



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

AIANY CIBELLE SIMÕES ALVES

**EFEITOS DE UMA DIETA RICA EM ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS SOBRE A
BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL, BALANÇO OXIDATIVO E METABOLISMO
HEPÁTICO DE RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTEICA
PERINATAL**

Recife

2021

AIANY CIBELLE SIMÕES ALVES

**EFEITOS DE UMA DIETA RICA EM ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS SOBRE A
BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL, BALANÇO OXIDATIVO E METABOLISMO
HEPÁTICO DE RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTEICA
PERINATAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título Doutor em Nutrição, área de concentração Bases Experimentais da Nutrição.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Carol Virgínia Gois Leandro

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariana Pinheiro Fernandes

Recife

2021

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Rodrigo Leopoldino Cavalcanti I, CRB4-1855

A474e Alves, Aiany Cibelle Simões.
 Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre a
 bioenergética mitocondrial, balanço oxidativo e metabolismo hepático de
 ratos submetidos à desnutrição proteica perinatal / Aiany Cibelle Simões
 Alves. – 2021.
 143 f. : il. ; tab. ; 30 cm.

 Orientadora : Carol Virgínia Gois Leandro.
 Coorientadora : Mariana Pinheiro Fernandes.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
 Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2021.

 Inclui referências e anexo.

 1. Dieta Hiperlipídica. 2. Radicais Livres. 3. Inflamação. 4. Restrição
 Proteica. 5. Programação Metabólica. I. Leandro, Carol Virgínia Gois
 (Orientadora). II. Fernandes, Mariana Pinheiro (Coorientadora). III. Título.

613 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2022-220)

AIANY CIBELLE SIMÕES ALVES

**EFEITOS DE UMA DIETA RICA EM ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS SOBRE A
BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL, BALANÇO OXIDATIVO E METABOLISMO
HEPÁTICO DE RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTEICA
PERINATAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título Doutor em Nutrição, área de concentração Bases Experimentais da Nutrição.

Aprovado em: 30/06/2021 **BANCA EXAMINADORA**

Prof.^a. Dr.^a. Carol Virgínia Gois Leandro (Orientadora)

Departamento de Nutrição – UFPE/CAV

Prof.^a Dra. Elizabeth do Nascimento (Examinador interno)

Departamento de Nutrição – UFPE

Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho (Examinador externo)

Departamento de Fisiologia e Farmacologia -UFPE

Prof.^a Dra. Cláudia Jacques Lagranha (Examinador externo)

Departamento de Educação Física – UFPE/CAV

Prof.^a Dra. Adriana Souza Torsoni (Examinador externo)

Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA) - UNICAMP

*Há dez anos, uma mulher, agricultora, interiorana, semianalfabeta, sozinha, contra a opinião
de todos; abre as portas do mundo para sua única filha...*

*A essa mulher, a sua coragem, a sua confiança, ao seu amor, a minha mãe eu dedico todo o
aprendizado e todos os frutos dessa jornada!*

AGRADECIMENTOS

“... Não há no mundo exagero mais belo que a gratidão...”

Jean de La Bruyere

A Deus, que me guiou e continua sempre à frente dos meus passos; Aquele que renovou minhas forças a cada manhã, capacitando-me para realizar e concluir mais essa etapa e que sempre me escuta em minhas orações diárias, me dando força e inspiração para viver.

Aos Espíritos de Luz por toda luz e proteção enviada a mim em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Antônio Trajano e Cilene Simões, pelo amor, carinho, confiança, incentivo e apoio, que mesmo pouco entendendo os meus rumos acadêmicos sempre estiveram presentes a me apoiar, em especial a minha mãe por ter me ensinado as verdadeiras bases e princípios da vida, contribuindo na minha formação pessoal, acadêmica e profissional, a você, mãe, dedico todas as minhas conquistas.

As minhas tias e tios, primos e primas, que nesses 10 anos fora de casa cuidaram de “mainha e painho”. Sei que mesmo estando longe havia quem cuidasse deles, muito obrigada a todos.

Ao meu esposo, João Henrique, por todo amor, carinho, incentivo e PACIÊNCIA de sempre. Nem todas as palavras de gratidão dariam para expressar o quão importante você foi no decorrer desses quatro anos. Obrigada pelos momentos em que você deixou o esposo de lado e foi orientador, obrigada por cobrar em dobro; obrigada por não ajudar nas minhas descobertas da língua francesa, do convívio com os franceses; obrigada pelos protocolos de PCRq e *Western blotting* em francês hahaha; esses momentos me fortaleceram ainda mais. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

As minhas filhas, Alice e Agatha, que nasceram em meio aos experimentos, aos artigos, a tese... Obrigada pelo olhar acolhedor e sorriso leve que me fazem recomeçar a cada dia; obrigada por entender quando a mamãe diz que não pode brincar porque precisa trabalhar (mesmo sem saber o que de fato é trabalhar hahaha). Amo vocês, meus pinguinhos!

A minha orientadora oficial, Carol Leandro, a qual tenho profunda admiração. Obrigada pela oportunidade de aprendizado; é sempre maravilhoso ouvir seus ensinamentos. Obrigada pela amizade construída. Sou sua fã.

A minha orientadora de sempre, Mariana Fernandes, grande exemplo de professora e mentora. Mari, MUITO OBRIGADA por todas as oportunidades dadas, pela paciência tida em todos os erros cometidos, pelos ensinamentos diários, pela confiança e pela oportunidade de aprendizagem.

Aos queridos integrantes do time LABMEX, aos cuidados da professora Cláudia, por todo o conhecimento científico compartilhado ao longo desses anos; pela disponibilidade de sempre ajudar. Muito obrigada a todos.

A todos que fazem parte do grupo de pesquisa Controle Cardiorrespiratório e Plasticidade Fenotípica! Obrigada pelo acolhimento e atenção.

A todos que fazem parte do laboratório CAMEN – Lyon – França, aos cuidados dos pesquisadores Beatrice e Luciano, pela recepção, atenção, acolhimento e paciência. Obrigada pela oportunidade de aprendizado. Obrigada a todos. A tous ceux qui font partie du laboratoire CAMEN – Lyon – France, aux bons soins des chercheurs Beatrice et Luciano, pour leur accueil, attention et patience. Merci pour l'opportunité d'apprentissage. Merci à tous.

Aos professores Elizabeth Nascimento, Lêucio Andrade, Cláudia Lagranha, Adriana Torsoni, Juliana Oliveira e Eduardo Lira pela disponibilidade em contribuir com este trabalho, integrando a banca avaliadora da tese.

Aos queridos amigos de antes, de agora e de sempre; pela história construída e pela partilha de momentos que tornam a conclusão desse ciclo ainda mais significativa.

Enfim, obrigada a todos que direta ou indiretamente me ajudaram nesses longos 10 anos de aprendizado. Sozinha eu jamais estaria aqui.

RESUMO

A transição nutricional tem se consolidado mundialmente, principalmente entre as populações de países em desenvolvimento. Os índices de desnutrição têm sido substituídos por alta prevalência de sobrepeso e obesidade, relacionados a um consumo excessivo de alimentos processados e com alto teor de sal, açúcar e gordura. Evidências epidemiológicas têm mostrado que a deficiência nutricional nos primeiros anos de vida acompanhada de supernutrição, pode aumentar o risco de doenças cardiometabólicas na idade adulta. O fígado é um dos principais órgãos reguladores do metabolismo de carboidratos e lipídios, e vulnerável a alterações ambientais durante o desenvolvimento fetal, sendo um alvo importante de alterações metabólicas diante de insultos nutricionais. Neste trabalho, avaliamos os efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados (AGS) pós-desmame até a vida adulta no fígado de ratos submetidos à restrição proteica materna, durante a gestação e lactação, na bioenergética mitocondrial, balanço oxidativo e metabolismo hepático. Ratas *Wistar* foram acasaladas, após a confirmação da prenhez, foi ofertada uma dieta controle (C; 17% de proteína) ou hipoprotéica (HP; 8% de proteína) até o final da lactação. Após o desmame, os filhotes dos grupos C e HP receberam: i) a dieta C, formando os grupos C e HP-C; ou a dieta hiperlipídica (HL), formando os grupos C-HL e HP-HL até os 90 dias de vida, quando foram realizadas as avaliações de peso corporal e consumo alimentar; níveis séricos de glicose, perfil lipídico e marcadores de lesão tecidual; bioenergética e biogênese mitocondrial; biomarcadores de estresse oxidativo; atividade de enzimas antioxidantes e de enzimas metabólicas; expressão gênica de enzimas antioxidantes, marcadores de inflamação e de enzimas metabólicas. Verificou-se que os animais alimentados com uma dieta rica em AGS apresentaram redução do peso corporal (-11,41%, $p < 0,05$) e consumo alimentar (-22,47% $p < 0,05$). Todos os estados respiratórios das mitocôndrias hepáticas apresentaram redução no grupo HP-HL. Esse grupo também apresentou aumento na expressão de PGC-1 α (+ 95,9%, $p < 0,001$) e diminuição na expressão de Tfam (-18,6%, $p < 0,01$). Os animais HP-HL apresentaram maior inchamento mitocondrial (+67.1%, $p < 0.01$), potencializado após a adição de Ca²⁺ (272.1%, $p < 0.01$) e prevenido na presença de EGTA (quelante de cálcio) (-52%, $p < 0.001$) e ciclosporina A (inibidor do poro de transição de permeabilidade mitocondrial) (-56%, $p < 0.0001$). Houve também aumento da oxidação de proteínas hepáticas (+72.2%, $p < 0.01$) e peroxidação lipídica (+42.5%, $p < 0.01$), além de aumento da expressão gênica de marcadores inflamatórios NF-kB1 (+ 122%, $p < 0,05$) e TNF α (+ 182%, $p < 0,05$). A expressão proteica da superóxido dismutase (SOD) foi maior nesse grupo; os níveis de mRNA de catalase (CAT)

também foram maiores (+66%, $p < 0.05$), entretanto a expressão proteica (-50%, $p < 0.05$) e atividade (-48,1%, $p < 0.05$) da CAT foram reduzidas, assim como redução na atividade da glutathione peroxidase (GPx) (-21%, $p < 0.05$). Esses animais também apresentaram aumento na expressão proteica e na atividade da enzima β -hidroxialcil CoA desidrogenase (β -Had) (+80%, $p < 0.05$)/ (+218%, $p < 0.05$) e citrato sintase (CS) (+73%, $p < 0.05$)/ (+191%, $p < 0.05$), além de aumento na atividade da ácido graxo sintase (FAS) (+133%, $p < 0.05$) e do conteúdo de mRNA de PPAR γ em comparação aos controles (+195.5% $p < 0,05$). Nossos dados sugerem que ratos adultos previamente submetidos à restrição proteica materna durante períodos críticos do desenvolvimento e alimentados com uma dieta rica em AGS pós-desmame foram mais suscetíveis a disfunções mitocondriais, apresentaram um quadro de estresse oxidativo que desencadeou vias inflamatórias, além de aumento no metabolismo lipídico no fígado.

Palavras-chave: dieta hiperlipídica; radicais livres; inflamação; restrição proteica; programação metabólica.

ABSTRACT

The nutritional transition has been consolidated worldwide, especially among populations in developing countries. Malnutrition rates have been replaced by a high prevalence of overweight and obesity, related to an excessive consumption of processed foods with a high content of salt, sugar and fat. Epidemiological evidence has shown that nutritional deficiency in the first years of life, accompanied by overnutrition, can increase the risk of cardiometabolic diseases in adulthood. The liver is one of the main organs that regulate carbohydrate and lipid metabolism, and is vulnerable to environmental changes during fetal development, being an important target for metabolic changes in the face of nutritional insults. In this work, we evaluated the effects of a diet rich in saturated fatty acids (SFA) post-weaning to adulthood in the liver of rats subjected to maternal protein restriction, during pregnancy and lactation, on mitochondrial bioenergetics, oxidative balance and metabolism hepatic. Wistar female rats were mated, after pregnancy confirmation, a control (C; 17% protein) or low-protein (HP; 8% protein) diet was offered until the end of lactation. After weaning, pups in groups C and HP received: i) diet C, forming groups C and HP-C; or the high-fat diet (HL), forming the C-HL and HP-HL groups until 90 days of life, when the assessments of body weight and food consumption were performed; serum glucose levels, lipid profile and tissue damage markers; bioenergetics and mitochondrial biogenesis; oxidative stress biomarkers; antioxidant enzymes and of metabolic enzymes activity; gene expression of ; antioxidant enzymes, metabolic enzymes and inflammation markers. It was found that animals fed a diet rich in AGS showed reduced body weight (-11.41% , $p < 0.05$) and food consumption (-22.47% , $p < 0.05$). All respiratory states of hepatic mitochondria showed a reduction in the HP-HL group. This group also showed an increase in PGC-1 α expression ($+95.9\%$, $p < 0.001$) and a decrease in Tfam expression (-18.6% , $p < 0.01$). HP-HL animals showed greater mitochondrial swelling ($+67.1\%$, $p < 0.01$), potentiated after the addition of Ca $^{2+}$ (272.1% , $p < 0.01$) and prevented in the presence of EGTA (calcium chelator) (-52% , $p < 0.001$) and cyclosporin A (inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore) (-56% , $p < 0.0001$). There was also an increase in liver protein oxidation ($+72.2\%$, $p < 0.01$) and lipid peroxidation ($+42.5\%$, $p < 0.01$), in addition to increased gene expression of inflammatory markers NF- κ B1 ($+122\%$, $p < 0.05$) and TNF α ($+182\%$, $p < 0.05$). Protein expression of superoxide dismutase (SOD) was higher in this group; catalase mRNA (CAT) levels were also higher ($+66\%$, $p < 0.05$), however protein expression (-50% , $p < 0.05$) and activity (-48.1% , $p < 0.05$) of CAT were reduced, as was a reduction in

glutathione peroxidase (GPx) activity (−21%, $p < 0.05$). These animals also showed increased protein expression and activity of the enzyme β -hydroxyalkyl CoA dehydrogenase (β -HAD) (+80%, $p < 0.05$)/ (+218%, $p < 0.05$) and citrate synthase (CS) (+73%, $p < 0.05$)/ (+191%, $p < 0.05$), in addition to increased fatty acid synthase (FAS) activity (+133%, $p < 0.05$) and PPAR α mRNA content in compared to controls (+195.5% $p < 0.05$). Our data suggest that adult rats previously submitted to maternal protein restriction during critical periods of development and fed a diet rich in AGS post-weaning were more susceptible to mitochondrial dysfunction, presented an oxidative stress picture that triggered inflammatory pathways, in addition to increased lipid metabolism in the liver.

