ao nascer depende do estado nutricional do indivíduo, aumentando a tendência para o surgimento e/ou progressão de doenças metabólicas na idade adulta (BARKER, 1999; GLUCKMAN;HANSON, 2004).

Sendo um dos fatores importantes para a manutenção da saúde, e o perfil nutricional durante a gestação e lactação poderiam influenciar o aparecimento e/ou progressão de DCs. Esse período corresponde ao período crítico do desenvolvimento , no qual se inicia a proliferação e diferenciação de tecidos (DOBBING;SANDS, 1985) sendo associado a gênese de doenças crônicas na vida adulta (REMACLE *et al.*, 2011).

Segundo alguns autores, o insulto nutricional pode ser benéfico a curto prazo dependendo da condição ao qual o indivíduo é submetido, garantindo a sobrevivência da espécie. Porém, a longo prazo pode predispor o aparecimento de doenças como resistência à insulina, obesidade, diabetes tipo 2, hipertensão e doenças cardiovasculares (BARKER, 1999; JAQUET *et al.*, 2000). Essa é uma hipótese/teoria de que doenças metabólicas aparecem tardiamente, mas que são originadas no início da vida, sendo conhecida como Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença ou "*Developmental Origin of Heath and Disease (DOHaD)*". Tal hipótese defende que se durante os períodos iniciais da vida o organismo for exposto a insultos que o acometem direta ou indiretamente, o seu desenvolvimento pode sofrer alterações e levar a consequências funcionais quando adulto (VICKERS, 2011).

O desequilíbrio ocasionado pela restrição alimentar materna resulta na falta de nutrientes para o crescimento e desenvolvimento intrauterino (BERNSTEIN *et al.*, 2000), podendo influenciar nos processos fisiológicos prejudicar o funcionamento dos sistemas e órgãos. Clinicamente, o baixo peso ao nascer já se enquadra como um indicativo forte de pré-disposição do indivíduo para a gênese de patologias na vida adulta como disfunções cardiovasculares, doença renal e hipertensão arterial em

crianças onde o peso ao nascer é inferior a 2.500 g (PAINTER *et al.*, 2005; CHONG; YOSYPIV, 2012).

Estudos epidemiológicos avaliando o eletrocardiograma e ecocardiograma de crianças severamente desnutridas, observaram redução do volume cardíaco indicado pela diminuição do diâmetro interno e da espessura da parede do ventrículo esquerdo (SARAIVA *et al.*, 1992). Mais tarde, pesquisas experimentais mostraram que a restrição proteica durante a gestação leva à diminuição do débito cardíaco, aumento da pressão diastólica e da taxa de apoptose dos cardiomiócitos (CHEEMA *et al.*, 2005; CORSTIUS *et al.*, 2005; VAN ABEELLEN *et al.*, 2012). De Brito Alves, (2014), estudando a prole de ratos submetidos à restrição proteica materna no período crítico de desenvolvimento (gestação e lactação) observaram um aumento na pressão sanguínea em ratos adultos, aumento frequência respiratória basal e pressão arterial (ALVES *et al.*, 2014; BARROS *et al.*, 2015; ALVES *et al.*, 2016) retardo do crescimento e à hipertrofia ventricular cardíaca no final da gestação (VONNAHME *et al.*, 2003).

Postula-se que os problemas cardíacos supracitados sejam induzidos pelo metabolismo energético comprometido (INGWALL, 2009; ROSCA; HOPPEL, 2010) levando ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MAACK;BOHM, 2011). Corroborando com esses achados, Nascimento *et al.*, (2014), observaram, que uma dieta pobre em proteína, (8% de caseína) provocou a disfunção mitocondrial e aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO's) no tecido cardíaco de ratos machos aos 100 dias (NASCIMENTO *et al.*, 2014). Sabe-se que essa associação entre perturbações nutricionais e patologias comprometem o tecido cardíaco, entretando, ainda não foi totalmente elucidados os mecanismos subjacentes desse comprometimento associados à restrição alimentar no início da vida e o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta, decorrentes do excesso ou falta de nutrientes.

2.2 Desnutrição e Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a geração de moléculas oxidantes e o seu combate através dos sistemas antioxidantes (enzimático e não enzimático), (HALLIWELL, 2007). Nas mitocôndrias, a formação de ERO's dá-se continuamente pela cadeia transportadora de elétrons, com anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Estima-se que 2 a 5% do oxigênio consumido pelas mitocôndrias sejam

convertidas em ERO'S de maneira fisiológica no organismo. Entretanto, sua produção em excesso causa o desequilíbrio oxidativo acarretando em estresse oxidativo (HALLIWELL, 2007).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a geração de moléculas oxidantes e o seu combate através dos sistemas antioxidantes (enzimático e não enzimático), (HALLIWELL, 2007). Nas mitocôndrias, a formação de ERO's dá-se continuamente pela cadeia transportadora de elétrons, com anión superóxido ($O_2\bullet$). Estima-se que 2 a 5% do oxigênio consumido pelas mitocôndrias sejam convertidas em ERO'S de maneira fisiológica no organismo. Entretanto, sua produção em excesso causa o desequilíbrio oxidativo acarretando em estresse oxidativo (HALLIWELL, 2007). (HALLIWELL, 2006). Para combater o estresse oxidativo, as defesas antioxidantes, torna-se atuantes nesse processo, como as enzimas superóxido-dismutase – SOD, que age dismutando ânions superóxidos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e a Catalase que possui a capacidade de transformar o H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio (O_2), diminuindo a atividade reativa do peróxido contra as células. Adicionalmente, temos o sistema da família das glutations que são uma importante defesa antioxidante, sendo a Glutathione S-Transferase (GST) responsável pela remoção dos xenobióticos e regulação do estresse oxidativo, e a Glutathione Peroxidase (GPX), que possui função semelhante à catalase, reduzindo o H_2O_2 à H_2O , necessitando para tal da oxidação simultânea da Glutathione Reduzida (GSH); um tiol não proteico celular abundante que participa da defesa antioxidante não enzimática e favorece a regeneração de enzimas antioxidantes, doando grupos de tióis (-SH) e gerando a glutathione Oxidada (GSSG) (BLOKHINA *et al.*, 2003; HALLIWELL, 2006; FUJII *et al.*, 2011).

O estresse oxidativo pode ser induzido por várias condições, como a desnutrição. Esta por sua vez caracterizada por promover a disfunção mitocondrial, aumenta consequentemente a produção de EROS (SIMMONS *et al.*, 2005). Esse desequilíbrio oxidativo tem grande importância no processo de envelhecimento, transformação e morte celular, com consequências diretas em muitos processos patológicos, entre eles, neoplasias, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, estados tóxicos causados pelo álcool, fumo, entre outras (JACOB *et al.*, 2013).

Doenças cardíacas comprometem o metabolismo energético e aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio, (GIORDANO, 2005; NEUBAUER, 2007;

NICKEL *et al.*, 2013) susceptibilizando portanto o tecido cardíaco à disfunções. Estudo do nosso laboratório observou que filhotes de ratos da linhagem *Wistar* cujas as mães receberam dieta hipoproteica (8%) durante a gestação e lactação apresentaram aumento de biomarcadores de estresse oxidativo, com diminuição na atividade de enzimas antioxidantes como a SOD e a GPx no tronco encefálico de ratos aos 22 dias de vida (FERREIRA *et al.*, 2016). Em outros estudos do nosso grupo de pesquisa, verificamos que a prole de ratos adultos (100 dias de vida), apresentaram diminuição da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GST, além de disfunção mitocondrial e indução de estresse oxidativo no tecido cardíaco e no tronco encefálico de ratos machos adultos (NASCIMENTO *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2016) caracterizando desequilíbrio oxidativo. Recentemente, Pedroza *et al.*, (2018), utilizando o mesmo modelo de desnutrição que Nascimento *et al.* (2014) e Ferreira *et al.*, (2016), observaram no rim, o aumento da peroxidação lipídica, e oxidação de proteínas, além da diminuição da defesa antioxidante enzimática e não enzimática em ratos aos 30 dias (PEDROZA *et al.*, 2018).

Com a mesma linha de estudos, Rodriguez-Rodriguez *et al.*, (2015) mostraram aumento da oxidação de proteínas e redução da SOD plasmática em ratas fêmeas desnutridas recém desmamadas e sugeriram a indução do estresse oxidativo (RODRIGUEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2015). Além disso, o estresse oxidativo produzido pela desnutrição neonatal afeta as células germinativas produzindo um envelhecimento prematuro nos ovários (BERNAL *et al.*, 2010). Os efeitos da desnutrição proteica compõem um conjunto de alterações metabólicas que podem predispor o organismo a as disfunções celulares ou não a desencadear as doenças na vida adulta.

2.3 Estrógeno e Cardioproteção

Durante o período reprodutivo as fêmeas produzem hormônios importantes para as características secundárias sexuais e reprodutivas. Dentre os hormônios atuantes nessas características, estão o estrógeno e a progesterona que são produzidos pelos ovários e vêm sendo apontados por suas ações protetoras contra as doenças crônicas degenerativas e cardiovasculares nas fêmeas. Há diversos tipos de estrógenos, sendo os três principais a Estrona (E1), 17- β -Estradiol (E2) e Estriol (E3) que diferem um do

outro no número de grupos hidroxila ou cetonas (RYAN, 1982). O mais conhecido é o E2 predominante nos anos reprodutivos. Esses hormônios podem agir como um mecanismo positivo contra os insultos nutricionais durante a gestação e lactação, além de regular o estresse oxidativo, controle da pressão arterial e o metabolismo mitocondrial (IRWIN *et al.*, 2008).

Acredita-se, que durante o período intrauterino a desnutrição pode acarretar consequências irreversíveis para tecidos e órgãos, sendo igualmente prejudicial para homens e mulheres; entretanto, têm-se visto que estresses induzidos por dietas maternas parecem ser menos grave em mulheres (OZAKI *et al.*, 2001; GRIGORE *et al.*, 2008), uma vez que o estrógeno desempenharia um papel crucial na cardioproteção e função antioxidante (SULLIVAN *et al.*, 1995; MURPHY;STEENBERGEN, 2007; KNOWLTON;KORZICK, 2014).

Neste contexto, Rodriguez-Rodrigues *et al.* (2015) mostraram que aos 180 dias de vida ratos machos desnutridos tornaram-se hipertensos, enquanto as fêmeas de mesma idade permaneceram normotensas (RODRIGUEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2015). Por outro, lado durante a menopausa a ocorrência de hipertensão, acidente vascular cerebral isquêmico, insuficiência cardíaca isquêmica e demência vascular é maior em mulheres em comparação aos homens com a mesma idade, sugerindo que a sobrevivência das mulheres jovens a doenças cardiovasculares se deva aos elevados níveis de estrógenos (ANTONICELLI *et al.*, 1999; PERSKY *et al.*, 2010; BENJAMIN *et al.*, 2017).

Alguns estudos têm sido feito com a reposição hormonal com o objetivo de minimizar os possíveis efeitos causados pela redução do estrógeno, como mostra Hernández *et al.* (2000), que verificaram em ratas ovariectomizadas (OVX) com 150 dias de idade, apresentaram aumento na pressão arterial quando comparado ao grupo com reposição de estrógeno onde os efeitos causados pela ausência de estrógeno foram revertidos (HERNANDEZ *et al.*, 2000; CAMPOS *et al.*, 2014).

É evidente que a deficiência de estrógeno interfere na função de vários órgãos. Assim, Patki *et al.* (2013), também utilizando ratas ovariectomizadas, observou os efeitos da carência do estrógeno em estruturas cerebrais, e verificou no hipocampo de ratas com deficiência de E2 por ovariectomia (OVX), aumento de estresse oxidativo que por sua vez, elevou a pressão arterial, ansiedade e perda de memória (PATKI *et al.*, 2013). A capacidade de cardioproteção do estrógeno se torna cada vez mais clara,

quando verificamos a capacidade antioxidante do estrógeno. Vários trabalhos demonstram em fêmeas que receberam terapia com reposição de estrogênio desempenham um papel importante na regulação do equilíbrio REDOX ao aumentar a expressão de enzimas antioxidantes e reduzir a peroxidação lipídica (TANG *et al.*, 1996; MUNOZ-CASTANEDA *et al.*, 2005; BELLANTI *et al.*, 2013; UNFER *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Estudos adicionais do nosso laboratório mostraram um desequilíbrio oxidativo no tecido cardíaco e no tronco encefálico na prole de fêmeas jovens cuja as mães foram desnutridas na gestação e lactação; entretanto, em descendentes adultas houve uma resistência ao estresse oxidativo, possivelmente devido os níveis de estrógeno aumentados na idade reprodutiva (BRAZ *et al.*, 2017; DE SOUSA *et al.*, 2018).

2.4 Efeitos intergeracionais e Desnutrição

Em diversas espécies de animais as influências ambientais atingem o feto através da placenta ou o neonato através da lactação, promovendo modificações bioquímicas. Porém os indivíduos podem sofrer adaptações fisiológicas que aumentem as chances de sobreviverem naquele meio (SILVEIRA *et al.*, 2007).

Essas adaptações podem não ter um efeito imediato, mas predizem a adaptação a longo prazo, através de efeitos epigenéticos, podendo resistir inclusive de forma transgeracional (CHAMPAGNE;MEANEY, 2001; ZHANG *et al.*, 2006). A herança epigenética transgeracional é definida como herança de linha germinal mediada de informações entre as gerações, na ausência de influências ambientais diretas, que leva a variação fenotípica (SKINNER *et al.*, 2010). Dessa maneira, as moléculas oxidantes podem modificar os padrões de metilação do DNA, modificações de histonas, produzindo mudanças epigenéticas, onde várias gerações serão afetadas por essa herança e reprogramação transgeracional e/ou intergeracional (DRAKE;WALKER, 2004; WU *et al.*, 2004; DUNN *et al.*, 2011; THOMPSON;AL-HASAN, 2012).

Harrison e Langley-Evans (2009) privaram ratas prenhas de proteína (18% vs 9%) e descobriram que os descendentes do grupo com baixa proteína apresentaram pressão arterial mais alta nas duas gerações seguintes. Eles relataram que, apesar do aumento da pressão arterial na prole de ambos os sexos, em animais com

deficiência proteica, as fêmeas F1 tiveram menor pressão arterial do que os machos, corroborando o efeito da cardioproteção do estrogênio. Em F2, no entanto, não foi descrita influência sexual, sendo a pressão arterial aumentada em todos os descendentes de LP até 6 semanas de vida. Torrens *et al.* (2008), utilizando o mesmo protocolo que Harrison e Langley-Evans (2009), relataram que prole de LP na segunda geração (100 dias de vida) também apresentam pressão arterial mais alta, que por sua vez, associa-se à disfunção endotelial (TORRENS *et al.*, 2008; HARRISON;LANGLEY-EVANS, 2009)

Estudos recentes sugerem que as modificações epigenéticas produzidas nos espermatozoides da prole podem ser transmitidas para as células somáticas das próximas gerações, alterando o comportamento, a resposta metabólica e aumentando os fatores de risco das gerações F1 e F2 no desenvolvimento de doenças crônicas (MARTINEZ *et al.*, 2014; RADFORD *et al.*, 2014; GIANATIEMPO *et al.*, 2018). Estudos que utilizaram modelo de desnutrição proteica demonstraram diversos efeitos transgeracionais como em Zamenhof *et al.* (1971) que utilizaram uma restrição durante a gestação, verificaram uma diminuição no número de células cerebrais em F2 (ZAMENHOF *et al.*, 1971). O início da vida representa o período sensível do desenvolvimento do indivíduo, podendo causar alterações, moleculares bioquímicas e fisiológicas que podem prolongar para outras gerações. Atualmente, estudos intergeracionais com desnutrição mostram aumento na oxidação de proteína, peroxidação lipídica e atividade da catalase em ratos de segunda geração (BANOS-GOMEZ *et al.*, 2017).

Como visto acima, a desnutrição no período intrauterino pode provocar alterações a curto ou a longo prazo, que pode ser negativas, resultado em patologias ou adaptativas, sendo capaz de modular os efeitos do insulto nutricional. No entanto ainda são escassos na literatura os efeitos intergeracionais e a possível modulação através dos hormônios femininos.

2.5 Biogênese Mitocondrial e Coração

De acordo com a teoria endossimbiótica, as mitocôndrias eram organismos procariontes que viviam de modo livre, elas foram englobadas por células eucariontes o que resultou em uma relação simbiótica, isso foi de grande benefício para o hospedeiro, uma vez que o procarioto engolfado se tornou o principal responsável

pelo metabolismo energético das células eucarióticas (GRAY *et al.*, 1999; DYALL *et al.*, 2004). As mitocôndrias são organelas-chave na síntese de ATP (“combustível” energético utilizado pelo organismo), desempenhando um papel essencial no metabolismo de forma geral, armazenamento de cálcio, morte celular e homeostase (NELSON; COX. 2008; CHEN *et al.*, 2018)

A quantidade de mitocôndria varia de tecido para tecido e está principalmente relacionada à demanda energética. Sabe-se o ATP utilizado pelo tecido cardíaco é proveniente, principalmente, da β - oxidação de ácido graxos (INGWALL, 2002; VENTURA-CLAPIER *et al.*, 2011). Nos órgãos, ocorre um processo chamado biogênese mitocondrial, o qual desencadeia a produção de novas proteínas mitocondrias e são formadas a partir de divisão de mitocôndrias pré-existentes beneficiando o funcionamento do organismo (UITTENBOGAARD;CHIARAMELLO, 2014; LI *et al.*, 2017). A biogênese mitocondrial acontece de natural no organismo, no entanto, estímulos ou fatores como exercício físico, hipóxia, deficiência de ATP e insultos nutricionais são necessários para aumentar a expressão e/ou co - ativação de fatores relevantes para biogênese mitocondrial (EKSTRAND *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2011; KUNKEL *et al.*, 2016)

Tais fatores como o AMPK (Proteína Kinase Ativada por AMP), um regulador importante da biogênese mitocondrial em resposta ao déficit energético, em conjunto com o PGC1- α (Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama coactivator 1-alpha), que também é bastante expresso em órgãos com alta demanda energética, metabolismo oxidativo elevado e a alta β -oxidação de ácidos graxos como o tecido cardíaco que requer grande quantidade de energia (PATTEN;ARANY, 2012; PIQUEREAU *et al.*, 2017).

Estudos com restrição calórica observaram que a curto prazo a expressão de AMPK aumenta no tecido cardíaco de ratos jovens, mas a longo prazo sua atividade era inalterada (SHINMURA *et al.*, 2005). Evidência aponta que a AMPK tem um papel relevante nas condições de estresse cardíaco ou como um sensor de energia celular para proteção cardiovascular e doenças correlacionadas (DYCK;LOPASCHUK, 2006). A AMPK é considerada um importante alvo terapêutico para o tratamento de doenças metabólicas, incluindo diabetes tipo 2 e obesidade (DYCK;LOPASCHUK, 2006; KIM *et al.*, 2011).

A PGC1 α também pode estimular a biogênese mitocondrial ativando um grupo de fatores de transcrição, como o fator respiratório nuclear 1 (NRF1), que interage no DNA para estimular a transcrição de genes mitocondriais, como o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), regulador da replicação e transcrição do DNA mitocondrial (KELLY;SCARPULLA, 2004; MCGEE;HARGREAVES, 2008; PICCA;LEZZA, 2015). Estudo em animais com disfunção cardíaca verificou a reduzida expressão de PGC1 α , demonstrando assim que a PGC1 α é um regulador crucial do metabolismo oxidativo (LEHMAN *et al.*, 2000). Em outro estudo, foi observado que em camundongos *knockouts* para PGC-1 α houve desenvolvimento de sintomas precoces de insuficiência cardíaca, comprovando a importância do PGC-1 α como um fator normatizador da função cardiovascular (LEHMAN *et al.*, 2000; ARANY *et al.*, 2005).

Sabe-se que o TFAM é um importante regulador gênico mitocondrial que é produzido no núcleo celular e transportado para mitocôndria, também age na produção de células cardíacas, manutenção e reparo do DNAm. Acredita-se que através da regulação dos níveis de TFAM, os co-ativadores de PGC-1 α podem controlar a expressão de proteínas codificadas pelo mtDNA (EKSTRAND *et al.*, 2004; SCARPULLA, 2008; PICCA; LEZZA, 2015). A superexpressão de TFAM eleva o número de cópias de mtDNA, e age protegendo o tecido cardíaco dos efeitos maléficos da isquemia/reperfusão (KANKI *et al.*, 2004).

Quando há estresse oxidativo no tecido cardíaco, os níveis de TFAM são restabelecidos afim de aumentar a biogênese mitocondrial e a função dos cardiomiócitos, entretanto, existe a redução do TFAM, quando ocorre disfunção mitocondrial, sugerindo que o TFAM contribui para o mecanismo de reparo celular e participa de mecanismos compensatórios na cardioproteção durante estresses (ALAM *et al.*, 2003; KUNKEL *et al.*, 2016). A ausência do TFAM especificamente no tecido cardíaco resulta em uma diminuição significativa na capacidade de transporte de elétrons e cardiomiopatia espontânea, em contrapartida, a superexpressão de TFAM dentro do tecido cardíaco oferece proteção contra a insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio (IKEUCHI *et al.*, 2005; HOKARI *et al.*, 2010) .

Esses dados em conjunto apontam a importância da integridade da mitocôndria, bem como da biogênese mitocondrial para a proteção contra doenças cardiológicas. Apesar dos relatos da literatura, até o presente momento, não há estudos que buscam entender os efeitos em curto e longo prazo da restrição proteica

de modo intergeracional, no que se refere a efeitos oxidativos e moleculares no tecido cardíaco de fêmeas jovens.