Keywords: high fat diet; free radicals; inflammation; protein restriction; metabolic programming.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Contribuição de várias vias metabólicas para a esteatose hepática.....	43
Figura 2 -	Via de síntese de novo de ácidos graxos no fígado.....	44
Figura 3 -	Geração de EROs pelos complexos I e III na membrana mitocondrial interna e produção de peróxido de hidrogênio como resultado da ação da enzima antioxidante superóxido dismutase.....	47
Figura 4 -	O acúmulo de EROs mitocondrial pode provocar a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial.....	51
Figura 5 -	Esquema representativo do desenho experimental.....	60
Figura 6 -	Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre o peso corporal (A) e consumo alimentar (B) de ratos adultos submetidos à restrição proteica perinatal. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM e comparados por ANOVA two way e teste post-hoc de Bonferoni. n = 6–9 animais por grupo. *p <0,05 entre os grupos; +p <0,05 dentro do grupo; #p <0,05 vs. C.....	70
Figura 7 -	Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre os níveis séricos de glicose (A), triglicerídeos (B), colesterol (C), alanina aminotransferase (ALT) (D) e aspartato aminotransferase (AST) (E) de ratos adultos submetidos à restrição proteica perinatal. Os dados foram expressos como média e $\pm$ SEM e comparados por ANOVA two way e teste post-hoc de Bonferoni. n = 6–9 animais por grupo. *p <0,05 entre os grupos; + p <0,05 dentro do grupo; # p <0,05 vs. C.....	71
Figura 8 -	Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre a respiração mitocondrial hepática de ratos adultos submetidos à restrição proteica perinatal. Respiração mitocondrial no estado basal (A), com estímulo de ADP (B), estado de repouso (C), estado desacoplado (D) e controle respiratório (E), no homogenato de fígado de ratos machos de 90 dias nascidos de mães alimentados com dietas controle (C) ou hipoproteicas (HP), durante a gestação e lactação, e dietas controle (C) ou hiperlipídicas (HL) após o desmame até a idade adulta. n = 6–9 animais por grupo. Todos os valores foram expressos como média $\pm$ SEM e comparados por ANOVA two way seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni. * p <0,05 entre os grupos; + p <0,05 dentro do grupo; #	

p <0,05 vs. C.....73

Figura 9 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre os níveis de mRNA de PGC-1 α , Tfam, NRF2 e FOXO3 no fígado de ratos adultos submetidos à restrição proteica perinatal. Os dados foram padronizados e expressos em variação percentual (%) em relação ao grupo controle. * p <0,05 entre os grupos; + p <0,05 dentro do grupo; # p <0,05 HP-HL vs. C. n = 4-5 animais por grupo. Tbp: proteína de ligação ao TATA box, PGC-1 α : Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama coativador 1 alfa, Tfam: fator de transcrição mitocondrial A, NRF2: Fator nuclear 2 relacionado ao eritroide 2, FOXO3: Fator de transcrição Forkhead Box O 3.....74

Figura 10 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre o inchamento mitocondrial hepático de ratos adultos submetidos à restrição proteica perinatal. (A) Inchamento mitocondrial (% da absorbância inicial) e (B) área sob a curva nas mitocôndrias isoladas do fígado de ratos machos de 90 dias nascidos de mães alimentadas com uma dieta controle (C) ou baixa proteína (HP), durante a gestação e lactação e dietas controle (C) ou hiperlipídicas (HL) após o desmame até a idade adulta. n = 6–9 animais por grupo. Todos os valores foram expressos como média $\pm$ SEM e comparados por ANOVA two way seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni. * p <0,05 entre os grupos; + p <0,05 dentro do grupo; # p <0,05 vs. C.....75

Figura 11 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre os níveis de mRNA de MFN2 (A), CypD (B), GRP75 (C) e VDAC (D) no fígado de ratos adultos submetidos à restrição proteica perinatal. Os dados foram padronizados e expressos em variação percentual (%) em relação ao grupo controle. * p <0,05 entre os grupos; + p <0,05 dentro do grupo; # p <0,05 vs. C. n = 4-5 animais por grupo. Tbp: proteína de ligação ao TATA box, MFN2: Mitofusina 2, CypD: ciclofilina D, GRP75: proteína regulada por glicose 75, VDAC: canal de voltagem dependente de ânion 1.....76

Figura 12 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre os níveis de biomarcadores de estresse oxidativo no fígado de ratos adultos submetidos à restrição proteica perinatal. (A) Níveis de malondialdeído, (B) níveis de carbonilas e (C) níveis de sulfidrilas no homogenato de fígado de ratos machos de 90 dias nascidos de mães alimentadas com uma dieta controle (C) ou hipoproteica (HP), durante a gestação e lactação, e controle (C) ou dietas hiperlipídicas (HL) após o desmame até a idade adulta. n = 5-7 animais por grupo. Todos os valores foram expressos como média $\pm$ SEM e comparados por ANOVA two way seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni. * p <0,05 entre os grupos; + p <0,05 dentro do grupo; # p <0,05 vs. C.....77

Figura 13 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre os níveis de mRNA de SOD1, SOD2, CAT, GPX1, GPX2, UCP2 (genes antioxidantes) e Xdh, NOX1 e RAC1 (genes pró-oxidantes) no fígado de ratos adultos submetidos à restrição proteica perinatal. Para os níveis de mRNA, os dados foram padronizados e expressos em variação percentual (%) em relação ao grupo controle. * p <0,05 entre os grupos; + p <0,05 dentro do grupo; # p <0,05 vs. C. n = 4-5 animais por grupo. Tbp: proteína de ligação ao TATA box, Sod1: Superóxido dismutase 1, Sod2: Superóxido dismutase 2, Cat: Catalase, Gpx1: Glutathione peroxidase 1, Gpx2: Glutathione peroxidase 2, UCP2: Proteína desacopladora 2, Rac1: família Rac1 GTPase 1, Nox1: NADPH oxidase 1, Xdh: Xantina desidrogenase, Tub: Tubulina.....78

Figura 14 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre a expressão proteica de Sod2 (A), Cat (B), Gpx1 / 2 (C) e Xdh (D) no fígado de ratos adultos submetidos à restrição proteica perinatal. Os dados foram normalizados para a expressão de tubulina e apresentados como média $\pm$ SEM. ANOVA two way seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni foram usados para comparar os grupos. n = 4-5 animais por grupo. * p <0,05 entre os grupos; + p <0,05 dentro do grupo; # p <0,05 vs. C. Tbp: proteína de ligação da TATA box (manutenção), Sod1: Superóxido dismutase 1, Sod2: Superóxido dismutase 2, Cat: Catalase, Gpx1: Glutathione peroxidase 1, Gpx2: Glutathione peroxidase 2, Xdh: Xantina desidrogenase, Tub: Tubulina.....79

- Figura 15 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre a atividade de enzimas antioxidantes e concentração de glutathione reduzida no fígado de ratos adultos submetidos à restrição proteica perinatal. (A) Atividade da superóxido dismutase (SOD), (B) atividade da catalase (CAT), (C) atividade da glutathione peroxidase (GPx), (D) atividade da glutathione-S-transferase (GST), (E) concentração de glutathione reduzida (GSH) no homogenato de fígado de ratos machos de 90 dias nascidos de mães alimentadas com uma dieta controle (C) ou hipoproteica (HP), durante a gestação e lactação, e controle (C) ou dietas hiperlipídicas (HL) após o desmame até a idade adulta. n = 5-7 animais por grupo. Todos os valores foram expressos como média $\pm$ SEM e comparados por ANOVA two way seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni. * p <0,05 entre os grupos; + p <0,05 dentro do grupo; # p <0,05 vs. C..... 81
- Figura 16 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre os níveis de mRNA de IL1b, Tnf α e NF-k B1 no fígado de ratos adultos submetidos à restrição proteica perinatal. Os dados foram expressos em variação percentual (%) em relação ao grupo controle e apresentados como média $\pm$ SEM. ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni foram usados para comparar os grupos. * p <0,05 entre os grupos; + p <0,05 dentro do grupo; # p <0,05 vs. NP em dieta normolipídica. Tbp: proteína de ligação ao TATA box, IL1b: Interleucina 1 beta, Tnf α : Fator de necrose tumoral alfa e NF-kB1: Fator nuclear do potenciador do gene do polipeptídeo kappa light em células B1.....82
- Figura 17 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre os níveis de mRNA de β -Had, G6PDH, PDK4, CS e PEPCK no fígado de ratos adultos submetidos à restrição proteica perinatal. Para os níveis de mRNA, os dados foram padronizados e expressos em variação percentual (%) em relação ao grupo controle. * p <0,05 entre os grupos; + p <0,05 dentro do grupo; # p <0,05 vs. C. n = 4-5 animais por grupo. Tbp: proteína de ligação ao TATA box, β -Had: β -hidroxiacil-coa desidrogenase, G6PDH: Glicose-6-fosfato desidrogenase, PDK4: piruvato desidrogenase, CS: Citrato sintase, PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxiquinase.....83

Figura 18 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre a expressão proteica de B-Had, CS e PDK4 no fígado de ratos adultos submetidos à restrição proteica perinatal. Os dados foram normalizados para a expressão de tubulina e apresentados como média $\pm$ SEM. ANOVA two way seguida pelo teste post-hoc de Bonferoni foram usados para comparar os grupos. n = 4-5 animais por grupo. * p <0,05 entre os grupos; + p <0,05 dentro do grupo; # p <0,05 vs. C. B-Had: b-hidroxiacil-coa desidrogenase, CS: Citrato Sintase, PDK4: piruvato desidrogenase, Tub: Tubulina.....84

Figura 19 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre a atividade de enzimas metabólicas no fígado de ratos adultos submetidos à restrição proteica perinatal. (A) Atividade da PFK1, (B) atividade da G6PDH, (C) atividade da β -Had, (D) atividade da ácido graxo sintase (FAS), (E) atividade da citrato sintase (CS) no homogenato de fígado de ratos machos de 90 dias nascidos de mães alimentadas com uma dieta controle (C) ou hipoproteica (HP), durante a gestação e lactação, e controle (C) ou dietas hiperlipídicas (HL) após o desmame até a idade adulta. n = 5-7 animais por grupo. Todos os valores foram expressos como média $\pm$ SEM e comparados por ANOVA two way seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni. * p <0,05 entre os grupos; + p <0,05 dentro do grupo; # p <0,05 vs. C.....86

Figura 20 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre os níveis de mRNA de PPAR $\alpha\beta\gamma$, SREBp1c e ChREBp no fígado de ratos adultos submetidos à restrição proteica perinatal. Para os níveis de mRNA, os dados foram padronizados e expressos em variação percentual (%) em relação ao grupo controle. * p <0,05 entre os grupos; + p <0,05 dentro do grupo; # p <0,05 vs. C. n = 4-5 animais por grupo. Tbp: proteína de ligação ao TATA box, PPAR α : Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa, PPAR β : Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma beta, PPAR γ : Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama, SREBp1c: Fator de transcrição 1 de ligação ao elemento regulador de esterol, ChREBp: Proteína de ligação ao elemento responsiva a carboidratos.....87

Figura 21 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre a expressão proteica de CREB1, CREB1p, razão CREB1p/ CREB1, ATF1, ATF1p e razão ATF1p/ATF1 no fígado de ratos adultos submetidos à restrição proteica perinatal. Os dados foram normalizados para a expressão de tubulina e apresentados como média $\pm$ SEM. ANOVA two way seguida pelo teste post-hoc de Bonferoni foram usados para comparar os grupos. n = 4-5 animais por grupo. * p <0,05 entre os grupos; + p <0,05 dentro do grupo; # p <0,05 vs. C. CREB1: proteína de ligação ao elemento responsivo ao cAMP, CREB1p: proteína de ligação ao elemento responsivo ao cAMP fosforilado, ATF1: ativação do fator de transcrição-1, ATF1p: ativação do fator de transcrição-1 fosforilado, Tub: Tubulina.....89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição e análise centesimal das dietas experimentais quanto aos ingredientes utilizados nas formulações.....	57
Tabela 2 - Distribuição percentual de ácidos graxos, quanto à presença ou não de dupla ligação na cadeia carbônica das dietas experimentais formuladas.....	58
Tabela 3 - Sequências de primers usados para a análise de RT-PCR em tempo real.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil-CoA carboxilase
AGS	Ácidos graxos saturados
AIN-93G	Instituto Americano de Nutrição- Dieta de crescimento
AKT	Proteína quinase B
ALT	Enzima alanina aminotransferase
ANT	Translocador de nucleotídeos de adenina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1	Proteína ativadora 1
AST	Enzima aspartato aminotransferase
ADP	Adenosina difosfato
ATF1	Fator de transcrição dependente de AMP cíclico-1
ATF1p	Fator de transcrição dependente de AMP cíclico-1 fosforilado
ATP	Adenosina trifosfato
BCL-2	Proteína anti-apoptótica
BSA	Albumina de soro bovino
Ca ²⁺	Cálcio
CAT	Catalase
CCCP	Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona
CDNB	1-cloro-2,4 dinitrobenzeno
CEUA	Comitê de Ética para Uso Animal
ChREBP	Proteína de ligação do elemento responsivo a carboidratos
CIC	Portador de citrato
CK	Células de Kupffer
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPT1A	Carnitina palmitoiltransferase 1A
CREB1	Proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMP cíclico -1
CREB1p	Proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMP cíclico -1 fosforilado
CS	Citrato sintase
CsA	Ciclosporina A
Cu/Zn-SOD	Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco

CypD	ciclofilina D
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DNAMt	DNAmitocondrial
DNMT1	DNA metiltransferase 1
DNMT3a	DNA metiltransferases 3a
DNPH	2,4-dinitrofenil-hidrazina
DNP-SG	DinitroFenil S Glutaciona
DTNB	5,5'-Ditiobis(2-nitrobenzóico)
e.p.m	Erro padrão da média
ED	Endoderma definitivo
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EGTA	Ácido Etileno Glicol Tetra Acético
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERR α	Receptor α relacionado ao estrogênio
ETC	Cadeia transportadora de elétrons
ETF	Flavoproteínas de transporte de elétrons
FAS	Ácido graxo sintase
FOXO3	Fator de transcrição Forkhead Box O 3
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GCK	Glicoquinase
GD(D)P	Guanosina tri (di) – fosfato
GPX	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GRP75	proteína regulada por glicose 75
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S Transferase
H ⁺	Íons Hidrogênio
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H3	Histona H3
H3k4	Histona H3/resíduo de lisina 4

H3k9/14	Histona H3/resíduo da lisina 9 e 14
H3k9	Histona H3/resíduo da lisina 9
H4	Histona H4
HAT	Histona acetiltransferases
HDAC	Histona desacetilase
HEPES	(N-(2-hidroxi-etil) piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)
HL	Dieta hiperlipídica
HNE	4-hidroxi-trans 2-nonenal
HNF4a	Fator nuclear alfa 4 do hepatócito
HP	Dieta hipoproteica
IGF2	Fator de crescimento semelhante à insulina 2
IKK	I κ B quinase
IL1b	Interleucina1 beta
IL6	Interleucina 6
IR	Receptor de insulina
IRS-1	Substrato 1 do receptor de insulina
IRTK	Receptor de insulina tirosina quinase
K ⁺	Potássio
K ₂ HPO ₄	Fosfato Monopotássico
KCl	Cloreto de potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LRP	Proteínas relacionadas ao receptor LDL
LXR	Receptor X do fígado
MCAD	Acil-CoA desidrogenase de cadeia média
MDA	Malondialdeído
MFN2	Mitofusina 2,
Mg	Miligrama
MgCl	Cloreto de Magnésio
MnSOD	Superóxido dismutase dependente de manganês
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Alvo mecanístico da rapamicina
Na ⁺	Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio

NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinuclotídeo (estado oxidado)
NADH	Nicotinamida adenina dinuclotídeo (estado reduzido)
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinuclotídeo fosfato (estado oxidado)
NADPH	Nicotinamida adenina dinuclotídeo fosfato (estado reduzido)
NF-κB1	Fator nuclear do potenciador do gene do polipeptídeo kappa light em células B1
NO ⁻	Óxido nítrico
Nox1	NADPH oxidase 1
NRF2	Fator nuclear 2 relacionado ao eritroide 2
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
O ₂	Oxigênio
°C	Graus Celsius
OH ⁻	Radical hidroxil
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPT	O-Ftaldialdeído
PDK4	Piruvato desidrogenase
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PFK1	Fosfofrutoquinase 1
PGC-1α	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama coativador 1 alfa
pH	Potencial Hidrogeniônico
Pi	Fosfato inorgânico
PI3K	Fosfoinositídeo 3-quinase
PKC -ζ	Proteína C quinase
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoride
PPARα	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa
PPARβ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma beta
PPARγ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
PTPM/ MPTP	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
Rac1	Família Rac1 GTPase 1
RCR	Razão do controle respiratório
SH	Sulfidrilas
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase

SREBP1c	Proteína de ligação do elemento regulador de esterol-1c
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
Tbp	Proteína de ligação ao TATA box
TCA	ciclo tricloroacético
Tfam	Fator de transcrição mitocondrial A
TNF- α	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
TPM/ MPT	Transição de permeabilidade mitocondrial
Tub	Tubulina
UCPs	Proteína desacopladora Mitocodrial
UQ	Ubiquinona (coenzima Q oxidada)
UQH	Radical semiquinona
UQH ₂	Ubiquinona (coenzima Q reduzida)
VDAC	Canal de ânion voltagem dependente
Xdh	Xantina desidrogenase
YY1	Proteína repressora transcricional yin yang 1
β -HAD	β -hidroxyacil-CoA desidrogenase
$\Delta\mu\text{H}^+$	Gradiente eletroquímico de prótons
$\Delta\Psi_m$	Potencial elétrico de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DE LITERATURA	30
2.1	PLASTICIDADE FENOTÍPICA E EPIGENÉTICA.....	30
2.2	TRANSIÇÃO NUTRICIONAL E RISCOS DE DOENÇAS CARDIOMETABÓLICAS.....	32
2.3	FÍGADO: ANATOMIA MICROSCÓPICA, MORFOLOGIA E FUNÇÃO HEPÁTICA.....	38
2.4	MITOCÔNDRIAS: ESTRUTURA E BIOQUÍMICA.....	44
2.4.1	Geração de Espécies Reativas de Oxigênio pelas Mitocôndrias.....	46
2.4.2	Homeostase de Cálcio, Transição de Permeabilidade Mitocondrial e Processos Patológicos.....	48
3	HIPÓTESE.....	54
4	OBJETIVO	55
4.1	OBJETIVO GERAL.....	55
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	55
5	MÉTODOS.....	56
5.1	QUESTÕES ÉTICAS.....	56
5.2	ANIMAIS	56
5.3	MANIPULAÇÃO NUTRICIONAL	56
5.3.1	Dietas.....	56
5.3.2	Indução da desnutrição proteica	59
5.3.3	Indução da transição nutricional.....	59
5.4	DESENHO EXPERIMENTAL.....	59
5.5	PESO CORPÓREO E CONSUMO ALIMENTAR.....	60
5.6	COLETA DE AMOSTRAS	60