3 “INFLUENCE OF MATERNAL PROTEIN MALNUTRITION ON OXIDATIVE STRESS AND REGULATORS OF MITOCHONDRIAL BIOGENESIS IN FEMALE RAT HEARTS IN SUCCEEDING GENERATIONS”

Life Sciences 232 (2019) 116579



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

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



Influence of maternal protein malnutrition on oxidative stress and regulators of mitochondrial biogenesis in female rat hearts over succeeding generations



Severina Cássia Andrade Silva^a, Glauber Rudá Feitoza Braz^b,
Luciana Caroline Paulino do Nascimento^c, David Filipe Santana^b,
Anderson Apolonio da Siva Pedroza^a, Tercya Lucidi Araujo Silva^b, Mariana Pinheiro Fernandes^d,
Donald F. Selliti^e, Claudia Jacques Lagranha^{a,b,*}

^a Biochemistry and Physiology Graduate Program, Universidade Federal de Pernambuco -UFPE, Recife, PE, Brazil

^b Neuropsychiatry and Behavior Science Graduate Program, Universidade Federal de Pernambuco -UFPE, Recife, PE, Brazil

^c Nutrition Sciences Graduate Program, Universidade Federal da Paraíba-UFPB, João Pessoa, PB, Brazil

^d Nutrition, Physical Activity and Phenotypic Plasticity Graduate Program, Universidade Federal de Pernambuco –UFPE/CAV, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

^e Department of Medicine, USUHS, Bethesda, MD, USA

ARTICLE INFO

Keywords:
Intergenerational
Malnutrition
Mitochondrial biogenesis
Female
Heart

ABSTRACT

Aims: We sought to evaluate the effects of maternal protein restriction (LP) on oxidative balance and transcription factors for mitochondrial biogenesis in the hearts of young female rats of both the first (F1) and second (F2) generation.

Main methods: We evaluated oxidative stress biomarkers (lipid peroxidation and protein oxidation), enzymatic antioxidant defense (activity of superoxide dismutase-SOD, catalase, and glutathione-S-transferase-GST), nonenzymatic antioxidant defense (reduced glutathione-GSH and sulfhydryl groups) and gene expression of AMPK, PGC-1 α and TFAM.

Key findings: Interestingly, lipid peroxidation was decreased (49%, $p < 0.001$) in the LP-F1 group and 59% ($p < 0.001$) in LP-F2. In enzymatic defense, we observed increases in SOD activity in the LP-F1 group (79%, $p = 0.036$) and in CAT activity (approximately 40%, $p = 0.041$). GSH was increased in F2 in both groups (LP 546%, $p < 0.0001$ and in NP 491.7%, $p < 0.0001$). With respect to mitochondrial biogenesis gene transcription, we observed a decrease in AMPK (60%, $p < 0.0001$) and an increase in PGC-1 α (340%, $p < 0.001$) in LP compared to NP in the F1 generation. TFAM was decreased in LP-F2L compared to NP-F2L (42%, $p = 0.0069$) and increased in LP-F2 compared to LP-F1 (160%, $p = 0.0037$).

Significance: Our study contributes to knowledge of inheritance, showing that despite the potential mitochondrial ‘inheritance’ of cardiovascular damage caused by maternal malnutrition, that damage is not cross-generational and can be eliminated with proper nutrition in the F1 generation.

1. Introduction

Nutritional deficiency during pregnancy and lactation has been shown to predispose the first generation to development of lifelong metabolic and cardiovascular disease [1,2]. According to WHO, by 2030, nearly 23.6 million people will die from cardiovascular disease (CVD) [3], primarily in developing countries that are most affected by poor maternal diet. Experimental studies on protein restriction have been linked to increased incidence of metabolic disease in the offspring of undernourished mothers and to long-lasting impairments in mitochondrial function [4]. These include increased generation of reactive

oxygen species (ROS) in central and peripheral tissues, including the brainstem and heart, as we previously demonstrated in the F1 generation of male rats born to malnourished mothers [5,6]. Oxidative stress, in turn, alters the structure and function of both lipids and proteins [7], which contributes directly to cardiac injury [8]. Our research group has also recently shown that females are less susceptible to oxidative stress induced by maternal low-protein (LP) diet than are males [9], suggesting that in reasonable concentrations, estrogen may act as an antioxidant to reduce the risk of cardiac disease [10]. Its protective effect may be related to the removal of free radicals [11] and to its transcriptional regulation of antioxidant enzymes that contribute to

* Correspondent author at: Rua Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE 55608-680, Brazil.

E-mail addresses: lagranha@hotmail.com, claudia.lagranha@ufpe.br (C.J. Lagranha).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116579>

Received 12 February 2019; Received in revised form 14 June 2019; Accepted 14 June 2019

Available online 25 June 2019

0024-3205/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

mitochondrial dynamics [12].

Mitochondria are the primary organelles responsible for cellular energy supply, and both their number and their capacity for ATP generation generally correspond to energy demands. In the heart, mitochondria comprise an especially high percentage (34%) of cardiomyocyte volume to accommodate the high energetic demands of this organ [13,14], which are achieved through the activities of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α). This master regulator of mitochondrial biogenesis [15] is highly expressed in cardiac tissue due to the actions of intra- and extracellular factors, including ROS and AMP-activated protein kinase (AMPK) [16].

There is evidence that alterations in mitochondrial biogenesis coactivators, such as PGC-1 α contribute to the emergence of a number of metabolic and neurodegenerative diseases due to the impairment in energy regulation [17–19]. According to Kemper et al., estrogen can stimulate mitochondrial biogenesis and favors oxidative balance through ROS regulation [20]. In addition, Barbosa et al. [21] showed that lower estradiol levels decrease PGC-1 α and TFAM expression in the muscle of young rats.

Nutritional deficits during pregnancy affect maternal mitochondria, and these changes are expected to extend through the next generation since females are responsible for the passage of mitochondrial DNA to offspring. Therefore, regulatory molecules that affect bioenergetics, including transcription factors, could be damaged by maternal malnutrition and passed to the next generation without undergoing repair [22]. Although such metabolic-related consequences have received considerable attention, there is a scarcity of literature investigating the effects of maternal protein restriction on metabolic impairments in subsequent generations, examining cardiac mitochondrial biogenesis as a possible cross-generational effect. In this study, we sought to evaluate the effects of maternal protein restriction on oxidative balance and transcription factors for mitochondrial biogenesis in the hearts of young female rats of both F1 and F2 generations.

2. Materials and methods

2.1. Animals and diet

The present study was approved by the local Ethics Committee for animal experimentation from the Biosciences Center of the Federal University of Pernambuco (Process number: 0026/2017). Manipulation and animal care of animals followed the recommendations of the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* from the National Institutes of Health. Eight pregnant *Wistar* rats were divided into two groups according to diet: normoprotein (NP, 17% casein) and low-protein (LP, 8% casein) [23]. Rats were mated 2 females:1 male and received their respective diets during gestation and lactation. At weaning (21 days of age), offspring received commercial chow (Presence) and water ad libitum. Some of the female offspring were sacrificed at 30 days for molecular and biochemical analysis and consisted of two groups of the first generation (F1): NP-F1 (n = 5 per group) and LP-F1 groups (n = 5 per group). The rest of the female offspring were bred at 70 days of age at the same ratio mentioned above to generate the second generation (F2). Pregnant rats though the F1 generation were re-exposed or not to the nutritional insult, composing four new groups: F2 re-exposed to NP and LP diets (NP-F2, n = 6 per group and LP-F2, n = 6 per group) and F2 fed commercial chow (Labina) (NP-F2L n = 6 per group and LP-F2L, n = 6 per group). Only the female offspring of these groups were sacrificed at 30 days of age for biochemical and molecular analysis. A schematic representation of the experimental design is shown in Fig. 1.

2.2. Tissue collection and homogenization

At 30 days of age, female rats from both F1 and F2 generations were used for cardiac tissue collection, and the left ventricles were homogenized in cold extraction buffer (100 mM Tris base, pH 7.4; 1 mM

EDTA; 10 mM sodium orthovanadate; 2 mM phenylmethylsulfonyl-fluoride (PMSF); 1% Nonidet). After homogenization, samples were centrifuged at 4 °C at 1180 \times g for 10 min, and supernatants were used for protein quantification according to the Bradford method [24].

2.3. Oxidative stress biomarkers

Lipid peroxidation was evaluated by measuring malondialdehyde formation (MDA) according to Buege [25]. Results are expressed as mmol TBARS/mg of protein. Protein oxidation was evaluated by incubation of samples with guanidine hydrochloride according to Levine [26]. Absorbance was measured spectrophotometrically at 380 nm, and data are expressed as mmol carbonyl/mg of protein.

2.4. Enzymatic defense

Superoxide dismutase (SOD) activity was evaluated using auto-oxidation of epinephrine according Misra [27]. Catalase (CAT) activity was evaluated according to Aebi [28] at 240 nm. Glutathione-S-transferase (GST) was evaluated according to Habig [29]. All results are expressed as U/mg protein.

2.5. Non-enzymatic defense

Reduced glutathione (GSH) content was measured using the method of Hissin and Hilf [30]. Fluorescence intensity was measured using a spectrofluorimeter at 355 nm excitation and 460 nm emission. A standard GSH curve with known concentrations was used for calibration. Results are expressed as μ mol/mg protein.

Quantification of sulfhydryl (total thiol) groups was based on the reduction of 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Absorbance at 412 nm was measured and results are expressed as mmol/mg protein [31].

2.6. mRNA evaluation

Total RNA was extracted from heart tissues using TRIzol reagent and the guanidine isothiocyanate method [32] according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA pellets were washed in 75% ethanol and centrifuged at 7500 \times g for 5 min at 4 °C, air-dried and dissolved in DEPC-treated ultrapure water. RNA quantification was performed in a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, US), and purity was assessed using the ratio of 260/280 nm absorbance [33]. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) experiments for β 2-microglobulin (β 2M), AMPK, PGC1- α and TFAM genes were performed using the SuperScript[®] III Platinum[®] SYBR[®] Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, USA) [34]. Samples (n = 5 per group) were processed in duplicate, and the cycle threshold (Ct) values of each targeted gene were normalized to the β 2M Ct determined in an identical sample. Relative mRNA expression was determined using the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method [35] (Table 1).

2.7. Statistical analysis

All data were analyzed for normality of distribution by the Kolmogorov-Smirnov test followed by two-way ANOVA and Tukey's test to assess differences among groups. Data are expressed as the mean \pm SEM and differences were considered significant at p < 0.05 for all analyses. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1. Oxidative stress biomarkers

MDA (Fig. 2A) was decreased by 49% in the LP-F1 group compared

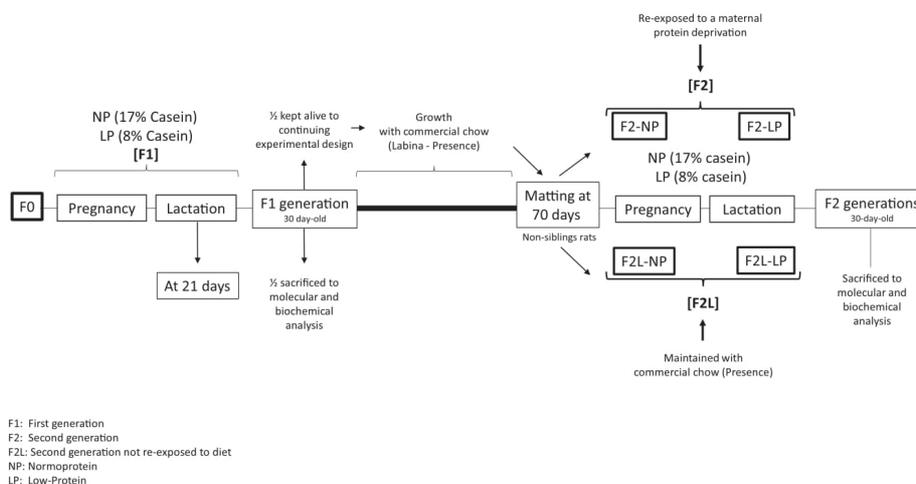


Fig. 1. Schematic representation of the experimental model.

to the NP-F1 group ($p < 0.001$). In the F2 generation, MDA was reduced by 59% in the LP-F2 group compared to the NP-F2 group ($p < 0.001$) (Fig. 2A). In contrast, F2L offspring of either LP or NP group exhibited no differences in MDA levels between NP and LP as in the parent generation. MDA levels in the NP-F2L group, however, were reduced by 64% ($p > 0.0001$) and 53% ($p = 0.0067$), respectively, compared to NP-F1 and NP-F2 groups.