5.7	DOSAGEM DE PROTEÍNA	61
5.8	ISOLAMENTO DAS MITOCÔNDRIAS HEPÁTICAS	61
5.9	AVALIAÇÃO DA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL.....	61
5.9.1	Condições experimentais.....	61
5.9.2	Medida do consumo de oxigênio mitocondrial	61
5.9.3	Avaliação do inchamento e integridade da membrana mitocondrial	62
5.10	AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	62
5.10.1	Avaliação da produção de malondialdeído (MDA).....	62
5.10.2	Avaliação da oxidação proteica (Carbonilas).....	63
5.10.3	Avaliação da concentração de sulfidrilas (SH)	63
5.11	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES	63
5.11.1	Superóxido dismutase (SOD).....	63
5.11.2	Catalase	63
5.11.3	Glutathione peroxidase.....	64
5.11.4	Glutathione-S-Transferase.....	64
5.12	CONCENTRAÇÃO DE GLUTATHIONE REDUZIDA (GSH).....	64
5.13	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS	65
5.13.1	Fosfofrutoquinase 1 (PFK1).....	65
5.13.2	glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).....	65
5.14	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE LIPÍDIOS.....	65
5.14.1	β -hidroxyacil-CoA desidrogenase (β -HAD)	65
5.14.2	Ácido graxo sintase (FAS)	66
5.15	ATIVIDADE CITRATO SINTASE	66
5.16	PREPARAÇÃO DO TECIDO PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA....	66

5.17	EXTRAÇÃO DE MRNA.....	66
5.18	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (QRT-PCR).....	67
5.19	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E PROCEDIMENTOS DE <i>WESTERN BLOTTING</i>	69
5.20	ANÁLISES DOS DADOS	69
6	RESULTADOS.....	70
6.1	PESO CORPORAL E CONSUMO ALIMENTAR.....	70
6.2	NÍVEIS SÉRICOS DE GLICOSE, PERFIL LIPÍDICO E MARCADORES DE LESÃO TECIDUAL	70
6.3	CAPACIDADE FUNCIONAL DA CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS	71
6.3.1	Respiração Mitocondrial	71
6.4	EXPRESSÃO GENICA DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO RELACIONADOS A BIOENERGÉTICA E BIOGÊNESE MITOCONDRIAL.....	73
6.5	INTEGRIDADE DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	74
6.5.1	Inchamento mitocondrial.....	74
6.5.2	Expressão genica de proteínas relacionadas a homeostase do cálcio.....	75
6.6	ESTADO REDOX CELULAR.....	76
6.6.1	Biomarcadores de estresse oxidativo	76
6.6.2	Expressão genica de enzimas antioxidantes e pro-oxidantes	77
6.6.3	Expressão proteica de enzimas antioxidantes SOD2, CAT, GPX1 / 2	78
6.6.4	Atividade de enzimas antioxidantes e concentração de glutathiona reduzida.....	79
6.7	EXPRESSÃO GENICA DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS	81
6.8	CAPACIDADE METABÓLICA	82
6.8.1	Expressão genica de enzimas metabólicas	82
6.8.2	Expressão proteica de enzimas metabólicas.....	83

6.8.3	Atividade enzimática de enzimas metabólicas	84
6.8.4	Expressão genica de fatores de transcrição relacionados ao metabolismo	86
6.8.5	Expressão proteica de CREB1, CREB1p, ATF1 e ATF1p	87
7	DISCUSSÃO	90
8	CONCLUSÃO	103
	REFERENCIAS	104
	ANEXO A - PARECER COMITÊ DE ÉTICA	143

1 INTRODUÇÃO

A transição nutricional tem se consolidado mundialmente, principalmente entre as populações de países em desenvolvimento (KOSAKA e UMEZAKI, 2017). Os índices de desnutrição relacionados ao déficit de peso e baixa estatura têm sido substituídos por alta prevalência da obesidade (SOUSA, OLINDA e PEDRAZA, 2016). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, 804 milhões de pessoas ainda encontram-se desnutridas em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO, 2017). Por outro lado, desde 1975, a obesidade mundial quase triplicou, alcançando 650 milhões de pessoas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO), 2017). Atualmente, sugere-se que dois bilhões de pessoas no mundo estejam com sobrepeso e obesidade, com maior prevalência relacionada à obesidade induzida pela dieta, acompanhada pela alta prevalência de doenças crônicas e degenerativas não transmissíveis (POPKIN, 2015). No Brasil o excesso de peso foi visto em 55,4% da população entre homens e mulheres adultos, enquanto a frequência de adultos obesos foi de 20,3% (VIGITEL, 2019).

Uma ocorrência intrínseca da transição nutricional é a passagem dos sujeitos de estados de desnutrição durante períodos críticos de desenvolvimento (como a gestação e lactação), para estágios de hipernutrição, com consumo excessivo de alimentos processados e com alto teor de ácidos graxos saturados, açúcares e calorias (KEDING, 2016). A desnutrição perinatal parece promover uma espécie de programação do metabolismo para condições de escassez nutricional (ZHU, CAO e LI, 2019). Dessa forma, a ocorrência da hipernutrição, precedida pela desnutrição, estabelece um ambiente nutricional pós-natal divergente do ambiente perinatal, que pode acarretar em repercussões deletérias sobre a homeostase energética dos indivíduos (ZHU, CAO e LI, 2019). Os mecanismos subjacentes a essas repercussões são baseados na “plasticidade fenotípica” (GODFREY *et al.*, 2007; GLUCKMAN *et al.*, 2008). Essa plasticidade fenotípica refere-se à capacidade de um organismo reagir a mudanças no ambiente com mudanças na forma, estado, movimento ou taxa de atividade, sem alterações genéticas. (WEST-EBERHARD, MARY JANE, 2005). Nesse contexto, tem sido investigado como o aspecto nutricional pode induzir essas modificações epigenéticas. A hipótese é que as modificações epigenéticas são um mecanismo abrangente que liga a nutrição materna a modulação de fenótipos na prole (MAZZIO e SOLIMAN, 2014; SZARC VEL SZIC *et al.*, 2015).

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo e regula principalmente o metabolismo de carboidratos e lipídios, ele é particularmente vulnerável a alterações ambientais durante o

desenvolvimento fetal, sendo um alvo importante de modificações epigenéticas (TIFFON, 2018). Alterações no metabolismo de carboidratos e gorduras devido a um desequilíbrio no metabolismo hepático pode resultar em resistência à insulina em tecidos sensíveis à insulina, como o fígado e o músculo (DHILLON e STEADMAN, 2012). A literatura relatou vários efeitos da restrição de proteínas durante períodos críticos de desenvolvimento no fígado; em um modelo experimental de desnutrição proteica, hepatócitos isolados de ratos alimentados com 5% de proteína caseína durante 14 dias apresentaram síntese de triglicerídeos aumentada (TAGUCHI *et al.*, 2017). Além disso, estudos relacionados à disfunção hepática mostraram que a lesão hepática pode ser relacionada ao estresse oxidativo após exposição a desnutrição proteica (CHITTURI e FARRELL, 2001; MEHTA *et al.*, 2002; PRUIS *et al.*, 2014). Demonstra-se que uma dieta hiperlipídica aumenta a produção de radicais livres que geralmente pode levar à produção sistêmica de estresse oxidativo e gerar esteatose hepática em roedores e humanos por aumento da captação hepática de lipídios (TURNER *et al.*, 2013; LINDEBOOM *et al.*, 2014); outro estudo mostrou que a exposição a uma dieta com 45% de conteúdo lipídico durante a gestação, lactação e pós-natal na prole causou alterações no estado REDOX e distúrbios na expressão gênica relacionada ao metabolismo lipídico no fígado de ratos adultos (BRUCE *et al.*, 2016). Acredita-se que o estresse oxidativo seja uma das principais causas do desenvolvimento de distúrbios metabólicos, como esteatose hepática, doença hepática gordurosa não alcoólica e diabetes tipo 2, associados à disfunção mitocondrial (ROLO, TEODORO e PALMEIRA, 2012; YOON e CHA, 2014; CHAURASIA e SUMMERS, 2015). Serviddio *et al.* (2008) relataram a importância das mitocôndrias na prevenção da NAFLD, uma vez que essas organelas desempenham papéis fundamentais no metabolismo da gordura e na homeostase energética, neutralizando assim o acúmulo excessivo de triglicerídeos hepáticos.

As mitocôndrias são as principais organelas do metabolismo da energia celular, responsáveis pela grande maioria da síntese de adenosina-5-trifosfato (ATP) via fosforilação oxidativa. Nas últimas décadas, as mitocôndrias surgiram como organelas equipadas com maquinarias sofisticadas para mediar o fluxo de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial interna e estão envolvidas nas vias de sinalização, lesão e morte celular (apoptose) (FIGUEIRA *et al.*, 2013). O excesso na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) associado à diminuição de sua eliminação pode gerar uma situação conhecida como estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007), frequentemente relacionado à disfunção mitocondrial. Está bem documentado que a exposição a fatores alimentares pode causar um aumento no estresse oxidativo, tornando o corpo vulnerável a espécies reativas de oxigênio,

disfunção mitocondrial, redução da expressão de genes antioxidantes e biogênese mitocondrial prejudicada (SINGH *et al.*, 2016). Estudos *in vitro* mostraram que os ácidos graxos saturados podem induzir a produção de espécies de oxigênio relacionadas ao metabolismo de ácidos graxos de cadeia longa (CARDOSO, KAKIMOTO e KOWALTOWSKI, 2013; KAKIMOTO *et al.*, 2015). No geral, o acúmulo de ácido palmítico nos tecidos tem sido descrito como um fator de risco no desenvolvimento de disfunções metabólicas e mitocondriais (CARTA *et al.*, 2017).

Estudos mostraram que os genes das vias inflamatórias são ativados transcricionalmente após estresse oxidativo, incluindo a ativação de NFκB (ZHOU, JOHNSON e RANDO, 2001; MORGAN e LIU, 2011) e TNFα (HAN *et al.*, 2009) pela fosforilação de p65/RelA e subsequente transativação de NF-κB por estimulação de citocinas pró-inflamatórias, TNF-α e IL-1 (CHRISTIAN, SMITH e CARMODY, 2016). Os complexos inflamatórios induzidos pelo estresse oxidativo variam entre os diferentes tipos celulares; em adipócitos, já foi demonstrado na incubação de células 3T3-L1 com ácido palmítico, ácido graxo saturado em maior concentração em nossa dieta, o aumento da expressão e secreção de citocinas inflamatórias, como IL-6 e TNF-α, bem como atividade de NF-κB (MAGRI *et al.*, 2015), no fígado, as famílias NFκB e proteína ativadora 1 (AP-1) foram ativadas em resposta ao estresse oxidativo no carcinoma hepático (PUGA *et al.*, 2000); além disso, os animais alimentados com dietas ricas em ácidos graxos saturados por 16 semanas desencadearam aumento da fosforilação de IKK e do conteúdo de proteína TNFα, condições associadas à ativação da via de sinalização de NFκB, com fibrose hepática associada (LAVRADOR *et al.*, 2019).

Ao que parece, o desenvolvimento de doenças hepáticas, como a NAFLD, é baseada no acúmulo de triglicerídeos hepáticos, que então sensibiliza o fígado à lesões mediada pela secreção de adipocitocinas pró-inflamatórias e pró-trombóticas e a produção reduzida de agentes anti-inflamatórios. Somando, a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo que também desencadeiam uma cascata inflamatória e fibrogênica no fígado, esses eventos levariam ao desenvolvimento da esteatose e da fibrose hepática. Desse modo, é de extrema importância avaliar as repercussões do consumo de uma dieta rica em ácidos graxos saturados em ratos submetidos a restrição durante períodos críticos do desenvolvimento na bioenergética mitocondrial, balanço oxidativo e metabolismo hepático afim de entender os mecanismos bioquímicos e fisiológicos que ligam a nutrição materna ao desenvolvimento de alterações hepáticas em ratos adultos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PLASTICIDADE FENOTÍPICA E EPIGENÉTICA

Uma das tentativas mais conhecidas de compreender a associação entre nutrição e o desenvolvimento de doenças na vida adulta é a "hipótese do fenótipo poupador" proposta por Hales e Barker. Essa hipótese é amplamente utilizada para considerar as doenças cardiometabólicas no adulto como um efeito "programado" da restrição nutricional durante fases iniciais de crescimento e desenvolvimento, seguidas por uma recuperação da dieta durante a vida (BARKER e OSMOND, 1986; BARKER *et al.*, 1989; BARKER *et al.*, 1993; BARKER, 2007). Este fenômeno pode ser compreendido no contexto da plasticidade fenotípica (BARKER *et al.*, 2005; WEST-EBERHARD, M. J., 2005; LABAYEN *et al.*, 2006; ANDERSEN *et al.*, 2009; BIOSCA *et al.*, 2011). Nesse contexto, a plasticidade fenotípica tem como base molecular as alterações epigenéticas, como metilação do DNA, modificações pos-traducionais de histonas e expressão do microRNAs (WELLS, 2011). O “panorama epigenético” do inglês *epigenetic landscape* foi primeiramente descritas por Conrad Waddington em 1940 e estudam a relação entre causa e efeito nos genes para produzir um fenótipo (JABLONKA e LAMB, 2002). Atualmente, esse conceito é empregado para descrever o processo de expressão gênica e sua ligação a modificações na estrutura da cromatina sem alterar a sequência de DNA (CHONG e WHITELAW, 2004; EGGER *et al.*, 2004).

Modificações na estrutura da cromatina estão relacionadas ao aumento ou diminuição da afinidade eletrostática da estrutura do DNA. Metilação do DNA, modificações pos-traducionais de histonas e expressão de microRNAs são capazes de alterar a estrutura da cromatina (SADAKIERSKA-CHUDY e FILIP, 2015). A metilação do DNA está relacionada à adição de grupos metil nos resíduos de citosina do DNA, normalmente na citosina, seguida pelo resíduo de guanina (dinucleotídeos CpG), que podem produzir inibição da expressão gênica por prejudicar a ligação do fator transcricional (WATERLAND e MICHELS, 2007; MANSEGO *et al.*, 2013; CHANGO e POGRIBNY, 2015; MITCHELL, SCHNEPER e NOTTERMAN, 2016). As modificações pos-traducionais de histonas (acetilação, metilação, ubiquitinação, fosforilação) corresponde a adição de grupos metil, acetil as caudas das histonas, aumentando ou diminuindo a afinidade eletrostática entre as histonas e o DNA e, assim, promovem uma estrutura de cromatina que é mais permissiva ou inativa à transcrição de genes (BOWMAN e POIRIER, 2015). A adição de grupos acetil nas histonas é regulada pela ação das histona acetiltransferases (HATs), enquanto a remoção de grupos acetil é catalisada pela histona desacetilase (HDACs) (GRAFF e TSAI, 2013). MicroRNAs são

pequenas moléculas de RNA endógenas não codificantes envolvidas na regulação de genes e estão localizadas em íntrons de genes que codificam proteínas, íntrons de genes não codificadores ou exons de genes não codificadores; eles foram implicados em muitos processos celulares, incluindo proliferação, apoptose, diferenciação, senescência e respostas ao estresse e estímulos imunológicos (D'IPPOLITO e IORIO, 2013). Nesse contexto, tem sido investigado como o aspecto nutricional pode induzir essas modificações epigenéticas. A hipótese é que as modificações epigenéticas são um mecanismo abrangente que liga a nutrição materna a modulação de fenótipos na prole (MAZZIO e SOLIMAN, 2014; SZARC VEL SZIC *et al.*, 2015).

Considera-se pelo menos três maneiras pelas quais os nutrientes podem induzir a metilação do DNA, alterar a expressão gênica e modificar o fenótipo celular: i) fornecendo suprimento de grupo metil para induzir a formação de S-adenosil-L-metionina (metilação genômica do DNA), modificando a atividade da metiltransferase ou prejudicar o processo de desmetilação do DNA; ii) remodelando a cromatina ou adicionando resíduos de lisina e arginina nas caudas N-terminais de histonas; e iii) alterando a expressão do microRNA (CHONG e WHITELAW, 2004; EGGER *et al.*, 2004; HARDY e TOLLEFSBOL, 2011; STONE *et al.*, 2011). Nesse contexto, conteúdos alterados de aminoácidos, como metionina e cisteína, bem como quantidade reduzida de colina e folato podem modificar o processo de metilação do DNA, levando à hiper e hipometilação do DNA (FIORITO *et al.*, 2014). Em particular, a restrição proteica materna reduz a oferta de grupos metil a partir de metionina quando a demanda fetal é alta (FIORITO *et al.*, 2014). Da mesma forma, uma redução nas calorias maternas gerais durante a gravidez induziu a hipometilação dos promotores no tecido hepático da prole, que resultaram no aumento da expressão de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos (por exemplo, receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR) - α e co-ativador PPAR- γ (PGC) -1 α e expressão reduzida de genes envolvidos na síntese lipídica (por exemplo, proteína de ligação ao elemento de resposta ao esterol-1c e diacilglicerol aciltransferase-1) (RADFORD *et al.*, 2014); induziu a hipometilação dos receptores glicocorticóides e dos promotores de PPAR- α nos fígados da prole que condicionaram alterações na expressão de seus genes-alvo, a restrição proteica materna alterou a metilação da histona e aumentou a metilação do DNA do HNF4 α que resultou finalmente na expressão reduzida de HNF4 α (SANDOVICI *et al.*, 2011), além de modificar a estrutura da cromatina, incluindo histona acetilada H3, histona acetilada H4 e histona di-metilada H3 na lisina 4, foram detectados em um nível significativamente aumentado na região promotora de GLUT4 no músculo de filhote após uma dieta HP materna (ZHENG, ROLLET e PAN, 2012). Os

perfis de microarray indicaram que mmu-miR-615, mmu-miR-124, mmu-miR-376b e mmu-let-7e foram significativamente reduzidos, enquanto que mmu-miR-708 e mmu-miR-879 foram aumentados em dietas maternas com baixa proteína; a análise bioinformática mostrou que os genes-alvo foram mapeados para vias inflamatórias. Os níveis séricos de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) foram maiores e a interleucina 6 (IL-6) teve uma tendência a ser elevada (ZHENG *et al.*, 2017).

2.2 TRANSIÇÃO NUTRICIONAL E RISCOS DE DOENÇAS CARDIOMETABÓLICAS

A transição nutricional é caracterizada pela redução na prevalência da desnutrição em suas diversas dimensões (energética e de macro ou micronutrientes), acompanhada por consumos excessivos de alimentos hipercalóricos e ultra processados, com consequente aumento do peso corporal (ABDULLAH, 2015), essa modificação nutricional é um fenômeno bem documentado nos países em desenvolvimento nos séculos XX e XXI, e induziu alta incidência de doenças crônicas e alta prevalência de obesidade (BATISTA FILHO e RISSIN, 2003; BATISTA FILHO e BATISTA, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2015).

A partir do século XX, a alta incidência de doenças infecciosas e parasitárias vem sendo substituída pela alta prevalência de doenças crônicas e degenerativas (POPKIN, 2015). Concomitante foi possível observar profundas alterações no comportamento e nos hábitos alimentares das famílias em todo o mundo (BATISTA FILHO; BATISTA, 2010). A desnutrição proteica que foi um problema de saúde na primeira metade do século XX, agora, foi substituída por dietas enriquecidas em gordura, principalmente dietas ricas em gorduras saturadas, predispondo ao sobrepeso e obesidade (BATISTA *et al.*, 2013). Atualmente, sugere-se que dois bilhões de pessoas no mundo estejam com sobrepeso e obesidade, com maior prevalência relacionada à obesidade induzida pela dieta, que tem sido associada a disfunções cardiovasculares e endócrinas (HOTAMISLIGIL, 2006; AUBIN *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2012; NG *et al.*, 2014; WENSVEEN *et al.*, 2015)(FAO, IFAD, UNICEF, WFP e WHO, 2018).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, 804 milhões de pessoas ainda encontram-se desnutridas em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO, 2017). Dicotomicamente, desde 1975, a obesidade mundial quase triplicou, alcançando 650 milhões de pessoas. O excesso de peso atingiu mais de 1,9 bilhão de adultos com 18 anos ou mais, até 2016. Atualmente, o sobrepeso e a obesidade matam mais pessoas que a desnutrição (WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO), 2017). O aumento da obesidade se espalha em praticamente todos os continentes do globo, inclusive em países com alta insegurança alimentar. Esse panorama nos aponta para a alarmante coexistência de ambos os agravos

nutricionais, desnutrição e obesidade, numa mesma população, uma das características do fenômeno da transição nutricional (BLACK *et al.*, 2013).

A última década foi marcada por uma série de publicações baseadas em estudos epidemiológicos e experimentais que alertam para a transição nutricional e seus impactos: relatos de manutenção de déficits de estatura paralelos ao sobrepeso e obesidade, com suas múltiplas comorbidades, coexistindo na mesma população, principalmente nos países mais pobres e em desenvolvimento (BLACK *et al.*, 2013; KROKER *et al.*, 2014; SARMIENTO *et al.*, 2014; ABDULLAH, 2015; WINICHAGOON, 2015; KEDING, 2016; SOUSA, OLINDA e PEDRAZA, 2016). Mora-Garcia e colaboradores (2020) mostraram que entre 2005 e 2015, houve uma piora na qualidade da alimentação de crianças e adultos colombianos de menor renda quando comparados aos grupos de níveis socioeconômicos mais elevados (MORA-GARCIA *et al.*, 2020). A coexistência de crianças desnutridas e mães obesas numa mesma residência é realidade no México (KROKER *et al.*, 2014), na Colômbia (SARMIENTO *et al.*, 2014), na China (FENG *et al.*, 2015), na África Subsaariana (STEYN e MCHIZA, 2014) e também no Brasil (SOUSA, OLINDA e PEDRAZA, 2016). A má nutrição na primeira infância é sugerida como outro fator importante por trás do aumento da taxa de obesidade na maioria dos países em desenvolvimento (ABDULLAH, 2015).

Estudos em animais de laboratório mostram que a desnutrição perinatal parece promover programação do metabolismo para condições de escassez nutricional (ZHU, CAO e LI, 2019). Dessa forma, a ocorrência da hipernutrição, precedida pela desnutrição, estabelece um ambiente nutricional pós-natal divergente do ambiente perinatal, que pode acarretar em repercussões deletérias sobre a homeostase energética dos indivíduos (ZHU, CAO e LI, 2019).

A desnutrição materna está associada ao risco de desenvolver doenças cardiovasculares e comorbidades na vida adulta, incluindo hipertensão, síndrome metabólica e diabetes tipo II (BARKER *et al.*, 2007; NUYT, 2008; NUYT e ALEXANDER, 2009). O modelo de dieta materna com baixa proteína durante a gestação e a lactação é um dos modelos animais de plasticidade fenotípica mais estudados (OZANNE e HALES, 2004; COSTA-SILVA *et al.*, 2009; FALCAO-TEBAS *et al.*, 2012; FIDALGO *et al.*, 2013; DE BRITO ALVES *et al.*, 2014; BARROS *et al.*, 2015). Dietas pobre em proteínas (8% de proteína) durante a gestação e lactação está associado a restrição de crescimento, redução assimétrica no crescimento de órgãos, pressão arterial sistólica elevada, dislipidemia e aumento das concentrações plasmáticas de insulina em jejum na maioria dos estudos em roedores (OZANNE e HALES, 2004; COSTA-SILVA *et al.*, 2009; FALCAO-TEBAS *et al.*,

2012; FIDALGO *et al.*, 2012; LEANDRO *et al.*, 2012; DE BRITO ALVES *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2015; DE BRITO ALVES *et al.*, 2016; PAULINO-SILVA e COSTA-SILVA, 2016). No entanto, sabe-se que a magnitude dos resultados cardiovasculares e metabólicos depende do tempo de exposição à dieta restrita em proteínas (ZOHDI *et al.*, 2012; ZOHDI *et al.*, 2015) e da trajetória de crescimento ao longo do período pós-natal (WELLS, 2007; 2011). Um crescimento rápido e o ganho de peso na infância parecem aumentar a taxa metabólica em órgãos, por exemplo, no fígado (TARRY-ADKINS *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016).

Embora a relação entre restrição materna de proteínas, hiperatividade simpática e hipertensão tenha sido sugerida (JOHANSSON *et al.*, 2007; FRANCO *et al.*, 2008; BARROS *et al.*, 2015), poucos estudos descrevem as disfunções fisiológicas responsáveis por produzir esses efeitos. Atualmente, é bem aceito que a desnutrição proteica perinatal aumente os riscos de hipertensão por mecanismos que incluem função vascular anormal (FRANCO MDO *et al.*, 2002; BRAWLEY *et al.*, 2003; FRANCO *et al.*, 2008), morfologia e função dos néfrons alteradas e estimulação do sistema renina-angiotensina (NUYT e ALEXANDER, 2009; SIDDIQUE *et al.*, 2014). Recentemente, estudos têm destacado a contribuição da hiperatividade simpática associada ao aumento do ritmo respiratório e da sensibilidade ao O₂/CO₂ no desenvolvimento da hipertensão induzida por dieta materna com baixa proteína por mecanismos independentes da função barorreflexa (CHEN *et al.*, 2010; BARROS *et al.*, 2015; COSTA-SILVA *et al.*, 2015; DE BRITO ALVES *et al.*, 2015; PAULINO-SILVA e COSTA-SILVA, 2016; DE BRITO ALVES e COSTA-SILVA, 2018). O mecanismo subjacente envolvido nesses efeitos parece estar relacionado à regulação positiva do HIF-1 α nos quimiorreceptores de CB (ITO *et al.*, 2011; ITO *et al.*, 2012; DE BRITO ALVES *et al.*, 2015; NOGUEIRA *et al.*, 2018). Rangel e colaboradores (2014) demonstraram que a metilação do DNA em locais individuais de CpG no promotor do gene da ECA foi significativamente menor em crianças com baixo peso ao nascer na faixa de 6 a 12 anos. Essa alteração nos níveis de metilação tem sido associada a maior atividade da ECA e hipertensão arterial em crianças com baixo peso ao nascer (RANGEL *et al.*, 2014). Uma análise do cérebro fetal de ratos expostos à privação de proteínas durante a segunda metade da gestação mostrou um aumento no mRNA da ECA1 associado à metilação reduzida em várias posições na região promotora da ECA1 (GOYAL *et al.*, 2010). Essa nova evidência sugere como a desnutrição pode contribuir para a alta prevalência de hipertensão.

O sistema nervoso central (SNC), comparado a outros sistemas, tem maior vulnerabilidade a espécies reativas de oxigênio. Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio

modulam a atividade simpática e seu aumento nos principais locais do tronco cerebral está envolvido na etiologia de várias doenças cardiovasculares, por exemplo, doenças causadas pela superexcitação simpática, como a hipertensão neurogênica (CHAN *et al.*, 2006; ESSICK e SAM, 2010). Ferreira e colaboradores mostraram que a desnutrição proteica perinatal aumentou a peroxidação lipídica e diminuiu a atividade de várias enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione redutase), bem como elementos do sistema GSH, no tronco cerebral adulto. Disfunção no metabolismo oxidativo do tronco cerebral, utilizando o mesmo modelo experimental, foi observada em ratos imediatamente após o desmame, associada ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, com diminuição da defesa antioxidante e do status REDOX e disfunção mitocondrial (FERREIRA *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2018). Em relação aos efeitos na bioenergética mitocondrial no coração, observou-se que esses animais apresentaram diminuição da capacidade de fosforilação oxidativa mitocondrial e aumento de espécies reativas de oxigênio no miocárdio. Além disso, a dieta com baixa proteína materna induziu uma diminuição significativa da capacidade antioxidante enzimática (superóxido dismutase, catalase, glutathione-S-transferase e glutathione redutase) e o nível de glutathione quando comparado ao grupo normoprotéico (NASCIMENTO *et al.*, 2014).

A restrição proteica materna afeta a sensibilidade à insulina da prole. Estudos anteriores verificaram que, em ratos, a restrição proteica materna durante a gestação e a lactação induziu uma maior sensibilidade à insulina na prole masculina (ZAMBRANO, E. *et al.*, 2006). Da mesma forma, ratos com dieta materna com restrição de 8% de proteína apresenta resistência central à insulina na idade adulta associada a restrição de crescimento intrauterino (BERENDS *et al.*, 2018). Essa resistência central à insulina foi associada a níveis reduzidos de proteínas da subunidade p110 β da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e aumento da fosforilação serina de IRS-1 no núcleo arqueado do hipotálamo. A expressão do gene que codifica a proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B; Ptpn1) também foi aumentada especificamente na região do hipotálamo (BERENDS *et al.*, 2018); o mecanismo parece também aumentar a sinalização do receptor de insulina mediada pela proteína quinase C (PKC) - ζ no músculo esquelético na prole de mães que foram desnutridas durante a gravidez e lactação (CHEN *et al.*, 2009).

A capacidade do músculo esquelético de responder à restrição proteica materna é uma adaptação evolutiva essencial para otimizar o uso de nutrientes disponíveis durante toda a vida útil; uma resposta importante nesse processo é a ativação de genes que melhoram ou compensam o déficit proteico, estimulando a expressão de transportadores de glicose, enzimas

glicolíticas e lipolíticas que compensam a função alterada das mitocôndrias (DA SILVA ARAGAO *et al.*, 2014; CLAYCOMBE *et al.*, 2015). As reduções persistentes induzidas nos níveis transcricionais de PDK4, nas respostas aguda-crônica do músculo esquelético, sugerem que ocorreram modificações epigenéticas persistentes durante a vida fetal que persiste na vida adulta (DE BRITO ALVES *et al.*, 2017). Além disso, esses animais mostram desperdício de energia e aumento do gasto energético mínimo, devido ao aumento da função mitocondrial no músculo esquelético e ao aumento da densidade mitocondrial no tecido adiposo branco (JOUSSE *et al.*, 2014).

Em relação ao metabolismo hepático, estudos mostraram que ratos com restrição a proteínas suprimiram a gliconeogênese por um mecanismo mediado principalmente pela diminuição do nível de mRNA da fosfoenolpiruvato carboxiquinase hepática, uma enzima da gliconeogênese e pelo aumento dos sinais de insulina através do receptor de insulina (IR) / substrato IR IRS) / fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) / alvo de mamífero da via do complexo mTOR no fígado (TOYOSHIMA *et al.*, 2010). Em relação ao metabolismo lipídico, houve diminuição do conteúdo de triglicerídeos hepáticos em ratos adultos expostos à restrição de proteínas durante a gestação e lactação. Foi sugerido que esse efeito poderia ser devido ao aumento do transporte de ácidos graxos para a matriz mitocondrial ou por alteração na biossíntese de triglicerídeos (QASEM *et al.*, 2015); além disso, o colesterol no sangue e os triglicerídeos eram mais altos na prole adulta (aos 110 dias de idade) alimentados com uma dieta com baixa proteína e reduzida expressão do gene glicoquinase, o sensor de glicose no fígado. A restrição proteica provavelmente leva à detecção inadequada dos níveis de glicose (SOSA-LARIOS *et al.*, 2017).

Foi demonstrado que uma restrição proteica materna reduz o peso e aumenta o conteúdo de gordura da prole de seis meses de idade, com tendência a um número reduzido de mio fibras musculares associadas à expressão reduzida do gene do fator de crescimento semelhante à insulina 2 (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2016). Consistente com a restrição proteica que afeta o metabolismo lipídico, a restrição proteica materna resultou em adipócitos menores no tecido adiposo da prole expostas à restrição proteica durante a gestação e lactação (MARTIN-GRONERT *et al.*, 2016). Apesar de seu tamanho menor, a sensibilidade à insulina desses adipócitos foi prejudicada em associação com a expressão proteica reduzida das principais moléculas sinalizadoras de insulina (por exemplo, AKT) (MARTIN-GRONERT *et al.*, 2016).

No final das décadas de 1980 a 1990, Barker e colegas forneceram evidências epidemiológicas da programação da síndrome metabólica, demonstrando que o baixo peso ao

nascer estava associado com a obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares na vida adulta, por promover mudanças no ambiente fetal, o que pode desencadear alterações e refletir sobre a maturação dos órgãos e sistemas fetais (BARKER, 1999; 2007). Estudos anteriores demonstraram que a dieta rica em gordura aumentou significativamente os pesos dos ratos desnutridos durante a gestação e / ou lactação, aumento da gordura corporal, redução da massa corporal magra e leptina plasmática acentuada, aumento dos níveis de glicose com níveis aumentados de insulina e hipertrigliceridemia em ratos machos (DESAI, BABU e ROSS, 2007).

A interação entre dieta materna e dieta hiperlipídica pós-desmame causa hiperfagia na vida adulta e parece ser consequência da programação fetal (VICKERS *et al.*, 2000). A restrição proteica materna (8% de caseína) durante a gestação e lactação, seguida de uma dieta hiperlipídica pós-desmame (41% de gordura) induziu um percentual aumentado de gordura visceral, sensibilidade à insulina reduzida e aumento da ingestão de alimentos na prole adulta (GOSBY, MALONEY e CATERSON, 2010). Aos 60 dias de idade, a interação entre restrição proteica materna e dieta hiperlipídica pós-desmame mostrou ganho de peso corporal e aumento dos depósitos de gordura retroperitoneal e epididimal, mesmo com a diminuição da ingestão de alimentos em filhotes alimentados com dieta hiperlipídica pós-desmame (ALHEIROS-LIRA *et al.*, 2017). A ingestão contínua de uma dieta hiperlipídica também pode promover hipertrofia e disfunção de adipócitos, o que pode induzir a infiltração de macrófagos pró-inflamatórios no tecido adiposo, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias nesse tecido (OUCHI *et al.*, 2011), caracterizando um estado fisiológico de inflamação crônica, presente em obesos (WENSVEEN *et al.*, 2015; ERIKCI ERTUNC e HOTAMISLIGIL, 2016; LYONS, KENNEDY e ROCHE, 2016), além de aumentar a produção de NO por macrófagos (ALHEIROS-LIRA *et al.*, 2017).. Uma produção elevada de NO tem sido implicada na morte de macrófagos por apoptose (SARIH, SOUVANNAVONG e ADAM, 1993) e na patogênese de doenças inflamatórias (BORGES *et al.*, 2013), sugerindo a existência de uma imunomodulação relacionada aos ácidos graxos da dieta após a programação metabólica induzida pela dieta com baixa proteína materna.