There were no significant differences in protein oxidation induced by diet when comparing LP vs NP animals in their respective generations. However, there were significant differences in protein oxidation in both F2 generations compared to F1 animals. Strikingly, carbonyl content in the F2 groups was significantly lower than in F1 and F2L groups when comparing NP and LP animals to their respective counterparts in the other generations, and in the F2L groups, carbonyl content was significantly higher than in their counterparts in the F1 generation (Fig. 2B).

3.2. Enzymatic antioxidant defense

There was a 79% increase in SOD activity in the LP-F1 group compared to the NP-F1 group ($p = 0.036$) (Fig. 3A). However, this difference did not persist into the F2 generation, regardless of diet. With respect to differences between generations, NP-F2 and LP-F2 groups showed significantly increased SOD activity compared to their respective F1 groups (Fig. 3A). Similar to SOD, CAT activity was significantly increased by approximately 40% in the LP-F1 group compared to the NP-F1 group ($p = 0.023$). Additionally, similar to SOD results, differences in CAT between offspring born to LP-F1 and NP-F1 mothers, respectively, were eliminated in the F2 generation. Furthermore, in both F2-L groups (LP-F2L and NP-F2L), CAT levels were

significantly lower than in their respective F2 counterparts (LP-F2 and NP-F2) (Fig. 3B). GST activity was no difference between LP and NP animals in either the F1 or F2 generations. However, GST in the NP-F2L group was increased 6-fold compared to NP-F1 ($p < 0.0001$). GST was also decreased by a similar amount in LP-F2 compared to LP-F2L ($p < 0.0001$) (Fig. 3C).

3.3. Nonenzymatic antioxidant defense

GSH content was increased in LP-F2 by 546% compared to LP-F1 ($p < 0.0001$) and increased in NP-F2 by 491% compared to NP-F1 ($p < 0.0001$) (Fig. 4A). Moreover, there was a small but significant increase in GSH in LP-F2 animals compared to NP-F2 animals (11%, $p = 0.019$). The F2L group showed no difference compared to the F1 group (Fig. 4A). Total thiol groups did not differ between diets in the F1 generation (Fig. 4B) but were significantly increased in LP compared to NP in F2 animals (73%, $p = 0.028$). In addition, both F2 groups exhibited significantly reduced thiol content compared to their respective F2L groups (42%, $p = 0.021$).

3.4. Regulation of factors involved in mitochondrial biogenesis

AMPK was significantly reduced (60%, $p < 0.0001$) by LP compared to NP in the F1 generation but not in animals from F2 generations. However, both F2 and F2L animals possessed significantly reduced AMPK content compared to their respective LP counterparts in the F1 generation (Fig. 5A). Concerning regulation of PGC-1 α expression by maternal protein deprivation (Fig. 5B), our results revealed that LP-F1 and LP-F2L had significantly higher levels of this transcription factor than NP-F1 (340%, $p < 0.0001$) and NP-F2L (89%, $p = 0.0009$)

Table 1
 Primers used to PCRs analyze.

| Gene | Forward sequence (5' to 3') | Reverse sequence (5' to 3') | Temp (°C) |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------|
| $\beta 2M$ | TGACCGTGATCTTCTGGTG | ACTTGAATTTGGGAGTTTCTG | 48.0 |
| AMPK | ACCATTTAACCTGGCCTCAC | TTGCTCTACACACTTCTGCC | 48.0 |
| PGC-1 α | AACAGCAAAAGCCACAAAGA | AAGTTGTTGGTTGGCTTGA | 48.0 |
| TFAM | TCTCATGATGAAAAGCAGGCA | GAGATCACTTCGCCCAACTT | 48.0 |

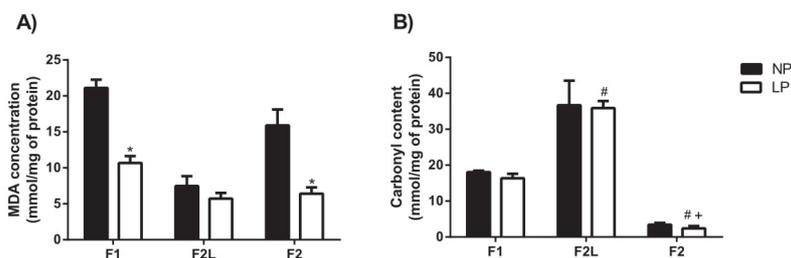


Fig. 2. Levels of lipid peroxidation (A) and protein oxidation (B) in hearts of 30-day-old female rats of F1, F2L and F2 groups. Values are presented as the mean \pm SEM compared using two-way ANOVA. *p < 0.05 vs NP of the respective group; #p < 0.05 vs LP-F1; +p < 0.05 vs LP-F2L. LP = low protein group; NP = normoprotein group; F1 = first generation; F2L = second generation without protein deprivation re-exposure; F2 = second generation with protein deprivation re-exposure.

animals. Contrary to the results in F1 animals, LP-F2 animals exhibited decreased PGC-1 α (21%, $p = 0.0258$), but levels were still increased compared to LP-F1 animals (83%, $p > 0.0001$). TFAM expression was decreased in LP-F2L animals compared to NP-F2L animals (42%, $p = 0.0069$) and was increased in LP-F2 compared to LP-F1 (160%, $p = 0.0037$) (Fig. 5C).

4. Discussion

4.1. Effect on oxidative stress

In marked contrast to our earlier findings with male rats born to and nursed by dams on either an LP or NP diet [6], we observed decreased lipid peroxidation (approximately 50%) in LP offspring from F1 and F2 generations compared to NP offspring from the same generation.

Remarkably, the same LP regimen significantly elevated oxidized lipid levels by approximately 50% compared to respective NP controls in male offspring [6]. Another study from our group [9] seemed to indicate distinct estrogen levels between males and females as an explanation for this difference. In that study, we observed that newly weaned female rats from the LP group showed a 2-fold increase in MDA levels [9]. However, at maturity, female offspring of the LP group exhibited decreased MDA levels (50%) compared to the NP group. Our present results suggest that they reflect the effect of a maternal LP diet on MDA in fully mature rats with elevated estradiol levels, rather than the effect in weanlings with much lower levels of estrogen.

Continuation of the LP diet into the F2 generation, in turn, maintained the reduction in lipid peroxidation. In contrast, F2L animals from either LP or NP mothers did not present lipid peroxidation when compared to each other. These results suggest that the effects of

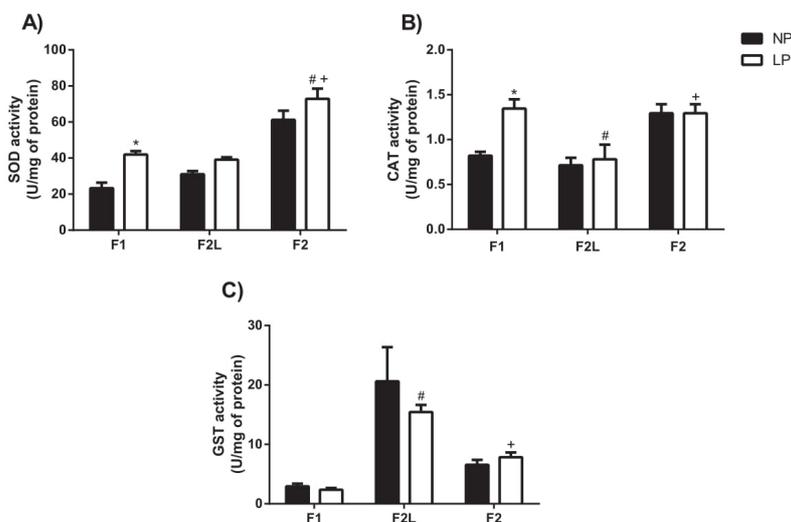


Fig. 3. Enzymatic antioxidant activity. Superoxide dismutase (SOD) activity (A), catalase (CAT) activity (B) and glutathione-S-Transferase (GST) activity (C) in the hearts of 30-day-old female rats from F1, F2L and F2 groups. Values are presented as the mean \pm SEM compared using two-way ANOVA. *p < 0.05 vs NP of the respective group; #p < 0.05 vs LP-F1; +p < 0.05 vs LP-F2L. LP = low protein group; NP = normoprotein group; F1 = first generation; F2L = second generation without protein deprivation re-exposure; F2 = second generation with protein deprivation re-exposure.

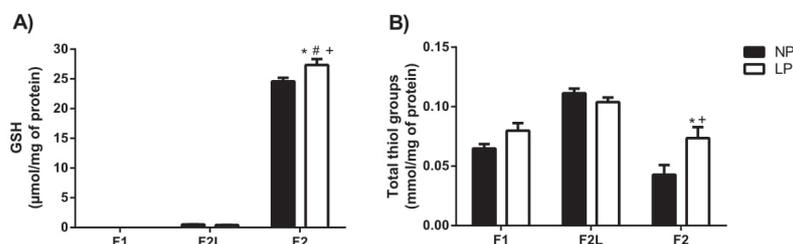


Fig. 4. Nonenzymatic antioxidant defense. Levels of reduced glutathione (GSH) (A) and total thiol groups (B) in the heart of 30-day-old female rats of F1, F2L and F2 groups. Values are presented as the mean \pm SEM compared using two-way ANOVA. * $p < 0.05$ vs NP of respective group; # $p < 0.05$ vs LP-F1; + $p < 0.05$ vs LP-F2L. LP = low protein group; NP = normoprotein group; F1 = first generation; F2L = second generation without protein deprivation re-exposure; F2 = second generation with protein deprivation re-exposure.

maternal LP on lipid peroxidation evident in first generation offspring are not continued into the next generation (F2) unless the low protein diet is maintained in F1 individuals. In fact, our results fail to support an intergenerational effect of maternal LP on most of the oxidative parameters that we examined, as significant differences in those parameters observed in the F1 generation were eliminated in the F2L generation. Specifically, significant differences in MDA, SOD and catalase activity between F1 animals from LP or NP mothers were eliminated in the F2 generation when their F1 mothers were returned to standard chow diet. This would suggest that despite the matrilineal inheritance of most mitochondria, damage to the health of individuals born from malnourished mothers was not continued into the next generation when their inadequate diet was corrected.

Protein oxidation as measured by carbonyl levels did not differ with respect to diet in either the F1 or F2 groups. These results disagree with those of Banos-Gomez, who showed that protein carbonylation was significantly increased by in utero malnutrition in rat hearts. One possible reason for this discrepancy is that Banos-Gomez used mixed male/female groups in their studies, whereas our experimental and control groups were entirely composed of females and therefore, were presumably exposed to the protective effects of estrogen [9,36]. Supporting this idea, we previously demonstrated that carbonyl content was increased by about two-fold in weanling female rats from LP mothers and were unchanged in female offspring born to LP mothers when measured in adulthood after high estrogen levels had been achieved [9].

In addition, nonenzymatic antioxidant defenses as measured by GSH level and thiol groups in the F1 offspring did not differ between LP and NP offspring. Remarkably, however, nonenzymatic defenses were significantly increased in F2 rats raised in an LP maternal background compared to those raised in an NP background, possibly because of

exposure to an LP environment for two generations. GSH content was increased only slightly in LP-F2 compared to NP-F2, but thiol content was increased by $> 50\%$. These data suggest that even with possible damage from the LP diet over two generations in a row, the LP environment may have induced a compensatory increase in nonenzymatic defenses that helped ameliorate further oxidative damage.

4.2. Effects on mitochondrial biogenesis

AMPK is a cellular energy manager that controls energetic homeostasis and signaling in the heart [39]. AMPK was significantly reduced in F1-LP compared to F1-NP, suggesting that offspring of the malnourished females lost the positive effect induced by AMPK activation [40], but this reduction in AMPK may be compensated for or modulated by increased PGC1 α expression.

Maintenance of mitochondrial function in response to fluctuating energy demands depends on adequate mitochondrial biogenesis or production of new mitochondria, which can be coactivated by peroxisome proliferator-activated receptor coactivator alpha (PGC-1 α) [37]. PGC-1 α is highly expressed in organs with high energy demand, elevated oxidative metabolism and high β -oxidation of fatty acids, such as the heart [38]. PGC-1 α was up regulated in LP-F2L and LP-F2 groups compared to LP-F1L. Increased mitochondrial biosynthesis in response to PGC-1 α elevation could help compensate for LP-induced damage in both F1 and F2 offspring who were returned to a normal diet (F2L) after being born to malnourished mothers. Given that re-exposure of F2 animals to the LP environment had distinct effects when compared between generations or nutritional insult, TFAM expression was assessed to better understand our data.

We showed that LP-F2L animals exhibited reduced TFAM expression compared to NP-F2L and LP-F2 animals with increased TFAM

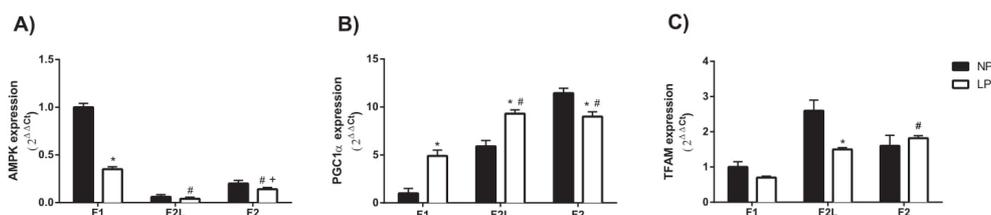


Fig. 5. Gene expression of AMPK (A), PGC-1 α (B) and TFAM (C) in the hearts of 30-day-old female rats of F1, F2L and F2 groups. Values are presented as the mean \pm SEM compared using two-way ANOVA. * $p < 0.05$ vs NP of the respective group; # $p < 0.05$ vs LP-F1; + $p < 0.05$ vs LP-F2L. LP = low protein group; NP = normoprotein group; F1 = first generation; F2L = second generation without protein deprivation re-exposure; F2 = second generation with protein deprivation re-exposure.

expression compared to LP-F1. Taken together, our data suggest that PGC-1 α may have temporal effects in inducing mitochondrial biogenesis promoter responses. By the time of mRNA evaluation, TFAM expression may no longer be necessary for mitochondrial biogenesis stimulation in LP-F2L animals, suggesting positive adaptation to nutritional re-establishment. In addition, even with the decrease of PGC-1 α levels in LP-F2 animals, TFAM remained at the same level as the control group, suggesting that mitochondrial biogenesis may play a crucial role in the defense of cardiac tissue.

5. Conclusions

The present results suggest that nutritional insult during the critical early period of development encompassing gestation and nursing does not induce oxidative stress in the heart of female rats, possibly due to the protective effect of estrogen. In addition, low maternal protein levels sustained across two generations resulted in significant upregulation of antioxidant defenses that were not activated in the earlier generation. Taken together, our study suggests that despite the potential mitochondrial 'inheritance' of cardiovascular damage caused by maternal malnutrition, damage is not cross generational and can be eliminated with proper nutrition in the F1 generation.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgments

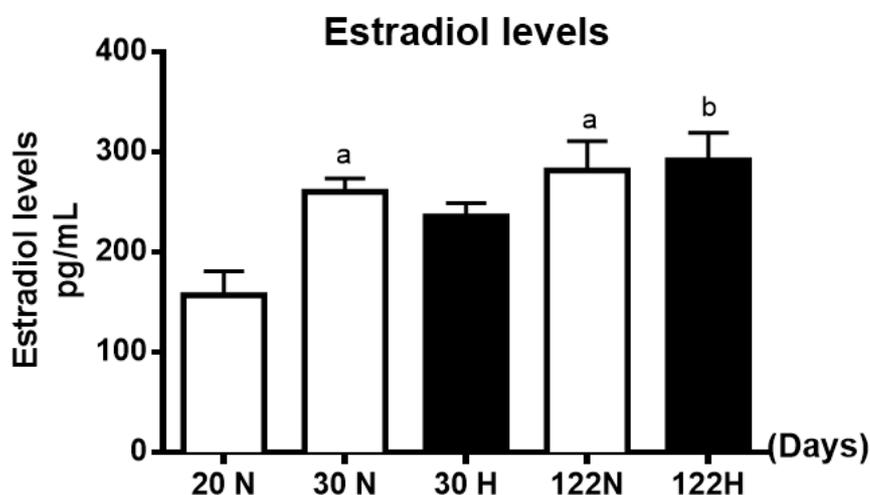
This study was funded in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. The authors are thankful for support provided by the FACEPE grant (APQ-0164-4.05/15) and by CNPq-Universal (408403/2016-0). The funders had no role in study design, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- [1] D.J. Barker, Early growth and cardiovascular disease, *Arch. Dis. Child.* 80 (1999) 305–307.
- [2] P.D. Gluckman, M.A. Hanson, Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective, *Pediatr. Res.* 56 (2004) 311–317.
- [3] W. H. O. WHO, Health Topics Malnutrition, (2016).
- [4] C. Jousse, Y. Muranishi, L. Parry, et al., Perinatal protein malnutrition affects mitochondrial function in adult and results in a resistance to high fat diet-induced obesity, *PLoS One* 9 (2014) e104896.
- [5] D.J.S. Ferreira, A.A. da Silva Pedroza, G.R.F. Braz, et al., Mitochondrial bioenergetics and oxidative status disruption in brainstem of weaned rats: immediate response to maternal protein restriction, *Brain Res.* 1642 (2016) 553–561.
- [6] L. Nascimento, C.M. Freitas, R. Silva-Filho, 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.* 39 (2014) 880–887.
- [7] B. Halliwell, Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis, *Br. J. Exp. Pathol.* 70 (1989) 737–757.
- [8] J.L. Zweier, M.A. Talukder, The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury, *Cardiovasc. Res.* 70 (2006) 181–190.
- [9] G.R.F. Braz, A.S. Emiliano, S.M. Sousa, et al., Maternal low-protein diet in female rat heart: possible protective effect of estradiol, *J. Dev. Orig. Health Dis.* 8 (2017) 322–330.
- [10] C. Angeloni, G. Teti, M.C. Barbalace, et al., 17 β -estradiol enhances sulforaphane cardioprotection against oxidative stress, *J. Nutr. Biochem.* 42 (2017) 26–36.
- [11] M.B. Ruiz-Larrea, A.R. Mohan, G. Paganga, et al., Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones, *Free Radic. Res.* 26 (1997) 63–70.
- [12] C. Borrás, J. Gambini, M.C. Gomez-Cabrera, et al., 17 β -estradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2(MAPK)/NF κ B cascade, *Aging Cell* 4 (2005) 113–118.
- [13] R. Ventura-Clapier, A. Garnier, V. Veksler, et al., Bioenergetics of the failing heart, *Biochim. Biophys. Acta* 1813 (2011) 1360–1372.
- [14] R. Ferrari, A. Cargnoni, C. Ceconi, Anti-ischaemic effect of ivabradine, *Pharmacol. Res.* 53 (2006) 435–439.
- [15] W. Di, J. Lv, S. Jiang, et al., PGC-1: the energetic regulator in cardiac metabolism, *Curr. Issues Mol. Biol.* 28 (2018) 29–46.
- [16] A. Thirupathi, C.T. de Souza, Multi-regulatory network of ROS: the interconnection of ROS, PGC-1 alpha, and AMPK-SIRT1 during exercise, *J. Physiol. Biochem.* 73 (2017) 487–494.
- [17] S.P. Singh, J.A. McClung, L. Bellner, et al., CYP-450 epoxigenase derived epoxyeicosatrienoic acid contribute to reversal of heart failure in obesity-induced diabetic cardiomyopathy via PGC-1 alpha activation, *Cardiovasc. Pharm. Open Access* 7 (2018).
- [18] C. Carvalho, S. Cardoso, S.C. Carreira, et al., Metabolic alterations induced by sucrose intake and Alzheimer's disease promote similar brain mitochondrial abnormalities, *Diabetes* 61 (2012) 1234–1242.
- [19] C. Handschin, B.M. Spiegelman, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism, *Endocr. Rev.* 27 (2006) 728–735.
- [20] M.F. Kemper, C. Strone, D.N. Krause, et al., Genomic and non-genomic regulation of PGC1 isoforms by estrogen to increase cerebral vascular mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species protection, *Eur. J. Pharmacol.* 723 (2014) 322–329.
- [21] M.R. Barbosa, G.E. Shigemoto, L.M. Tomaz, et al., Resistance training and ovariectomy: antagonistic effects in mitochondrial biogenesis markers in rat skeletal muscle, *Int. J. Sports Med.* 37 (2016) 841–848.
- [22] T.L. Bale, Lifetime stress experience: transgenerational epigenetics and germ cell programming, *Dialogues Clin. Neurosci.* 16 (2014) 297–305.
- [23] P. G. Reeves, F. H. Nielsen, 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.* 123 (1993) 1939–1951.
- [24] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [25] J.A. Buege, S.D. Aust, Microsomal lipid peroxidation, *Methods Enzymol.* 52 (1978) 302–310.
- [26] R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver, et al., Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 464–478.
- [27] H.P. Misra, I. Fridovich, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 3170–3175.
- [28] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126.
- [29] W.H. Habig, W.B. Jakoby, Glutathione S-transferases (rat and human), *Methods Enzymol.* 77 (1981) 218–231.
- [30] P.J. Hissin, R. Hilf, A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues, *Anal. Biochem.* 74 (1976) 214–226.
- [31] M.Y. Aksenov, W.R. Markesbery, Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 302 (2001) 141–145.
- [32] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156–159.
- [33] C.J. Lagranha, S.M. Hirabara, R. Curi, et al., Glutamine supplementation prevents exercise-induced neutrophil apoptosis and reduces p38 MAPK and JNK phosphorylation and p53 and caspase 3 expression, *Cell Biochem. Funct.* 25 (2007) 563–569.
- [34] A.I. da Silva, G.R.F. Braz, S.C.A. Silva, et al., Body composition, biochemical, behavioral and molecular alterations in overfed rats after chronic exposure to SSRI, *Behav. Brain Res.* 356 (2019) 62–70.
- [35] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} method, *Methods* 25 (2001) 402–408.
- [36] S.M. de Sousa, G.R.F. Braz, C.M. Freitas, et al., Oxidative injuries induced by maternal low-protein diet in female brainstem, *Nutr. Neurosci.* (2017) 1–9.
- [37] C. Liu, J.D. Lin, PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism, *Acta Biochim. Biophys. Sin. Shanghai* 43 (2011) 248–257.
- [38] J.J. Lehman, P.M. Barger, A. Kovacs, et al., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis, *J. Clin. Invest.* 106 (2000) 847–856.
- [39] M. Arad, C.E. Seidman, J.G. Seidman, AMP-activated protein kinase in the heart: role during health and disease, *Circ. Res.* 100 (2007) 474–488.
- [40] H.L. Dong, H.Y. Wu, Y. Tang, et al., AMPK regulates mitochondrial oxidative stress in C2C12 myotubes induced by electrical stimulations of different intensities, *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 38 (2018) 742–747.