Em um ambiente obesogênico, a desnutrição pré-natal materna parece modificar o perfil de expressão gênica do tecido adiposo da prole a longo prazo de uma maneira específica que pode predispor indivíduos desnutridos pré-natais a metabolismo lipídico alterado e acúmulo de gordura na vida adulta (LUKASZEWSKI *et al.*, 2011). Aos 120 dias, ratos desnutridos durante a gestação e lactação submetidos à dieta obesogênica mostraram um crescimento de recuperação compatível com o peso corporal dos animais adultos, sugerindo

um aumento da adiposidade enquanto apresentavam hiperleptinemia, a concentração sérica elevada de leptina e um aumento de adiposidade (LUKASZEWSKI *et al.*, 2011).

No fígado, a restrição proteica materna de ratos *wistar* (caseína a 8%) durante a gestação e lactação, seguida de uma dieta rica em ácidos graxos saturados pós-desmame (+ 59% de AGS) aos 90 dias de vida induziu redução em todos os estados respiratórios das mitocôndrias hepáticas, apresentou maior inchamento mitocondrial em comparação com controles, além de aumento da peroxidação lipídica, com redução nas atividades de catalase e glutathione peroxidase; sugerindo que ratos adultos submetidos a restrição proteica materna são mais suscetíveis a danos mitocondriais hepáticos causados por uma dieta rica em ácidos graxos saturados após o desmame (SIMOES-ALVES *et al.*, 2019). Em ovelhas, a dieta hiperlipídica pós-natal aumentou o conteúdo de triglicerídeos hepáticos em cordeiros, associado a expressões sub-reguladas de genes relacionados ao metabolismo energético (GLUT1, PPAR α , SREBP1c, PEPCCK) (HOU *et al.*, 2014).

2.3 FÍGADO: ANATOMIA MICROSCÓPICA, MORFOLOGIA E FUNÇÃO HEPÁTICA

O fígado é composto de quatro lóbulos contendo vários tipos de células, incluindo hepatócitos, colangiócitos, células endoteliais, células estreladas e células de Kupffer; sua unidade histológica é o lóbulo hepático, que consiste em cordões poligonais de células hepáticas dispostos ao redor de uma veia central que é um ramo terminal de uma veia hepática; ramos da veia porta, artéria hepática e árvore biliar estão localizados na periferia da veia central (GORDILLO, EVANS e GOUON-EVANS, 2015). Os hepatócitos são as principais células parenquimatosas do fígado, constituindo aproximadamente 80% da massa; são cuboidais e secretam albumina sérica, bile e fatores cruciais de coagulação do sangue; as células epiteliais que revestem os dutos biliares são denominadas colangiócitos, embora deva ser observado também em toda a árvore biliar (GORDILLO, EVANS e GOUON-EVANS, 2015). As células estreladas localizadas no espaço de Disse constituem o principal componente mesenquimal do fígado; quando quiescentes, eles são o principal reservatório de vitamina A, quando ativados por lesão ou infecção, elas se diferenciam em células semelhantes a miofibroblastos, capazes de direcionar a formação de cicatriz fibrótica temporária (PUCHE, SAIMAN e FRIEDMAN, 2013). As células de Kupffer (CK) são macrófagos do fígado que residem nos sinusóides, constituindo 15% das células do fígado (NAITO *et al.*, 2004). Embora não haja evidências diretas que elas regulam a hepatogênese, é provável que tenham impacto na eritropoiese hepática fetal; durante a lesão crônica, os ligantes Wnt liberados pelos CKs durante a fagocitose podem direcionar os progenitores

bipotenciais para o destino dos hepatócitos (BOULTER *et al.*, 2012). Além disso, os CKs desempenham um papel importante na regeneração do fígado, influenciando o comportamento invasivo das células progenitoras do fígado (VAN HUL *et al.*, 2011).

Os dois principais tipos de células do fígado, hepatócitos e colangiócitos, são derivados da endoderme que emerge da linha anterior primitiva do embrião gastrulante e é identificável pelo estágio de 6 h pós-fertilização no peixe-zebra, no 7º dia embrionário em camundongos, e na terceira semana de gestação humana; estudos indicam que, conforme essas células migram em direção à parte anterior do embrião, elas segregam do mesendoderma bipotencial para formar o endoderma definitivo (ED), uma monocamada de células no aspecto ventral do embrião em desenvolvimento (TREMBLAY e ZARET, 2005). O ED então forma um tubo conforme o embrião murino gira ao longo do eixo anterior-posterior (AP) e é padronizado em três domínios progenitores que, em mamíferos, compreendem o intestino anterior, intestino médio e intestino posterior; a endoderme do intestino anterior dá origem ao fígado junto com o pâncreas ventral, estômago, pulmões e tireoide (TREMBLAY e ZARET, 2005; MIYAJIMA, TANAKA e ITOH, 2014). É nessa fase que insultos sofridos podem levar a prejuízos morfológicos e bioquímicos; durante a idade adulta, a renovação celular é bastante lenta, menos de 1 em 10.000 hepatócitos são mitóticos, sugerindo um tempo de renovação de pelo menos um ano (KOPP, GROMPE e SANDER, 2016).

O fígado desempenha muitas funções essenciais, incluindo a produção de bile, a regulação das proteínas plasmáticas e da glicose e a biotransformação de drogas e toxinas; é o primeiro órgão que entra em contato com nutrientes e xenobióticos absorvidos entericamente pela veia porta; além de outros produtos do metabolismo - substâncias que entram no corpo por outras vias e substâncias que não são extraídas do sangue portal durante a primeira passagem - chegam ao fígado pela artéria hepática (RESHETNYAK, 2013). A bilirrubina e os ácidos biliares são os 2 componentes principais da bile e os produtos mais conhecidos do metabolismo do fígado, a formação de bile é essencial para a excreção de produtos residuais endógenos e os conjugados de glucuronídeo e glutatona de muitos xenobióticos (RESHETNYAK, 2013).

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo e regula principalmente o metabolismo de carboidratos e lipídios. O metabolismo anormal de carboidratos e gorduras devido a um desequilíbrio no metabolismo hepático pode resultar em resistência à insulina em tecidos sensíveis à insulina, como o fígado. Um desequilíbrio no metabolismo hepático pode resultar da doença que causa disfunção hepática (DING *et al.*, 2018). O fígado desempenha um papel

significativo no metabolismo do açúcar, é responsável pela formação e armazenamento de glicose. Após o consumo de alimentos, o metabolismo da glicose no fígado resulta em uma rápida transformação da síntese de glicose para o armazenamento de glicose e é regulado pela insulina, um regulador chave (PETERSEN *et al.*, 1998). A insulina contribui para o armazenamento de glicose ao ativar a glicogênio sintase, que medeia a síntese de glicogênio hepático. Quando a secreção de insulina é insuficiente, a síntese de glicogênio hepático é inibida. Isso é ilustrado pela síntese de glicogênio hepático em pacientes com diabetes tipo 1 (HWANG *et al.*, 1995). A função biológica da insulina depende da coordenação das vias de sinalização intracelular. A insulina pode ativar IR (receptor de insulina tirosina quinase), que medeia a fosforilação do AKT para estimular o metabolismo da glicose em associação com PDK1 e mTORC2. A insulina também pode diminuir a regulação de enzimas relacionadas ao glicogênio e ativar a glicogênio sintase quinase, o que reduz a produção de glicose no fígado (DING *et al.*, 2018).

A esterificação, a oxidação e a secreção de ácidos graxos ocorrem nos hepatócitos. Os triglicerídeos são entregues ao fígado para o metabolismo lipídico e absorvidos pelas células do fígado, que são regulados pelos receptores LDL (lipoproteína de baixa densidade) e LRP (proteínas relacionadas ao receptor LDL) (HUSSAIN *et al.*, 1991; ROHLMANN *et al.*, 1998). O excesso de carboidratos pode ser transformado em lipídeos no fígado sob a regulação de fatores de transcrição como SREBP1, ChREBP e LXR, que é referido como a via de síntese de ácido graxo de novo (WANG *et al.*, 2015). Quando a homeostase do metabolismo lipídico hepático é danificada, os triglicerídeos são acumulados patologicamente nas células do fígado devido à regulação positiva da síntese de triglicerídeos, diminuição da decomposição das gotículas de lipídeos e diminuição da função secretora de triglicerídeos e muito LDL (VLDL) (KAWANO e COHEN, 2013). A desregulação da homeostase do metabolismo lipídico hepático acabará por resultar em fígado gorduroso. O mecanismo envolvido na progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) para esteatose hepática não alcoólica, fibrose hepática, cirrose hepática e câncer de fígado ainda não está claro. ANGULO *et al.* 2015 e EKSTEDT *et al.* 2015 descobriram que a fibrose contribuiu para o desenvolvimento de doença hepática crônica em pacientes com DHGNA (ANGULO *et al.*, 2015; EKSTEDT *et al.*, 2015). Embora a fibrose hepática seja devida à ativação excessiva das células estreladas hepáticas (HSCs), o processo é regulado pelo metabolismo lipídico (CHEN *et al.*, 2017; LU, XU e ZHENG, 2017). Portanto, é crucial manter a homeostase do metabolismo lipídico normal para a função biológica saudável do fígado.

O fígado também tem participação importante no metabolismo das proteínas (KATAYAMA, 2020). Esse órgão é capaz de produzir uma variedade de proteínas que inclui, proteínas de coagulação e proteínas ligantes envolvidas no transporte no plasma (albumina, transferrina, lipoproteínas e haptoglobina, uma proteína de fase aguda que se liga irreversivelmente às hemoglobinas após hemólise); essas proteínas possuem características diferentes de substratos, modulação e cinética, apesar de partilharem vias de síntese comum e também podem explicar clinicamente respostas a doenças. O fígado é o único produtor de albumina, o estado nutricional e pressão osmótica do plasma afetam a taxa de produção de albumina (KATAYAMA, 2020).

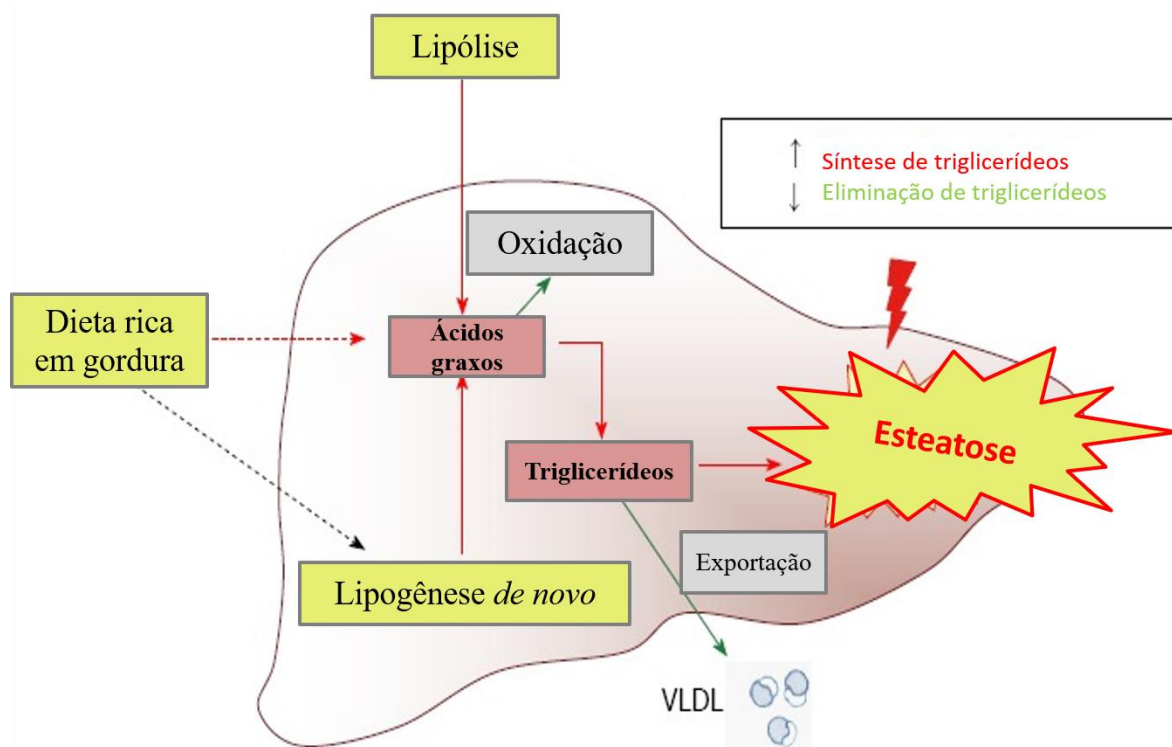
Devido a sua gama de funções, alterações no conteúdo de proteínas, lipídios e carboidratos da dieta podem alterar a homeostase do metabolismo hepático; é interessante observar que alterações no seu metabolismo induzidas pela desnutrição proteica, por exemplo, ocorrem antes mesmo de alterações no tecido adiposo e no músculo esquelético. Modelos experimentais com animais submetidos à desnutrição proteica gestacional, demonstraram um aumento no tamanho dos lóbulos do fígado de ratos aos 90 dias de idade (AMORIM *et al.*, 2009). Ratos submetidos à desnutrição pré e pós-natal, tem apresentado alterações no crescimento e no metabolismo hepático (BALLEN *et al.*, 2009). Alterações histológicas como, esteatose hepática aos 30, 270 e 540 dias de vida (ERHUMA *et al.*, 2007), vacuolização dos hepatócitos, além de apoptose e diminuição da proliferação de hepatócitos por imunocoloração; alterações morfométricas, com diminuição do número e do peso dos fetos e peso de fígados fetais, e aumento da área média dos hepatócitos, assim como diminuição das cristas mitocondriais (RAMADAN, ALSHIRAIHI e AL-KARIM, 2013). Animais jovens submetidos à restrição proteica durante quatro semanas desenvolveram esteatose hepática, seguido de alterações na ultraestrutura mitocondrial e aumento do conteúdo mitocondrial, disfunção mitocondrial com efeitos na cadeia respiratória, levando a uma redução nos níveis de ATP (VAN ZUTPHEN *et al.*, 2016). Também foi demonstrado que a redução no conteúdo proteico durante a gestação e lactação causou diminuição nos níveis de DNAmitocondrial (DNAm_t) de fígado e músculo esquelético de ratos na vida adulta (PARK *et al.*, 2003), assim como animais submetidos à restrição proteica durante a gestação já no primeiro dia pós-natal apresentaram prejuízo no reparo/ciclo/manutenção de genes do metabolismo lipídico e de aminoácidos (ALTOBELLI *et al.*, 2013).

Estudos experimentais tem associado dietas maternas com baixo teor de proteínas a alterações epigenéticas, com influência no estado de metilação do promotor de expressão de genes de PPAR no fígado de ratos descendentes, através de acetilação da histona H3 e H4 e a

metilação de H3K4 (LILLYCROP *et al.*, 2007), além de hipermetilação do DNA do *H19* / *IGF2* com o aumento da expressão de DNA metiltransferases (DNMT1, DNMT3a) em machos (GONG, PAN e CHEN, 2010); hipermetilação do DNA em genes envolvidos na homeostase da glicose em fígados fetais (VAN STRATEN *et al.*, 2010). Do mesmo modo, dietas hipoproteicas durante a gestação aumentaram a expressão de RNAm e atividade da glicose-6-fosfatase em recém nascidos, que contribuiria para o desenvolvimento de hiperglicemia em adultos (JIA *et al.*, 2012).

Dietas ricas em gordura também são capazes de alterar o metabolismo hepático. É amplamente conhecido que a composição de ácidos graxos da dieta é um importante fator capaz de influenciar o metabolismo lipídico hepático. De fato, os ácidos graxos dietéticos são capazes de regular várias vias metabólicas envolvidas no metabolismo lipídico, principalmente por meio de uma modulação da transcrição gênica de enzimas específicas podendo influenciar a patogênese das doenças hepáticas (FERRAMOSCA e ZARA, 2014). As fontes potenciais de ácidos graxos que contribuem para a esteatose hepática são os ácidos graxos não esterificados do tecido adiposo, ácidos graxos da dieta e ácidos graxos recém-produzidos no fígado por meio da lipogênese *de novo* (FERRE e FOUFELLE, 2010)(Figura 1). Estudos realizados em modelos animais, forneceram evidências de que a lipogênese desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da esteatose hepática (POSTIC e GIRARD, 2008). Em particular, o uso de camundongos geneticamente modificados ajudou a esclarecer que o knockdown de enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos foi capaz de reverter a esteatose hepática não alcoólica (POSTIC e GIRARD, 2008).