4 RESULTADO COMPLEMENTAR

Figura 6 - Níveis de estradiol em soro de ratas aos 20, 30 e 122 dias de idade que foram submetidas a dieta Normoproteica (NP, 17 % de proteína, n:4) ou Hipoprotéica (HP, 8% de proteína, n:4) durante a gestação e lactação na primeira geração (F1). *a* – foi considerada diferença significativa entre o grupo NP com 30 ou 122 dias de vida quando comparado com o grupo NP aos 20 dias de vida; *b* - foi considerada diferença significativa entre o grupo HP com 30 ou 122 dias de vida quando comparado com o grupo NP aos 20 dias de vida ($p < 0.005$; teste t de Student não pareado).



5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados expostos, sugerimos que a desnutrição proteica materna durante o início da vida não prejudica o balanço oxidativo no tecido cardíaco de fêmeas aos 30 dias. Acreditamos que a presença do hormônio feminino, estrógeno, age contribuindo com a modulação positiva na defesa antioxidante, proporcionando ao organismo o equilíbrio oxidativo, fato observado mesmo na presença dos insultos sofridos após duas gerações, e garantindo, portanto uma resistência de modo intergeracional, bem como a modulação positiva na expressão gênica da biogênese mitocondrial.

REFERÊNCIAS

ALAM, T. I. *et al.* Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. **Nucleic Acids Res**, Oxford, v. 31, n. 6, p. 1640-5, Mar 15 2003. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking).
Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12626705> >.
Acesso em: 22/01/2017

AMES, H. G.; GEE, M. I.; HAWRYSH, Z. J. Taste perception and breast cancer: evidence of a role for diet. **J Am Diet Assoc**, New York, v. 93, n. 5, p. 541-6, May 1993. ISSN 0002-8223 (Print) 0002-8223 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8315163> >.
Acesso em: 02/08/2017

ANTONICELLI, R.; GESUITA, R.; PACIARONI, E. Sexual dimorphism in arterial hypertension: an age-related phenomenon. **Arch Gerontol Geriatr**, Amsterdam, v. 29, n. 3, p. 283-9, Nov-Dec 1999. ISSN 0167-4943 (Print) 0167-4943 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15374061> >.
Acesso em: 30/11/2017

ARANY, Z. *et al.* Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. **Cell Metab**, Cambridge, v. 1, n. 4, p. 259-71, Apr 2005. ISSN 1550-4131 (Print) 1550-4131 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16054070> >.
Acesso em: 23/04/2018

HANSON, M. *et al.* **Early Life Nutrition and Lifelong Health**. [Londres]: British Medical Association, 2009.
Acesso em: 13/06/2018

BANOS-GOMEZ, R. *et al.* Undernutrition in the parental and first generation provokes an organ-specific response to oxidative stress on neonates of second filial generation of Wistar rats. **J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)**, Berlim, v. 101, n. 2, p. 267-274, Apr 2017. ISSN 1439-0396 (Electronic) 0931-2439 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27561464> >.
Acesso em: 27/10/2018

BARBOSA, M. R. *et al.* Resistance Training and Ovariectomy: Antagonistic Effects in Mitochondrial Biogenesis Markers in Rat Skeletal Muscle. **Int J Sports Med**, Stuttgart, v. 37, n. 11, p. 841-8, Oct 2016. ISSN 1439-3964 (Electronic) 0172-4622 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27428645> >.
Acesso em: 15/12/2018

BARKER, D. J. Early growth and cardiovascular disease. **Arch Dis Child**, London, v. 80, n. 4, p. 305-7, Apr 1999. ISSN 1468-2044 (Electronic) 0003-9888 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10086930> >.
Acesso em: 15/09/2018

BARROS, M. A. *et al.* Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 123-30, Jan 2015. ISSN 1590-3729 (Electronic) 0939-4753 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25287449> >.
Acesso em: 13/06/2018

BELLANTI, F. *et al.* Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: impact of estrogen therapy. **Redox Biol**, Amsterdam, v. 1, p. 340-6, 2013. ISSN 2213-2317 (Electronic) 2213-2317 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24024169> >.
Acesso em: 07/09/2018

BENJAMIN, E. J. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, Hagerstown, v. 135, n. 10, p. e146-e603, Mar 7 2017. ISSN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28122885> >.
Acesso em: 14/12/2018

BERNAL, A. B. *et al.* Maternal undernutrition significantly impacts ovarian follicle number and increases ovarian oxidative stress in adult rat offspring. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 12, p. e15558, Dec 13 2010. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21179452> >.
Acesso em: 17/11/2018

BERNSTEIN, I. M. *et al.* Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network. **Am J Obstet Gynecol**, New York, v. 182, n. 1 Pt 1, p. 198-206, Jan 2000. ISSN 0002-9378 (Print) 0002-9378 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10649179> >.
Acesso em: 13/06/2018

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Ann Bot**, Oxford, v. 91 Spec No, p. 179-94, Jan 2003. ISSN 0305-7364 (Print) 0305-7364 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12509339> >.
Acesso em: 27/12/2018

BRAZ, G. R. F. *et al.* Maternal low-protein diet in female rat heart: possible protective effect of estradiol. **J Dev Orig Health Dis**, Cambridge, v. 8, n. 3, p. 322-330, Jun 2017. ISSN 2040-1752 (Electronic) 2040-1744 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28264755> >.

Acesso em: 13/06/2018

CAMPOS, C. *et al.* Low-dose estrogen is as effective as high-dose treatment in rats with postmenopausal hypertension. **J Cardiovasc Pharmacol**, Hagerstown, v. 63, n. 2, p. 144-51, Feb 2014. ISSN 1533-4023 (Electronic) 0160-2446 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24157955> >.

Acesso em: 21/10/2018

CARLING, D. The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. **Trends Biochem Sci**, Cambridge, v. 29, n. 1, p. 18-24, Jan 2004. ISSN 0968-0004 (Print)

0968-0004 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14729328> >.

Acesso em: 04/10/2018

CHAMPAGNE, F.; MEANEY, M. J. Like mother, like daughter: evidence for non-genomic transmission of parental behavior and stress responsivity. **Prog Brain Res**, Amsterdam, v. 133, p. 287-302, 2001. ISSN 0079-6123 (Print) 0079-6123 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11589138> >.

Acesso em: 27/10/2018

CHEEMA, K. K. *et al.* Prenatal exposure to maternal undernutrition induces adult cardiac dysfunction. **Br J Nutr**, Wallingford, Oxon, v. 93, n. 4, p. 471-7, Apr 2005. ISSN 0007-1145 (Print)

0007-1145 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15946408> >.

Acesso em: 29/12/2018

CHEN, W. *et al.* The phenotype of peritoneal mouse macrophages depends on the mitochondria and ATP/ADP homeostasis. **Cell Immunol**, Amsterdam, v. 324, p. 1-7, Feb 2018. ISSN 1090-2163 (Electronic)

0008-8749 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29129293> >.

Acesso em: 02/12/2018

CHONG, E.; YOSYPIV, I. V. Developmental programming of hypertension and kidney disease. **Int J Nephrol**, New York, v. 2012, p. 760580, 2012. ISSN 2090-2158 (Electronic).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23251800> >.

Acesso em: 27/10/2018

CORSTIUS, H. B. *et al.* Effect of intrauterine growth restriction on the number of cardiomyocytes in rat hearts. **Pediatr Res**, New York, v. 57, n. 6, p. 796-800, Jun 2005. ISSN 0031-3998 (Print) 0031-3998 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15774830> >.
Acesso em: 17/12/2018

ALVES, J. L. de B. *et al.* Maternal protein restriction induced-hypertension is associated to oxidative disruption at transcriptional and functional levels in the medulla oblongata. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, Oxford, v. 43, n. 12, p. 1177-1184, Dec 2016. ISSN 1440-1681 (Electronic) 0305-1870 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27612187> >.
Acesso em: 27/10/2018

ALVES, J. L. de B. *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**, Wallingford, Oxon, v. 111, n. 4, p. 606-15, Feb 2014. ISSN 1475-2662 (Electronic) 0007-1145 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24059468> >.
Acesso em: 21/09/2018

DE SOUSA, S. M. *et al.* Oxidative injuries induced by maternal low-protein diet in female brainstem. **Nutr Neurosci**, v. 21, n. 8, p. 580-588, Oct 2018. ISSN 1476-8305 (Electronic) 1028-415X (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28494696> >.
Acesso em: 13/06/2018

DOBBING, J.; SANDS, J. Cell size and cell number in tissue growth and development. An old hypothesis reconsidered. **Arch Fr Pediatr**, Abingdon, v. 42, n. 3, p. 199-203, Mar 1985. ISSN 0003-9764 (Print) 0003-9764 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4004482> >.
Acesso em: 22/01/2017

DRAKE, A. J.; WALKER, B. R. The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. **J Endocrinol**, Bristol, v. 180, n. 1, p. 1-16, Jan 2004. ISSN 0022-0795 (Print) 0022-0795 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14709139> >.
Acesso em: 26/12/2018

DUNN, G. A.; MORGAN, C. P.; BALE, T. L. Sex-specificity in transgenerational epigenetic programming. **Horm Behav**, New York, v. 59, n. 3, p. 290-5, Mar 2011. ISSN 1095-6867 (Electronic) 0018-506X (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20483359> >.
Acesso em: 27/10/2018

DYALL, S. D.; BROWN, M. T.; JOHNSON, P. J. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. **Science**, Washington, v. 304, n. 5668, p. 253-7, Apr 9 2004. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15073369> >.

Acesso em: 11/06/2018

DYCK, J. R.; LOPASCHUK, G. D. AMPK alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally? **J Physiol**, Oxford, v. 574, n. Pt 1, p. 95-112, Jul 1 2006. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16690706> >.

Acesso em: 27/11/2018

EKSTRAND, M. I. *et al.* Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. **Hum Mol Genet**, Oxford, v. 13, n. 9, p. 935-44, May 1 2004. ISSN 0964-6906 (Print)

0964-6906 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15016765> >.