Figura 1 - Contribuição de várias vias metabólicas para a esteatose hepática. O conteúdo de gordura do fígado reflete o equilíbrio entre várias vias metabólicas envolvidas na síntese de triglicerídeos (setas vermelhas) e depuração (setas verdes). A gordura dietética é um fator importante capaz de influenciar a lipogênese *de novo* (seta pontilhada preta).

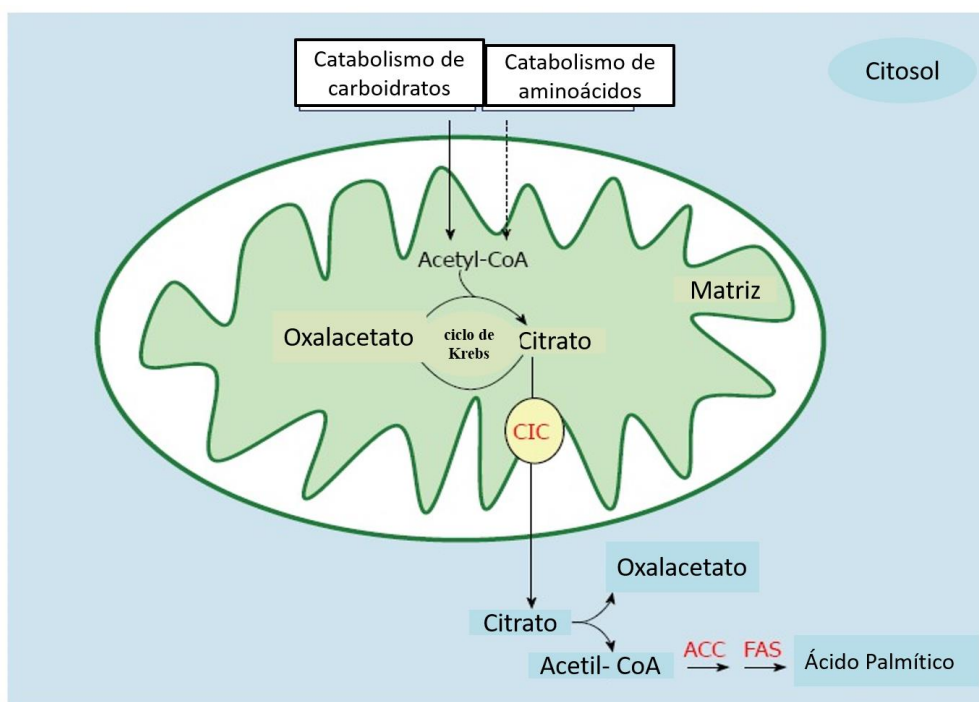


Fonte - Adaptado de Ferramosca e Zara 2014.

A síntese de ácido graxo de novo implica uma série complexa de reações começando na matriz mitocondrial e continuando no citosol dos hepatócitos (Figura 2). O principal combustível para a síntese de ácidos graxos é o acetil-CoA, derivado do catabolismo de carboidratos ou aminoácidos. Como a acetil-CoA é formada na mitocôndria e a síntese de ácidos graxos ocorre no citosol, o grupo acetila deve ser exportado do compartimento intra-mitocondrial para o extra-mitocondrial da célula antes de sua conversão em ácidos graxos. Na verdade, na matriz mitocondrial, o acetil-CoA é inicialmente condensado com oxaloacetato, formando o citrato tricarboxilato, um intermediário do ciclo de Krebs (FERRAMOSCA e ZARA, 2014). Quando esse intermediário não pode ser metabolizado oxidado no ciclo de Krebs por causa de um excesso de energia celular, ele é exportado da matriz mitocondrial para o citosol pelo portador de tricarboxilato mitocondrial ou portador de citrato. Esta proteína transportadora está firmemente inserida na membrana mitocondrial interna (PALMIERI *et al.*, 1992). De fato, no citosol, o citrato transportado gera acetil-CoA, que agora representa o primer para a biossíntese de novo de ácidos graxos e colesterol. A síntese de ácidos graxos citosólicos começa com a conversão de acetil-CoA em malonil-CoA na reação catalisada pela acetil-CoA carboxilase. Em seguida, a extensão sequencial de uma cadeia alcanóica, dois carbonos por vez, é catalisada pela sintase de ácidos graxos (FAS), que eventualmente leva ao ácido palmítico (16: 0), o principal produto da síntese de novo de

ácidos graxos (FERRAMOSCA e ZARA, 2014). A alta taxa de lipogênese, observada na esteatose hepática, parece estar associada à hiperglicemia e hiperinsulinemia (KUMASHIRO *et al.*, 2011). A indução de genes lipogênicos está sob as ações combinadas da proteína de ligação do elemento regulador de esterol-1c (SREBP-1c) em resposta à insulina, e ChREBP (proteína de ligação do elemento responsivo a carboidratos) em resposta à glicose (FLANNERY *et al.*, 2012). Esses eventos também resultam em uma mudança no metabolismo celular da oxidação de lipídios para a esterificação de triglicerídeos, aumentando assim a produção de triglicerídeos hepáticos (PARKS *et al.*, 2008).

Figura 2 - Via de síntese de novo de ácidos graxos no fígado. CIC: Transportador de citrato; ACC: Acetil-CoA carboxilase; FAS: ácido graxo sintase.



Fonte - Adaptado de Ferramosca e Zara 2014.

2.4 MITOCÔNDRIAS: ESTRUTURA E BIOQUÍMICA

Nos primórdios da vida na Terra, bactérias primitivas de vida livre tinham a maquinaria enzimática perfeita para o metabolismo aeróbico, com produção de ATP ligada à respiração; enquanto eucariotos primitivos viviam anaerobicamente. Em algum estágio anterior da evolução, esses seres se uniram numa relação simbiótica e genes bacterianos foram incorporados ao núcleo do hospedeiro eucarioto, essas bactérias endossimbióticas se tornariam posteriormente as famosas mitocôndrias (NELSON, 2011).

As mitocôndrias apresentam em sua estrutura duas membranas, a membrana externa é prontamente permeável a moléculas pequenas, enquanto a membrana interna é extremamente impermeável a maioria das moléculas pequenas. É na membrana mitocondrial interna que estão alojados os complexos da cadeia transportadora de elétrons. A matriz mitocondrial, delimitada pela membrana interna, contém todas as vias de oxidação de combustível celular (ATP), exceto a glicólise (KALUDERCIC e GIORGIO, 2016). Devido a sua origem bacteriana, têm o seu próprio genoma e são capazes de se autorreplicar. A biogênese mitocondrial pode ser definida como o crescimento e a divisão de mitocôndrias pré-existentes. Nesse processo, proteínas mitocondriais são codificadas no núcleo e também na mitocôndria pelo próprio DNAm. O crescimento de novas mitocôndrias pode ser influenciado por estresse ambiental, tais como o exercício, restrição calórica, baixa temperatura, estresse oxidativo e é acompanhada não só por variação em números, mas também em tamanho e massa (JORNAYVAZ e SHULMAN, 2010).

A mitocôndria é a principal executora do metabolismo energético celular, responsável pela grande maioria da síntese de ATP. É nela que estão dispostos os quatro complexos transportadores de elétrons, que impulsionados pelo catabolismo de nutrientes energéticos de carboidratos, lipídios e proteínas, resulta em um grande número de reações de oxido-redução para maximizar a conservação de energia. O resultado final dessas reações é a redução do oxigênio para água. Esses transportadores de elétrons são acoplados a síntese de ATP por um gradiente de potencial eletroquímico de prótons nas mitocôndrias (TAHARA, NAVARETE e KOWALTOWSKI, 2009; FIGUEIRA *et al.*, 2013).

Os transportadores de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial são organizados em complexos supramoleculares dentro da membrana interna. O complexo I, também chamado de NADH-desidrogenase é composto por uma grande cadeia polipeptídica, incluindo flavoproteínas e centros de ferro-enxofre; ele catalisa dois processos simultâneos e obrigatoriamente acoplados, a transferência exergônica para a ubiquinona de um íon hidreto do NADH e um próton para matriz mitocondrial e a transferência endergônica de quatro prótons para o espaço intermembranas. Substâncias químicas, como a rotenona (utilizada em inseticidas), podem inibir o fluxo de elétrons dos centros ferro-enxofre do complexo I e, portanto, bloqueando a fosforilação oxidativa (VAN DER LAAN, HORVATH e PFANNER, 2016).

O complexo II, também chamado de succinato-desidrogenase, é uma enzima do ciclo do ácido cítrico, nele contém uma flavoproteína transferidora de elétrons através dos centros ferro-enxofre até a ubiquinona e um sítio de ligação para o succinato. O complexo III,

chamado de complexo citocromo *bc*, acopla a transferência de elétrons do ubiquinol para o citocromo *c* com o transporte vetorial de prótons da matriz para o espaço intermembranas. O complexo IV, conhecido como citocromo *c*-oxidase, carrega elétrons do citocromo *c* para o oxigênio, reduzindo-o a água e bombeando dois prótons para o espaço intermembranas (JEZEK e HLAVATA, 2005). O bombeamento de prótons pelos três complexos gera um gradiente de prótons que fornece energia para a síntese de ATP a partir do ADP e de P_i pela ATP-sintase na membrana interna. A ATP-sintase realiza catálise rotacional pela força próton-motriz para deslocar o ATP para seu sítio de ligação (VAZQUEZ-ACEVEDO *et al.*, 2016).

Existe ainda, na membrana mitocondrial interna, transportadores de ânion capazes de desacoplar o metabolismo oxidativo mitocondrial, diminuindo a eficiência da fosforilação oxidativa (GARLID *et al.*, 1996). Há cerca de 40 transportadores de ânions mitocondriais, incluindo as UCPs, que são comumente encontrados entre os eucariotos. A ativação de UCPs resulta na reentrada de íons H^+ do espaço intermembrana de volta para a matriz mitocondrial (SLUSE e JARMUSZKIEWICZ, 2002). Ânion de ácidos graxos livres são considerados ativadores de UCPs, enquanto nucleotídeos de purina são considerados inibidores. Os mecanismos exatos pelos quais esses transportadores medeiam à fuga de H^+ através da membrana interna mitocondrial ainda são controversos (SLUSE *et al.*, 2006), entretanto, a literatura sugere que as proteínas desacopladoras podem desempenhar um papel antioxidante, diminuindo a liberação de ânions superóxidos (BARTOSZ, 2009).

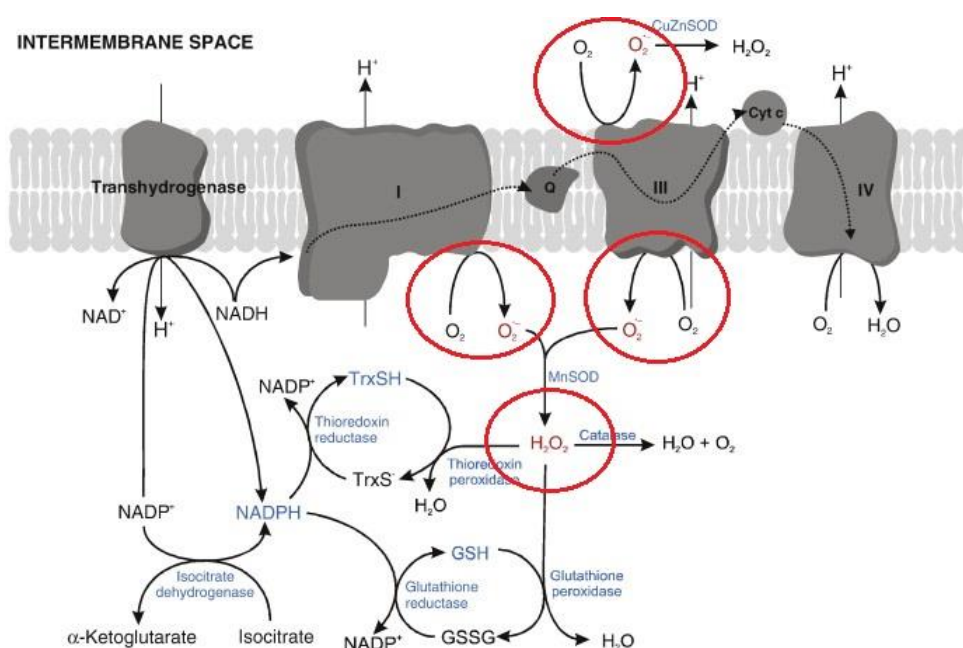
2.4.1 Geração de Espécies Reativas de Oxigênio pelas Mitocôndrias

A formação de espécies reativas em geral, oxigênio e nitrogênio, na célula é desencadeada por processos de síntese de óxido nítrico ($NO\cdot$), xantinas-oxidase, NADPH oxidases e pelas mitocôndrias, através da respiração celular (KALUDERCIC e GIORGIO, 2016). Evidências recentes indicam a existência de um cruzamento entre produção mitocondrial de EROs e xantina-oxidase e NAD(P)H oxidase, o qual pode estimular a formação de EROs mitocondrial resultando num ciclo vicioso de geração de espécies reativas (FIGUEIRA *et al.*, 2013).

O metabolismo energético mitocondrial é reconhecido como a principal fonte de EROs celular na maioria das células eucariotas, cerca de 0,1-2% de todo O_2 produzido fisiologicamente é convertido em ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (STANIEK e NOHL, 2000; QUIJANO *et al.*, 2015). A geração de $O_2^{\cdot-}$ acontece em sítios da cadeia transportadora de elétrons: na ubiquinona (UQ), nos complexos I e III, no grupo prostético Flavina no complexo

I, na transferência de elétrons na flavoproteína (ETF), UQ oxidoredutase, e na glicerol 3-fosfato desidrogenase. Desses sítios, três são bem caracterizados no que diz respeito ao mecanismo de geração de O_2^- , a UQ no complexo III, a UQ e a flavina no complexo I (CARDOSO *et al.*, 2012), gerando cerca de 2-5 % de ânion superóxido via mitocondrial, como ilustrado na figura 3 (ADAM-VIZI e CHINOPOULOS, 2006).

Figura 3 - Geração de EROs pelos complexos I e III na membrana mitocondrial interna e produção de peróxido de hidrogênio como resultado da ação da enzima antioxidante superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD).



Fonte - Adaptado de (KOWALTOWSKI *et al.*, 2009).

O complexo I pode produzir ânion superóxido tanto no sítio de ligação da Flavina, quanto no sítio de ligação da UQ. Esses sítios de ligação do complexo I são considerados um importante doador de elétrons do O_2 para o O_2^- (INDO *et al.*, 2015). Além disso, o centro ferro-enxofre do complexo I, também tem sido proposto como um doador de elétrons ao O_2 , direta ou indiretamente através da semiquinona (LENAZ, 2012). O superóxido também pode ser formado durante o transporte reverso de elétrons, da coenzima Q reduzida para o complexo I, esse mecanismo é inibido pela rotenona (MURPHY, 2009).

A produção de O_2^- pelo complexo III está relacionada com o seu mecanismo particular de transferência de elétrons, o ciclo-Q, ao passo que a transferência de elétrons para o citocromo *b* é retardado pelo gradiente elétrico através da membrana mitocondrial interna e o tempo de meia-vida da UQ é prolongado, permitindo a redução do O_2 para formar o O_2^- (JEZEK e HLAVATA, 2005). A produção de O_2^- pelo complexo III é dependente da meia-

vida de UQ, que pode ser inibido por substâncias que aumentem a meia-vida da UQ, através da inibição de bloqueadores de UQH₂ diminuindo a entrega de elétrons ao complexo II e reduzindo a formação de O₂^{•-} (CAPE, BOWMAN e KRAMER, 2007).

O ânion superóxido, primeira EROs produzida na mitocôndria, dá origem a outras espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, por reações distintas. A dismutação do O₂^{•-} acontece principalmente pela ação da enzima antioxidante superóxido dismutase (Mn-SOD na matriz e Cu/Zn-SOD no espaço intermembrana), presente na mitocôndria e no citosol (NOHL, GILLE e STANIEK, 2005), produzindo peróxido de hidrogênio (H₂O₂), por sua vez, o H₂O₂ pode reagir com íons cobre ou ferro e produzir radicais hidroxil (OH[•]), uma espécie altamente reativa, através da reação de Fenton. Do mesmo modo, na presença de metais de transição, parte desse superóxido pode reagir com o H₂O₂ e também produzir radical hidroxil. Além disso, o O₂^{•-} pode reagir com o NO[•] para formar peroxinitrito (ONOO⁻) (VALKO *et al.*, 2007; FIGUEIRA *et al.*, 2013).

Em condições fisiológicas, a produção de EROs desempenha funções primordiais de segundo mensageiro, com regulação da expressão de genes sensíveis aos sinais REDOX e alterações na homeostase celular, através da síntese de moléculas fisiologicamente ativas (CADENAS e DAVIES, 2000). Entretanto, em concentrações elevadas, EROs podem ser importantes mediadores de danos nas estruturas celulares, de ácidos nucleicos (OZAWA, 1999), lipídios (SPITELLER, 2002) e proteínas (CADENAS e DAVIES, 2000). O radical hidroxil pode reagir com praticamente todos os componentes da molécula de DNA, danificando tanto os nucleotídeos de purina e de pirimidina e também a desoxirribose. Modificações permanentes no material genético resultante de "danos oxidativos" representam o primeiro passo envolvido na mutagênese, carcinogênese e envelhecimento (BARTOSZ, 2009). Além disso, a literatura tem demonstrado que EROs mitocondriais estão amplamente envolvidos em várias doenças humanas e condições degenerativas, como o envelhecimento (FUKUI e MORAES, 2008; DORIGHELLO *et al.*, 2016), do mesmo modo, a produção de EROs está relacionada a indução de modificações pós-traducionais da atividade catalítica da ATP sintase em várias condições fisiopatológicas (KALUDERCIC e GIORGIO, 2016).

2.4.2 Homeostase de Cálcio, Transição de Permeabilidade Mitocondrial e Processos Patológicos

O cálcio atua como segundo mensageiro em muitos processos biológicos, incluindo a proliferação celular, a transcrição de genes, modificações pós-traducionais de proteínas e metabolismo aeróbico (RASOLA e BERNARDI, 2011). A absorção do Ca²⁺ mitocondrial tem

sido relacionada a uma variedade de funções celulares, incluindo exocitose, transcrição genética, regulação do ciclo celular, respiração e morte celular. As mitocôndrias são equipadas com uma maquinaria sofisticada para mediar o fluxo de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial interna, esse sistema é composto por canais, proteínas reguladoras e uma matriz de Ca^{2+} caracterizado como sistema tampão. O uniporte de Ca^{2+} mitocondrial é o principal mediador do transporte de Ca^{2+} para a matriz mitocondrial, um transporte passivo e unidirecional de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial interna, um processo que é conduzido pelo gradiente eletroquímico ($\Delta\psi_m$) em mitocôndrias (KEVIN FOSKETT e MADESH, 2014).

Existem dois mecanismos fisiológicos para liberação do cálcio mitocondrial, um dependente de Na^+ mediado por um translocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e outro independente de Na^+ mediado por um translocador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$. Um terceiro mecanismo de abertura, chamado poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM), é ativado sob condições fisiopatológicas específicas durante uma sobrecarga de Ca^{2+} por longos períodos de tempo (SANTO-DOMINGO, WIEDERKEHR e DE MARCHI, 2015). Esses movimentos do Ca^{2+} são acionados direta ou indiretamente por meio de hidrólise de ATP, tornando as suas funções de sinalização altamente dependente do estado de energia da célula (GLANCY e BALABAN, 2012). Assim, defeitos em processos de fornecimento de ATP podem levar a desregulação da sinalização do Ca^{2+} e podem comprometer o funcionamento celular (BERRIDGE, BOOTMAN e RODERICK, 2003).

De modo geral, o cálcio aparece como um efector positivo das funções mitocondriais e, qualquer perturbação no seu equilíbrio mitocondrial ou citosólico implicará em diversas vias metabólicas celulares (HIDALGO e DONOSO, 2008). Tanto na matriz mitocondrial quanto na membrana mitocondrial interna, existem enzimas que são ativadas alostericamente pelo cálcio, como a α -cetoglutarato desidrogenase, a isocitrato desidrogenase e a piruvato desidrogenase. Também atua como um estimulador da ATP-sintase, da α -glicerofosfato desidrogenase e do translocador de nucleotídeos de adenina (ANT) (BROOKES *et al.*, 2004), estimulando a bioenergética e elevando os níveis de NADH (GLANCY e BALABAN, 2012). A formação de complexos de cálcio com outros íons inorgânicos, como o fosfato, é de extrema importância para que a mitocôndria acumule cálcio sem alterar as suas funções e, desta forma, prevenir a dissipação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) (CARAFOLI, 2010).

Alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial interna induzidas por Ca^{2+} podem ocorrer em consequência da ação de EROs geradas na mitocôndria (VERCESI,

HOFFMANN, *et al.*, 1993; VERCESI, MORENO, *et al.*, 1993). A combinação entre sobrecarga de Ca^{2+} na matriz mitocondrial e estresse oxidativo está relacionada ao processo de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), caracterizado pela abertura de um poro na membrana mitocondrial interna (KOWALTOWSKI, CASTILHO e VERCESI, 2001). Entretanto, as mitocôndrias são mais suscetíveis ao processo de TPM quando seus sistemas antioxidantes, representados principalmente por NADPH, estão esgotados (RONCHI *et al.*, 2015).

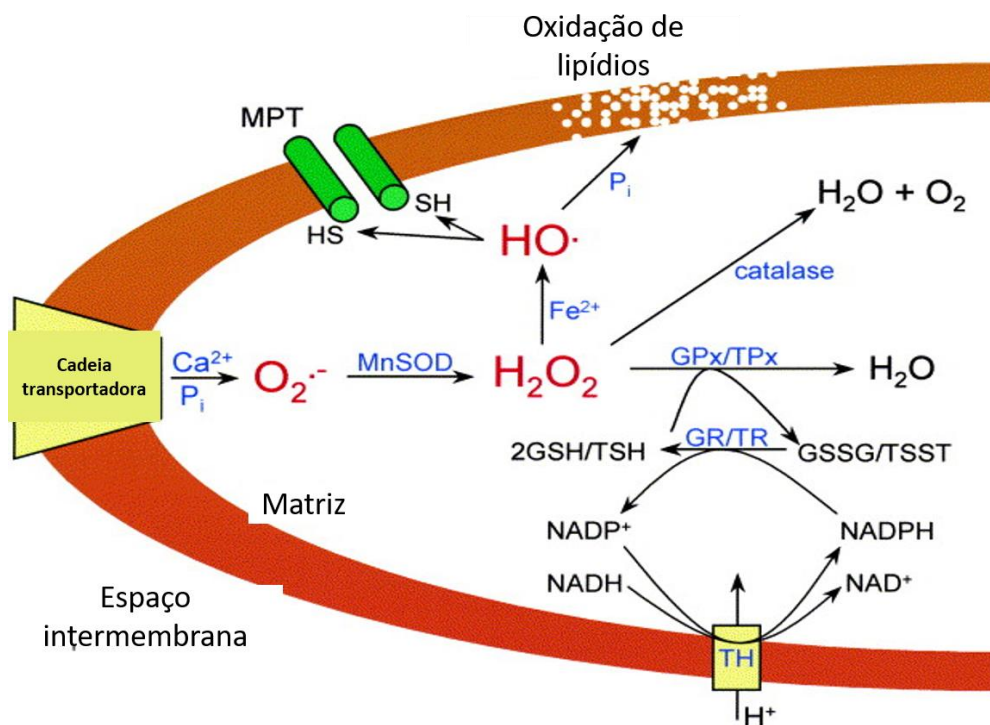
A abertura do PTPM promove o colapso do gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu\text{H}^+$) com despolarização mitocondrial, seguido de inibição respiratória e geração de EROs, hidrólise de ATP e inchamento mitocondrial, além do extravasamento de proteínas pró-apoptóticas para o citosol, como citocromo *c* e caspases, liberação de cálcio, induzindo assim a morte celular (KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999; BAINES, 2009; LEMASTERS *et al.*, 2009; ZOROV *et al.*, 2009; CARAFOLI, 2010).

Vários estudos tem sido feitos no intuito de descobrir todos os componentes do PTPM, dentre esses são conhecidos a ciclofilina D (CyP-D) na matriz mitocondrial, o translocador de nucleotídeos de adenina na membrana interna (ANT), a creatina-cinase mitocondrial no espaço intermembranar, a porina/canal voltagem dependente de ânion (VDAC) na membrana externa, a isoforma II da hexoquinase e o receptor de benzodiazepina periférico, em conjunto com as proteínas da família Bcl-2, associada externamente na superfície mitocondrial (RASOLA e BERNARDI, 2014).

A abertura do PTPM pode ser inibida por um peptídeo de fungo, denominado CsA, após sua interação com a chaperona mitocondrial CyP-D (BROEKEMEIER, DEMPSEY e PFEIFFER, 1989; WOODFIELD, PRICE e HALESTRAP, 1997). A CyP-D pode sofrer várias modificações pós-transducionais, incluindo a fosforilação, acetilação e nitrosilação, que pode afetar o PTPM, proporcionando um notável nível de flexibilidade nos seus modos de regulação (SHULGA e PASTORINO, 2010; RASOLA e BERNARDI, 2011).

O processo de TPM (figura 4) é considerado uma das principais causas de morte celular sob uma variedade de estados patológicos, incluindo isquemia e reperfusão (HALESTRAP e PASDOIS, 2009), doenças neurodegenerativas (NICHOLLS, 2009; RASHEED, TABASSUM e PARVEZ, 2016), lesão cerebral traumática (MBYE *et al.*, 2009) e toxicidade a droga (RUSSMANN, KULLAK-UBLICK e GRATAGLIANO, 2009), além de diversas doenças crônico-degenerativas, tais como câncer, Parkinson, diabetes tipo II (KOWALTOWSKI, CASTILHO e VERCESI, 2001; KOWALTOWSKI *et al.*, 2009).

Figura 4 - O acúmulo de EROs mitocondrial pode provocar a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. Além disso, na presença de cálcio e fosfato inorgânico, a produção de EROs aumenta devido à inativação de vias antioxidantes.



Fonte - (KOWALTOWSKI, CASTILHO e VERCESI, 2001).

Doenças neurodegenerativas são caracterizadas pela morte celular do sistema nervoso central (SNC), causadas principalmente por mutações genéticas e epigenéticas, desregulação do cálcio, estresse oxidativo, neuroinflamação, deficiência do transporte axonal, disfunção mitocondrial pela abertura de PTPM e pelo envelhecimento (RASHEED, TABASSUM e PARVEZ, 2016). A doença de Alzheimer pode estar relacionada ao dano no DNA mt devido ao excesso de EROs (RODRIGUES *et al.*, 2001); a esclerose lateral amiotrófica tem sido relacionada há mutações no gene de enzimas antioxidantes, o que estimularia o processo de TPM (OLIVEIRA, 2010), assim como a doença de Huntington (NORENBERG e RAO, 2007) e a doença de Parkinson (BEAL, 2000).

No diabetes tipo I, a destruição de células beta pancreáticas está associada ao estresse oxidativo e a morte celular via mitocondrial; estudos de Malaguti e colaboradores verificaram que animais diabéticos não obesos apresentam maior suscetibilidade ao processo de TPM induzida por cálcio, determinado pelo inchamento mitocondrial sensível a CsA, além da diminuição da capacidade de retenção de cálcio e maior oxidação de fosfolipídios e diacilgliceróis (MALAGUTI *et al.*, 2014). Do mesmo modo, a doença renal de origem

diabética está associada ao aumento da produção de EROs/ERNs mitocondrial e TPM influenciando vias de morte celular (LINDBLOM *et al.*, 2015).

As doenças hepáticas alcoólicas são caracterizadas por uma complexa interação de múltiplos distúrbios metabólicos, incluindo o estresse oxidativo mitocondrial e sensibilidade para formação do PTPM (MANTENA *et al.*, 2008; GARCIA-RUIZ, KAPLOWITZ e FERNANDEZ-CHECA, 2013). Ratos machos Sprague-Dawley submetidos a elevados níveis de etanol na dieta apresentaram aumento da esteatose hepática, aumento dos níveis de proteínas pró-apoptóticas, reduzida capacidade de retenção de Ca^{2+} , além de aumento da expressão de genes da CyP-D no fígado (KING *et al.*, 2010). Em camundongos, o etanol diminuiu o controle respiratório mitocondrial e aumentou expressão proteica de CyP-D no fígado. As mitocôndrias dos animais alimentados com etanol foram mais sensíveis ao Ca^{2+} induzindo a abertura do PTPM, assim como induzindo inchamento mitocondrial nesses animais (KING *et al.*, 2014).

Privações nutricionais têm sido estudadas como possíveis causas do processo de TPM no fígado. Ratos submetidos à dieta deficiente em colina durante 4, 8, 12 ou 16 semanas apresentaram maior estado desacoplado na respiração mitocondrial. Potencial de membrana mitocondrial reduzido em animais deficientes em colina na 4 e 16 semanas, disfunção mitocondrial foi evidente nesses animais com 16 semanas, assim como diminuição do controle respiratório e aumento da susceptibilidade a TPM induzida por Ca^{2+} em todas as semanas de deficiência de colina no fígado (TEODORO *et al.*, 2008). A privação de proteínas durante a gestação e lactação também parece ser uma causa do desenvolvimento de TPM, nosso grupo de pesquisa, *Bioenergética mitocondrial, metabolismo celular e plasticidade fenotípica*, tem realizado estudos com mitocôndrias isoladas de fígado de ratos e têm demonstrado que ratos machos, aos 30 dias de vida, provenientes de ratas submetidas à dieta hipoproteica (8% de caseína) durante o período perinatal, apresentam uma redução do controle respiratório e menor capacidade de tamponamento do íon Ca^{2+} em comparação com o grupo controle (SILVA-FILHO, 2013). Nossos resultados sugerem que essa disfunção mitocondrial observada em ratos jovens, seja devido a TPM, uma vez que esses resultados foram completamente revertidos na presença de EGTA (quelante de cálcio) ou CsA (um inibidor clássico do PTPM).

Nos últimos anos, pesquisadores de todo o mundo vem estudando componentes que atuam diretamente no processo de TPM, diminuindo a geração de EROs mitocondrial e até reduzindo e/ou bloqueando a abertura de PTPM (HROUDOVA *et al.*, 2016; RASHEED, TABASSUM e PARVEZ, 2016; YU *et al.*, 2016). O JW47, um novo inibidor da CyP-D,

revelou inibição celular seletiva da CyP-D e do PTPM, com reduzida toxicidade celular em comparação a ciclosporina A (WARNE *et al.*, 2016); do mesmo modo, a L-carnitina associada ao piracetam foram capazes de atenuar os efeitos da abertura do PTPM induzidos pela sinvastatina em células de tumor de próstata (COSTA *et al.*, 2013). Estudos também tem mostrado que microRNAs podem atuar como reguladores da função mitocondrial. Foi verificado que a super-expressão do microRNA-7 inibiu a fragmentação mitocondrial, a despolarização do potencial elétrico mitocondrial, liberação de citocromo c através do PTPM, geração de EROs e liberação de cálcio mitocondrial em neuroblastomas humanos e de animais (CHAUDHURI *et al.*, 2016).

3 HIPÓTESE

Desnutrição proteica materna (gestação e lactação), seguida por uma dieta rica em ácidos graxos saturados após o desmame prejudica a bioenergética mitocondrial, o balanço oxidativo, altera marcadores inflamatórios e induz adaptações metabólicas no fígado de ratos aos 90 dias de vida.

4 OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados pós-desmame sobre a bioenergética mitocondrial, balanço oxidativo, marcadores inflamatórios e metabolismo hepático da prole de ratos, aos 90 dias de vida, submetidos previamente à dieta hipoprotéica materna durante a gestação e lactação.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar a amostra:
 - Peso corporal e consumo alimentar;
- Avaliar no sangue:
 - Níveis séricos de glicose, perfil lipídico e marcadores de lesão tecidual (ALT e AST);
- Avaliar em mitocôndrias isoladas de fígado:
 - Capacidade funcional da cadeia transportadora de elétrons;
 - Integridade de membrana mitocondrial;
 - Expressão de genes relacionados a bioenergética e biogênese mitocondrial;
- Avaliar no tecido hepático:
 - Balanço oxidativo celular;
 - Expressão gênica de fatores de transcrição relacionados a bioenergética mitocondrial, enzimas antioxidantes e pro-oxidantes e metabolismo;
 - Expressão de proteínas relacionadas a homeostase do cálcio;
 - Expressão gênica de marcadores inflamatórios;
- Capacidade metabólica.