Acesso em: 27/06/2017

FERREIRA, D. J. S. *et al.* Mitochondrial bioenergetics and oxidative status disruption in brainstem of weaned rats: Immediate response to maternal protein restriction. **Brain Res**, Amsterdam Elsevier, v. 1642, p. 553-561, Jul 1 2016. ISSN 1872-6240 (Electronic)

0006-8993 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27109594> >.

Acesso em: 27/10/2018

FUJII, J. *et al.* Unveiling the roles of the glutathione redox system in vivo by analyzing genetically modified mice. **J Clin Biochem Nutr**, Mitake, v. 49, n. 2, p. 70-8, Sep 2011. ISSN 1880-5086 (Electronic)

0912-0009 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21980221> >.

Acesso em: 29/12/2018

GIANATIEMPO, O. *et al.* Intergenerational transmission of maternal care deficiency and offspring development delay induced by perinatal protein malnutrition. **Nutr Neurosci**, Abingdon, p. 1-11, Aug 18 2018. ISSN 1476-8305 (Electronic)

1028-415X (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30124115> >.

Acesso em: 27/10/2018

GIORDANO, F. J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. **J Clin Invest**, Ann Arbor, v. 115, n. 3, p. 500-8, Mar 2005. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15765131> >.

Acesso em: 21/09/2018

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. **Pediatr Res**, New York, v. 56, n. 3, p. 311-7, Sep 2004. ISSN 0031-3998 (Print) 0031-3998 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15240866> >.
Acesso em: 21/09/2018

GRAY, M. W.; BURGER, G.; LANG, B. F. Mitochondrial evolution. **Science**, Washington, v. 283, n. 5407, p. 1476-81, Mar 5 1999. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066161> >.
Acesso em: 27/10/2018

GRIGORE, D.; OJEDA, N. B.; ALEXANDER, B. T. Sex differences in the fetal programming of hypertension. **Gend Med**, Hillsborough, v. 5 Suppl A, p. S121-32, 2008. ISSN 1550-8579 (Print) 1550-8579 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18395678> >.
Acesso em: 1/11/2018

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**, Rockville, v. 141, n. 2, p. 312-22, Jun 2006. ISSN 0032-0889 (Print) 0032-0889 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16760481> >.
Acesso em: 1/11/2018

_____. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem Soc Trans**, London, v. 35, n. Pt 5, p. 1147-50, Nov 2007. ISSN 0300-5127 (Print) 0300-5127 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17956298> >.
Acesso em: 12/11/2018

HARDIE, D. G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. **Nat Rev Mol Cell Biol**, London, v. 8, n. 10, p. 774-85, Oct 2007. ISSN 1471-0080 (Electronic) 1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17712357> >.
Acesso em: 13/12/2018

HARRISON, M.; LANGLEY-EVANS, S. C. Intergenerational programming of impaired nephrogenesis and hypertension in rats following maternal protein restriction during pregnancy. **Br J Nutr**, Wallingford, v. 101, n. 7, p. 1020-30, Apr 2009. ISSN 1475-2662 (Electronic) 0007-1145 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18778527> >.
Acesso em: 27/07/2018

HERNANDEZ, I. *et al.* 17beta-estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, Bethesda, v. 279, n. 5, p. R1599-605, Nov 2000. ISSN 0363-6119 (Print) 0363-6119 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11049841> >.

Acesso em: 20/07/2018

HOKARI, M. *et al.* Overexpression of mitochondrial transcription factor A (TFAM) ameliorates delayed neuronal death due to transient forebrain ischemia in mice. **Neuropathology**, Melbourne, v. 30, n. 4, p. 401-7, Aug 2010. ISSN 1440-1789 (Electronic)

0919-6544 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20102525> >.

Acesso em: 23/10/2018

IKEUCHI, M. *et al.* Overexpression of mitochondrial transcription factor a ameliorates mitochondrial deficiencies and cardiac failure after myocardial infarction. **Circulation**, Hagerstown, v. 112, n. 5, p. 683-90, Aug 2 2005. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16043643> >.

Acesso em: 11/11/2018

INGWALL, J. S. Is creatine kinase a target for AMP-activated protein kinase in the heart? **J Mol Cell Cardiol**, London, v. 34, n. 9, p. 1111-20, Sep 2002. ISSN 0022-2828 (Print)

0022-2828 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12392883> >.

Acesso em: 22/01/2017

_____. Energy metabolism in heart failure and remodelling. **Cardiovasc Res**, Oxford, v. 81, n. 3, p. 412-9, Feb 15 2009. ISSN 1755-3245 (Electronic) 0008-6363 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18987051> >.

Acesso em: 22/01/2017

IRWIN, R. W. *et al.* Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. **Endocrinology**, New York v. 149, n. 6, p. 3167-75, Jun 2008. ISSN 0013-7227 (Print)

0013-7227 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18292191> >.

Acesso em: 26/11/2018

JACOB, K. D. *et al.* Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. **Mech Ageing Dev**, Limerick, v. 134, n. 3-4, p. 139-57, Mar 2013. ISSN 1872-6216 (Electronic)

0047-6374 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23428415> >.

Acesso em: 1/11/2018

JAQUET, D. *et al.* Insulin resistance early in adulthood in subjects born with intrauterine growth retardation. **J Clin Endocrinol Metab**, New York, v. 85, n. 4, p. 1401-6, Apr 2000. ISSN 0021-972X (Print)
0021-972X (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10770173> >.
Acesso em: 23/04/2018

JORNAYVAZ, F. R.; SHULMAN, G. I. Regulation of mitochondrial biogenesis. **Essays Biochem**, v. 47, p. 69-84, 2010. ISSN 1744-1358 (Electronic)
0071-1365 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20533901> >.
Acesso em: 24/11/2018

KANKI, T. *et al.* Architectural role of mitochondrial transcription factor A in maintenance of human mitochondrial DNA. **Mol Cell Biol**, London v. 24, n. 22, p. 9823-34, Nov 2004. ISSN 0270-7306 (Print)
0270-7306 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15509786> >.
Acesso em: 10/11/2018

KELLY, D. P.; SCARPULLA, R. C. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. **Genes Dev**, Cold Spring Harbor, v. 18, n. 4, p. 357-68, Feb 15 2004. ISSN 0890-9369 (Print)
0890-9369 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15004004> >.
Acesso em: 1/11/2018

KIM, A. S. *et al.* A small molecule AMPK activator protects the heart against ischemia-reperfusion injury. **J Mol Cell Cardiol**, London, v. 51, n. 1, p. 24-32, Jul 2011. ISSN 1095-8584 (Electronic)
0022-2828 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21402077> >.
Acesso em: 29/12/2018

KNOWLTON, A. A.; KORZICK, D. H. Estrogen and the female heart. **Mol Cell Endocrinol**, Limerick, v. 389, n. 1-2, p. 31-9, May 25 2014. ISSN 1872-8057 (Electronic)
0303-7207 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24462775> >.
Acesso em: 1/12/2018

KUNKEL, G. H.; CHATURVEDI, P.; TYAGI, S. C. Mitochondrial pathways to cardiac recovery: TFAM. **Heart Fail Rev**, Norwell, v. 21, n. 5, p. 499-517, Sep 2016. ISSN 1573-7322 (Electronic)
1382-4147 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27166683> >.
Acesso em: 26/12/2018

LEHMAN, J. J. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. **J Clin Invest**, Ann Arbor, v. 106, n. 7, p. 847-56, Oct 2000. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11018072> >.

Acesso em: 13/11/2018

LI, P. A.; HOU, X.; HAO, S. Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration. **J Neurosci Res**, New York, v. 95, n. 10, p. 2025-2029, Oct 2017. ISSN 1097-4547 (Electronic)

0360-4012 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28301064> >.

Acesso em: 10/11/2018

MAACK, C.; BOHM, M. Targeting mitochondrial oxidative stress in heart failure throttling the afterburner. **J Am Coll Cardiol**, v. 58, n. 1, p. 83-6, Jun 28 2011. ISSN 1558-3597 (Electronic)

0735-1097 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21620605> >.

Acesso em: 05/09/2018

MARTINEZ, D. *et al.* In utero undernutrition in male mice programs liver lipid metabolism in the second-generation offspring involving altered Lxra DNA methylation. **Cell Metab**, New York, v. 19, n. 6, p. 941-51, Jun 3 2014. ISSN 1932-7420 (Electronic)

1550-4131 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24794974> >.

Acesso em: 18/10/2018

MCGEE, S. L.; HARGREAVES, M. AMPK and transcriptional regulation. **Front Biosci**, Searington, v. 13, p. 3022-33, Jan 1 2008. ISSN 1093-9946 (Print) 1093-4715 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981775> >.

Acesso em: 17/11/2018

MUNOZ-CASTANEDA, J. R. *et al.* Effect of 17-beta-estradiol administration during adriamycin-induced cardiomyopathy in ovariectomized rat. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v. 523, n. 1-3, p. 86-92, Oct 31 2005. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16225861> >.

Acesso em: 4/01/2019

MURPHY, E.; STEENBERGEN, C. Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia-reperfusion injury. **Cardiovasc Res**, Oxford, v. 75, n. 3, p. 478-86, Aug 1 2007. ISSN 0008-6363 (Print) 0008-6363 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17466956> >.

Acesso em: 15/10/2017

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. ISSN 1715-5320 (Electronic) 1715-5312 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24905448> >.

Acesso em: 29/11/2018

NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger**: Princípios de Bioquímica. 3ed. São Paulo: Sarvier, 2008.

Acesso em: 16/11/2017

NEUBAUER, S. The failing heart--an engine out of fuel. **N Engl J Med**, Boston, v. 356, n. 11, p. 1140-51, Mar 15 2007. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360992> >.

Acesso em: 30/11/2018

NICKEL, A.; LOFFLER, J.; MAACK, C. Myocardial energetics in heart failure. **Basic Res Cardiol**, Darmstadt, v. 108, n. 4, p. 358, Jul 2013. ISSN 1435-1803 (Electronic) 0300-8428 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23740216> >.

Acesso em: 23/11/2018

OLIVEIRA, M. C. *et al.* A Long-term Estrogen Deficiency in Ovariectomized Mice is Associated with Disturbances in Fatty Acid Oxidation and Oxidative Stress. **Rev Bras Ginecol Obstet**, São Paulo, v. 40, n. 5, p. 251-259, May 2018. ISSN 1806-9339 (Electronic) 0100-7203 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29913542> >.

Acesso em: 19/11/2018

OZAKI, T. *et al.* Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. **J Physiol**, Oxford, v. 530, n. Pt 1, p. 141-52, Jan 1 2001. ISSN 0022-3751 (Print) 0022-3751 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11136866> >.

Acesso em: 22/11/2018

PAINTER, R. C.; ROSEBOOM, T. J.; BLEKER, O. P. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. **Reprod Toxicol**, Elmsford Ny, v. 20, n. 3, p. 345-52, Sep-Oct 2005. ISSN 0890-6238 (Print) 0890-6238 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15893910> >.

Acesso em: 17/11/2018

PATKI, G. *et al.* Grape powder intake prevents ovariectomy-induced anxiety-like behavior, memory impairment and high blood pressure in female Wistar rats. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e74522, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24040270> >.

Acesso em: 15/12/2018

PATTEN, I. S.; ARANY, Z. PGC-1 coactivators in the cardiovascular system. **Trends Endocrinol Metab**, New York, v. 23, n. 2, p. 90-7, Feb 2012. ISSN 1879-3061 (Electronic) 1043-2760 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22047951> >.
Acesso em: 02/08/2017

PEDROZA, A. *et al.* Both Maternal Low-Protein and Neonatal Overnutrition Result in Similar Changes to Glomerular Morphology and Renal Cortical Oxidative Stress Measures in Male Wistar Rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, Ottawa, v. Jul 30 2018. ISSN 1715-5320 (Electronic) 1715-5312 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30058348> >.
Acesso em: 10/11/2018

PERSKY, R. W.; TURTZO, L. C.; MCCULLOUGH, L. D. Stroke in women: disparities and outcomes. **Curr Cardiol Rep**, Philadelphia, v. 12, n. 1, p. 6-13, Jan 2010. ISSN 1534-3170 (Electronic) 1523-3782 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20425178> >.
Acesso em: 10/11/2018

PICCA, A.; LEZZA, A. M. Regulation of mitochondrial biogenesis through TFAM-mitochondrial DNA interactions: Useful insights from aging and calorie restriction studies. **Mitochondrion**, Amsterdam, v. 25, p. 67-75, Nov 2015. ISSN 1872-8278 (Electronic) 1567-7249 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26437364> >.
Acesso em: 1/11/2018

PIQUEREAU, J. *et al.* Cobalamin and folate protect mitochondrial and contractile functions in a murine model of cardiac pressure overload. **J Mol Cell Cardiol**, London, v. 102, p. 34-44, Jan 2017. ISSN 1095-8584 (Electronic) 0022-2828 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27876471> >.
Acesso em: 12/01/2018

PUIGSERVER, P. *et al.* A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell**, Cambridge, v. 92, n. 6, p. 829-39, Mar 20 1998. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529258> >.
Acesso em: 25/11/2018

RADFORD, E. J. *et al.* In utero effects. In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism. **Science**, Washington, v. 345, n. 6198, p. 1255903, Aug 15 2014. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25011554> >.
Acesso em: 11/12/2018

REMACLE, C. *et al.* Developmental programming of adult obesity and cardiovascular disease in rodents by maternal nutrition imbalance. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v. 94, n. 6 Suppl, p. 1846S-1852S, Dec 2011. ISSN 1938-3207 (Electronic) 0002-9165 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21543546> >.
Acesso em: 24/11/2018

RIEHLE, C.; ABEL, E. D. PGC-1 proteins and heart failure. **Trends Cardiovasc Med**, New York, v. 22, n. 4, p. 98-105, May 2012. ISSN 1873-2615 (Electronic) 1050-1738 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22939990> >.
Acesso em: 1/11/2018

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, P. *et al.* Fetal undernutrition is associated with perinatal sex-dependent alterations in oxidative status. **J Nutr Biochem**, New York, v. 26, n. 12, p. 1650-9, Dec 2015. ISSN 1873-4847 (Electronic) 0955-2863 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26350253> >.
Acesso em: 21/12/2018

ROSCA, M. G.; HOPPEL, C. L. Mitochondria in heart failure. **Cardiovasc Res**, Oxford, v. 88, n. 1, p. 40-50, Oct 1 2010. ISSN 1755-3245 (Electronic) 0008-6363 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20668004> >.
Acesso em: 22/11/2018

RYAN, K. J. Postmenopausal estrogen use. **Annu Rev Med**, Palo Alto, California, v. 33, p. 171-81, 1982. ISSN 0066-4219 (Print) 0066-4219 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7081959> >.
Acesso em: 14/11/2018

SARAIVA, L. R.; BRINDEIRO FILHO, D.; NORA, A. D. [The heart in the child with severe protein-calorie malnutrition]. **Arq Bras Cardiol**, Sao Paulov. 58, n. 5, p. 353-7, May 1992. ISSN 0066-782X (Print) 0066-782X (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1340707> >.
Acesso em: 1/11/2018

SCARPULLA, R. C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. **Physiol Rev**, Bethesda, v. 88, n. 2, p. 611-38, Apr 2008. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18391175> >.
Acesso em: 1/12/2018

SCHNEIDER CD, O. A. **Oxygen and exercise free radicals: mechanisms of training and adaptation to physical training**. RBME, Niteroi, v. 10, n.4, p. 10, 2004.

Acesso em: 23/04/2018

SHINMURA, K.; TAMAKI, K.; BOLLI, R. Short-term caloric restriction improves ischemic tolerance independent of opening of ATP-sensitive K⁺ channels in both young and aged hearts. **J Mol Cell Cardiol**, London, v. 39, n. 2, p. 285-96, Aug 2005. ISSN 0022-2828 (Print)

0022-2828 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15878170> >.

Acesso em: 1/11/2018

SILVEIRA, P. P. *et al.* Developmental origins of health and disease (DOHaD). **J Pediatr (Rio J)**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 6, p. 494-504, Nov-Dec 2007. ISSN 0021-7557 (Print)

0021-7557 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18074050> >.

Acesso em: 11/11/2018

SIMMONS, R. A.; SUPONITSKY-KROYTER, I.; SELAK, M. A. Progressive accumulation of mitochondrial DNA mutations and decline in mitochondrial function lead to beta-cell failure. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 280, n. 31, p. 28785-91, Aug 5 2005. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15946949> >.

Acesso em: 23/04/2018

SKINNER, M. K.; MANIKKAM, M.; GUERRERO-BOSAGNA, C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. **Trends Endocrinol Metab**, New York, v. 21, n. 4, p. 214-22, Apr 2010. ISSN 1879-3061 (Electronic)

1043-2760 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20074974> >.

Acesso em: 1/11/2018

SULLIVAN, T. R., JR. *et al.* Estrogen inhibits the response-to-injury in a mouse carotid artery model. **J Clin Invest**, Ann Arbor, v. 96, n. 5, p. 2482-8, Nov 1995. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7593638> >.

Acesso em: 02/08/2017

TANG, M. *et al.* Superior and distinct antioxidant effects of selected estrogen metabolites on lipid peroxidation. **Metabolism**, Philadelphia, v. 45, n. 4, p. 411-4, Apr 1996. ISSN 0026-0495 (Print)

0026-0495 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8609824> >.

Acesso em: 02/08/2017

THOMPSON, L. P.; AL-HASAN, Y. Impact of oxidative stress in fetal programming. **J Pregnancy**, Cairo, v. 2012, p. 582748, 2012. ISSN 2090-2735 (Electronic) 2090-2727 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22848830> >.

Acesso em: 23/04/2018

TORRENS, C.; POSTON, L.; HANSON, M. A. Transmission of raised blood pressure and endothelial dysfunction to the F2 generation induced by maternal protein restriction in the F0, in the absence of dietary challenge in the F1 generation. **Br J Nutr**, Wallingford, v. 100, n. 4, p. 760-6, Oct 2008. ISSN 1475-2662 (Electronic)

0007-1145 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18304387> >.

Acesso em: 13/11/2018

UITTENBOGAARD, M.; CHIARAMELLO, A. Mitochondrial biogenesis: a therapeutic target for neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases. **Curr Pharm Des**, Saif Zone, v. 20, n. 35, p. 5574-93, 2014. ISSN 1873-4286

(Electronic)

1381-6128 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24606804> >.

Acesso em: 1/11/2018

UNFER, T. C. *et al.* Estrogen plus progestin increase superoxide dismutase and total antioxidant capacity in postmenopausal women. **Climacteric**, London, v. 18, n. 3, p. 379-88, Jun 2015. ISSN 1473-0804 (Electronic)

1369-7137 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25236970> >.

Acesso em: 1/11/2018

VAN ABEELLEN, A. F. *et al.* The fetal origins of hypertension: a systematic review and meta-analysis of the evidence from animal experiments of maternal undernutrition. **J Hypertens**, London, v. 30, n. 12, p. 2255-67, Dec 2012. ISSN 1473-5598 (Electronic)

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22990358> >.

Acesso em: 1/11/2018

VENTURA-CLAPIER, R. *et al.* Bioenergetics of the failing heart. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1813, n. 7, p. 1360-72, Jul 2011. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20869993> >.

Acesso em: 1/11/2018

VICKERS, M. H. Developmental programming of the metabolic syndrome - critical windows for intervention. **World J Diabetes**, Pleasanton, v. 2, n. 9, p. 137-48, Sep 15 2011. ISSN 1948-9358 (Electronic)

1948-9358 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21954418> >.

Acesso em: 27/10/2018

VILLAR-MARTINI, V. C. *et al.* Hypertension and kidney alterations in rat offspring from low protein pregnancies. **J Hypertens Suppl**, London, v. 27, n. 6, p. S47-51, Aug 2009. ISSN 1747-3667 (Electronic) 0952-1178 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19633452> >.
Acesso em: 27/10/2018

VONNAHME, K. A. *et al.* Maternal undernutrition from early- to mid-gestation leads to growth retardation, cardiac ventricular hypertrophy, and increased liver weight in the fetal sheep. **Biol Reprod**, New York, v. 69, n. 1, p. 133-40, Jul 2003. ISSN 0006-3363 (Print) 0006-3363 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12606329> >.
Acesso em: 21/09/2018

WHO, W. H. O. Health topics malnutrition 2016.
Acesso em: 02/10/2017

WU, G. *et al.* Maternal nutrition and fetal development. **J Nutr**, Rockville, v. 134, n. 9, p. 2169-72, Sep 2004. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15333699> >.
Acesso em: 30/11/2017

ZAMENHOF, S.; VAN MARTHENS, E.; GRAUEL, L. DNA (cell number) in neonatal brain: second generation (F2) alteration by maternal (F0) dietary protein restriction. **Science**, Washington, v. 172, n. 3985, p. 850-1, May 21 1971. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5572908> >.
Acesso em: 21/09/2018

ZHANG, T. Y. *et al.* Maternal programming of defensive responses through sustained effects on gene expression. **Biol Psychol**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 72-89, Jul 2006. ISSN 0301-0511 (Print) 0301-0511 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16513241> >.
Acesso em: 30/11/2017

ANEXO – COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

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, 08 de novembro de 2017.

Ofício nº 112/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Claudia Jacques Lagranha**
Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte
Centro Acadêmico de Vitória
Universidade Federal de Pernambuco
Processo *online* nº **0026/2017**

Certificamos que a proposta intitulada “**Efeitos oxidativos e moleculares da restrição proteica materna por duas gerações no tecido cardíaco**”, registrada com o nº **0026/2017**, sob a responsabilidade de Prof.ª **Claudia Jacques Lagranha** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 08/11/2017.

| | |
|-------------------------|---|
| Finalidade | () Ensino (X) Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | 08/11/2017 a 02/07/2019 |
| Espécie/linhagem/raça | Ratos heterogênicos Wistar |
| Nº de animais | 108 |
| Peso/Idade | 150-200g (progenitores) e 100g (prole) / 70-80 dias (progenitores) e 16 e 32 dias (prole) |
| Sexo | Machos (4) e fêmeas (104) |
| Origem | Biotério do Centro de Biociências/UFPE |