5 MÉTODOS

5.1 QUESTÕES ÉTICAS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob protocolo N° 23076.046459/2018-17 (ANEXO I), e seguiu as normas e padrões de manipulação e boas práticas no manejo de animais de laboratório, conforme determinações internacionais e orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

5.2 ANIMAIS

Para geração das proles, foram utilizadas 16 ratas albinas, nulíparas, com idade entre 90 e 100 dias de vida e peso entre 230 e 250g, e ratos reprodutores machos, adultos, ambos da linhagem Wistar, provenientes do biotério do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE CAV. As ratas foram acasaladas com os machos na proporção 2:1, durante o ciclo escuro (noturno) dos animais. A observação da presença de espermatozoides no esfregaço vaginal foi usada para definir o 1° dia de prenhes. A partir da determinação da prenhes, as ratas foram alojadas em gaiolas individuais e agrupadas aleatoriamente de acordo com as dietas experimentais com 17% de proteína (dieta controle, n = 8) ou com 8% de proteína (baixa proteína - HP, n = 8) ad libitum durante a gravidez e lactação, como descrito no item 5.3 – manipulação nutricional. A temperatura e a umidade do ambiente foram mantidas dentro dos limites adequados, de 22 a 25 °C e 55 a 65%, respectivamente. Ao nascimento, as proles foram reduzidas, por eutanásia, a oito machos por ninhada, e quando as ninhadas foram compostas por menos de oito machos, fêmeas foram mantidas para padronização do tamanho da prole e adequação do número de filhotes ao número de tetas funcionais das mães. Após o desmame (dia pós-natal 22), um ou dois filhotes machos de cada ninhada foram alocados aleatoriamente em gaiolas coletivas (até quatro animais por gaiola), para garantir a minimização de efeitos advindos de caracteres genéticos. Os filhotes de cada prole (grupos controle e HP) foram alimentados com dieta controle ou hiperlipídica (enriquecida com SFA) até os 90 dias de vida.

5.3 MANIPULAÇÃO NUTRICIONAL

5.3.1 Dietas

As dietas utilizadas foram confeccionadas no Laboratório de Técnica Dietética do Centro Acadêmico de Vitória, dentro das especificações e padrões estabelecidos pelo *American Institute of Nutrition* (AIN – 93), e das normas de manipulação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). As dietas foram compostas pelos ingredientes descritos na Tabela 1, e a composição centesimal, bem como a distribuição de ácidos graxos das dietas pós desmame estão descritas nas

Tabelas 2 e 3, respectivamente, como descrito previamente por Santos Barbosa (2020) (BARBOSA *et al.*, 2020).

Tabela 1 - Composição e análise centesimal das dietas experimentais quanto aos ingredientes utilizados nas formulações.

Ingrediente (g por 100g de dieta)	Normoproteica/ Normolipídica (AIN-93G)	Hipoproteica (AIN-93)	Hiperlipídica AGS +
Amido de milho	39,7	50,3	15
Amido dextrinizado	13,2	13,2	-
Farinha de trigo	-	-	12
Biscoito maisena	-	-	5
Farinha de soja	-	-	6
Banha de porco	-	-	5,3
Creme de leite	-	-	4
Margarina (65% lipídios)	-	-	4
Caseína (>85%)	20	9,4	20
Goma guar	-	-	0,5
Sacarose	10	10	18
Óleo de soja	7	7	4
Fibra (celulose)	5	5	2
Vitaminas	1	1	0,7
Mineral mix	3,5	3,5	2,5
DL-metionina	0,3	0,3	0,25
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25
BTH	0,0014	0,0014	0,014
Glutamato monossódico 12,3%	-	-	0,2
Cloreto de sódio	-	-	0,3
Total (g)	100	100	100
Kcal /100g	369	364	446
Macronutrientes			
(g/100g)			
Umidade	3,5	8,1	4,4
Proteínas	18,6	8,7	22,5
Lipídios	6,1	5,1	15,3
Carboidratos	68,6	75,8	54,7
Cinzas	3,3	2,3	3,1

Tabela 1 - Descrição dos ingredientes e dos macronutrientes que compõem as dietas utilizadas para a manipulação nutricional dos animais. As dietas normoproteica/normolipídica (controle) e hipoproteica foram adaptadas das orientações descritas pelas AIN-93, publicada por Reeves, Nielsen e Fahey (1993). A dieta hiperlipídica (AGS+) foi adaptada do modelo desenvolvido por Ferro-Cavalcante e colaboradores (2013). A análise centesimal foi realizada no Laboratório de Bromatologia do Centro Acadêmico de Vitória (CAV-UFPE).
Fonte: Simões-Alves A.C., 2021.

Tabela 2 - Distribuição percentual de ácidos graxos, quanto à presença ou não de dupla ligação na cadeia carbônica das dietas experimentais formuladas.

Ácidos graxos	Normoproteica/ Normolipídica (AIN-93G)	Hiperlipídica AGS +
Saturados		
Ácido octanoico (C8:0)	0	0
Ácido decanoico (C10:0)	0	0
Ácido láurico (C12:0)	0	0
Ácido mirístico (C14:0)	0	1,09
Ácido pentadecanoato (C15:0)	0	0
Ácido palmítico (C16:0)	11,97	19,1
Ácido heptadecanoato (C17:0)	0	0
Ácido esteárico (C18:0)	4,62	9,4
Ácido araquídico(C20:0)	0,36	0
Ácido behênico(C22:0)	0,37	0
Total	17,32	29,59
Monoinsaturados		
Ácido miristoleico (C14:1)	0	0
Ácido palmitoleico (C16:1)	0	0
Ácido heptadecanoico (C17:1)	0	0
Ácido oleico (C18:1)	29,93	34,77
Ácido eicosenoico (C20:1)	0	0
Total	29,93	34,77
Poliinsaturados		
Ácido linolênico (C18:3)	3,89	5,11
Ácido linoleico (C18:2)	48,87	30,53
Total	52,76	35,64
Ômega 3(g/100g)	0,27	0,78
Ômega 6(g/100g)	3,42	4,66
Razão ômega 6:3	12,66	5,97

Tabela 2 - Descrição do percentual de ácidos graxos das dietas pós-desmame. A dieta normoproteica/normolipídica (controle) foi baseada na AIN-93, publicada por Reeves, Nielsen e Fahey (1993). A dieta hiperlipídica (AGS+) foi adaptada do modelo desenvolvido por Ferro-Cavalcante e colaboradores (2013). Os ácidos graxos foram identificados segundo padrão externo (FAME Supelco™ mix C4-C24, Bellefonte, PA, USA) e o percentual calculado conforme normalização das áreas dos picos pelo método de cromatografia gasosa no Laboratório de Fitoquímicos e Processos, do Centro de Tecnologias e Estratégias do Nordeste – CETENE. A partir da determinação percentual de ácido linolênico (ômega 3) e linoleico (ômega 6) foram calculadas as quantidades (g/100g de dieta) desses ácidos graxos e obteve-se a razão de ômega 6 / 3.

Fonte: Simões-Alves A.C., 2021.

5.3.2 Indução da desnutrição proteica

A indução da desnutrição proteica materna foi baseada em manipulação nutricional, com utilização de dois tipos de dieta durante todo o período de gestação e lactação (até 21 dias após o parto), sendo:

- Grupo controle (C), cujas mães receberam dieta normoproteica/normolipídica (AIN-93G);
- Grupo desnutrido (HP), cujas mães receberam dieta hipoproteica (AIN-93).

5.3.3 Indução da transição nutricional

Após o desmame, os filhotes foram mantidos em gaiolas coletivas com 3 a 4 animais cada, com balanceamento do número de filhotes por gaiola por grupo, com água e dietas normoproteica/normolipídica (C) ou hiperlipídica (HL) *ad libitum*.

5.4 DESENHO EXPERIMENTAL

O protocolo experimental materno se iniciou a partir da identificação da prenhez por esfregaço vaginal. As ratas prenhas foram submetidas à uma nutrição balanceada ou à restrição proteica no período de gestação e lactação, recebendo dieta controle (C, 18% de caseína) ou dieta com baixo teor de proteínas (HP, 8% de caseína). As proles foram reduzidas a 8 filhotes por ninhada ao nascimento, dando preferência aos filhotes machos; as fêmeas foram utilizadas apenas para complementar o tamanho da ninhada, quando na ausência de 8 machos em uma mesma prole. Os filhotes machos foram submetidos ao desmame aos 21 dias de vida, passando a receber dieta C ou hiperlipídica (HL, 32% de lipídios + 65% de AGS). Assim, foram formados os seguintes grupos experimentais de filhotes:

- Grupo C: cuja mãe do filhote recebeu dieta controle durante a gestação e lactação e o filhote recebeu dieta controle após o desmame;

5.7 DOSAGEM DE PROTEÍNA

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

5.8 ISOLAMENTO DAS MITOCÔNDRIAS HEPÁTICAS

As mitocôndrias foram isoladas de fígado de ratos jovens, controles e submetidos à restrição proteica, utilizando a técnica de centrifugação diferencial (SCHNEIDER e HOGEBOM, 1951). O fígado, retirado após a eutanásia do animal, foi lavado em solução de sacarose 250 mM contendo tampão 10 mM de HEPES (pH 7,2) e 0,5 mM de EGTA, picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem. O material foi centrifugado a 461g por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado durante 10 minutos a 4722g sendo a fase lipídica superior retirada com pipeta Pasteur. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 250 mM de sacarose, 5 mM de HEPES (pH 7,2) e 0,3 mM de EGTA, e novamente centrifugado como na condição anterior. A fração mitocondrial foi ressuspenso na mesma solução, porém isenta de EGTA.

5.9 AVALIAÇÃO DA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL

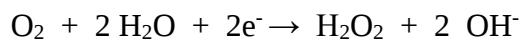
5.9.1 Condições experimentais

Os experimentos com mitocôndrias isoladas de fígado foram realizados a 28 °C em meio de reação contendo 125 mM sacarose, 10 mM de HEPES (pH 7.2), 65 mM KCl, 2 mM K_2HPO_4 , 1 mM $MgCl_2$. Como substrato respiratório foi utilizado substrato para o complexo II (5 mM de succinato e rotenona 2 μ M). Foram adicionados aos experimentos de respiração celular: ADP (200 μ M), oligomicina (1 μ mg/mL) e CCCP (1 μ M).

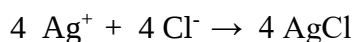
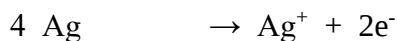
5.9.2 Medida do consumo de oxigênio mitocondrial

O consumo de oxigênio mitocondrial foi medido polarograficamente utilizando-se um eletrodo do tipo OXIGY conectado a um oxígrafo (HansatechInstrument), em uma câmara de vidro fechada (1 mL) e termostatizada (28 °C), equipada com agitador magnético (ROBINSON e COOPER, 1970). Utilizando mitocôndrias isoladas (0,5 mg de proteína/mL). Esse tipo de eletrodo compreende um cátodo de platina e um ânodo de prata, imersos numa solução eletrolítica (geralmente KCl). A superfície do cátodo é revestida por uma fina membrana de teflon ou polietileno, que são permeáveis ao oxigênio. Quando uma pequena

voltagem é aplicada entre os eletrodos, a platina torna-se negativa em relação à prata, tornando-se polarizada. O oxigênio é então reduzido a peróxido de hidrogênio na superfície da platina, funcionando como aceptor de elétrons, segundo as reações:



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



A corrente gerada pela diferença dos eletrodos é relacionada estequiometricamente à concentração de O_2 na superfície do cátodo. Os impulsos elétricos são transmitidos ao oxígrafo, onde foi realizada a leitura.

5.9.3 Avaliação do inchamento e integridade da membrana mitocondrial

O acompanhamento espectrofotométrico da redução da absorbância a 520 nm (VERCESI *et al.*, 1988) foi feito em um espectrofotômetro (SmartSpec Plus – BioRad) utilizando mitocôndrias isoladas (1 mg de proteína/mL). Essa técnica também pode ser utilizada para avaliar o fenômeno de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), o qual resulta em inchamento da organela. A confirmação do aumento do volume mitocondrial em decorrência da TPM foi feita através do uso de inibidores do poro de transição de permeabilidade (como ciclosporina A 0,1 μ M e EGTA 0,5mM).

5.10 AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

5.10.1 Avaliação da produção de malondialdeído (MDA)

Para avaliação da produção de MDA foi utilizada a técnica colorimétrica de Buege e Aust (BUEGE e AUST, 1978; COSTA *et al.*, 2016), uma técnica muito utilizada para avaliar a lipoperoxidação, pois o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da lipoperoxidação, entre eles o malondialdeído e outros aldeídos. Colocou-se uma alíquota do homogeneizado (0,3 mg de proteína/mL), de ácido tricloroacético a 30% e de ácido tiobarbitúrico a 0.8% (v/v) que reage com os produtos da lipoperoxidação para formar um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada por 15 minutos a 100°C e em seguida resfriada. Na sequência, foi adicionado n-butanol e as amostras agitadas por 30 segundos, com o objetivo de extrair o pigmento formado. O material foi centrifugado a 1180g por 10 minutos, sendo então a fase com o n-butanol utilizada para a leitura da absorbância a 535nm, utilizando cubetas de quartzo. Os resultados foram expressos em nmoles de MDA por mg de proteína.

5.10.2 Avaliação da oxidação proteica (Carbonilas)

As espécies de reativas de oxigênio podem induzir a oxidação de resíduos de aminoácidos de proteínas, produzindo assim carbonilas de proteína. O teor de carbonilas de proteína é o marcador mais amplamente utilizado de modificação oxidativa de proteínas. A oxidação das proteínas foi avaliada utilizando os procedimentos realçados por Reznick e Packer (REZNICK e PACKER, 1994). Adicionou-se ácido 2,2,2-tricloroacético (TCA) de 30% (p / v) à amostra (0,3 mg de proteína/mL) sobre gelo e, em seguida, esta mistura foi centrifugada durante 15 min a 1180 G. O sedimento foi suspenso em 2,4-dinitrofenilhidrazina 10 mM (DNPH) e imediatamente incubado num compartimento escuro durante 1 h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e lavadas três vezes com tampão etilo / acetato; posteriormente, o sedimento final suspenso em cloridrato de guanidina 6 M foi incubado durante 5 min num banho de água a 37 ° C e a absorbância foi medida a 370 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína.

5.10.3 Avaliação da concentração de sulfidrilas (SH)

A quantificação de SH foi baseada na redução do ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) como descrito por Aksenov e Markesberk (AKSENOV e MARKESBERY, 2001). A alíquota do homogeneizado (0,45 mg de proteína) foi incubada no escuro com 30 μL de DTNB 10 mM e o volume final de 1 mL foi completado com tampão de extração pH 7,4 e a leitura de absorbância foi efetuada num espectrofotômetro a 412 nm (LIBRARY S12 UV/VISIBLE). Os resultados foram expressos como mmol/mg de proteína.

5.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

5.11.1 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase foi avaliada através do método de auto-oxidação da adrenalina, o qual compete com a SOD podendo ser medido em espectrofotômetro a 420nm. Em uma cubeta de quartzo de 1mL, adicionou-se tampão fosfato (pH 10,2), amostra (0,1 mg de proteína) e adrenalina. A absorbância foi registrada por um período de aproximadamente 3 minutos, a 37 °C. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de proteína necessária para inibir a autooxidação de 1 μmol de adrenalina por minuto. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

5.11.2 Catalase

A atividade da catalase (CAT) é diretamente proporcional a taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, sendo assim, a atividade da enzima pode ser medida através da

avaliação do consumo de peróxido, a 30 °C, pelo decréscimo na absorção a 240 nm (ϵ máx do H_2O_2) de um meio de reação, contendo tampão fosfato (pH=7,4), amostra (0,08 mg de proteína) e 0,3 M de H_2O_2 . Uma unidade de CAT foi definida como a quantidade de proteína necessária para converter 1 μ mol H_2O_2 por minuto em H_2O . Os resultados foram expressos em U/mg de proteína (AEBI, 1984).

5.11.3 Glutathione peroxidase

A atividade da GPx foi realizada de acordo com Paglia e Valentine (PAGLIA e VALENTINE, 1967). Resumidamente, 0,1 mg de a proteína foi adicionada a um tampão de fosfato 50 mM, pH 7,0, contendo EDTA 5 mM; NADPH 0,28 mM; Azida de sódio 3,75 mM; Glutathione 5 mM reduzida (GSH); e glutathione redutase, adquirida a partir de Sigma (St. Louis, MO). A reação foi iniciada com 2,2 mM H_2O_2 . Oxidação de NADPH seguida em absorbância de 340 nm a 20 °C e seu coeficiente de extinção foram usados para determinar a atividade da GPx como U/mg de proteína. Uma unidade de GPx foi definida como a quantidade de proteína necessária para oxidar 1 mol de NADPH por minuto, com base em sua absorbância molecular.

5.11.4 Glutathione-S-Transferase

A atividade da glutathione-S-transferase é diretamente proporcional a taxa de formação do composto DNP-SG (dinitrofenil S glutathione), podendo desta forma ser medida através do monitoramento da taxa de formação do composto. Em uma cubeta de quartzo de 1mL, adicionou-se 800 μ L de tampão, amostra (0,4 mg de proteína), 50 μ L de GSH (concentração final 1mM), 50 μ L de CDNB (concentração final de 1mM). A absorbância foi registrada por um período de aproximadamente 3 minutos com controle da temperatura (30°C). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína (HABIG e JAKOBY, 1981).

5.12 CONCENTRAÇÃO DE GLUTATHIONE REDUZIDA (GSH)

O GSH é o principal antioxidante não enzimático presente nas células. No seu estado reduzido, o grupo tiol de cisteína é capaz de doar um equivalente de redução a moléculas instáveis tais como espécies reativas de oxigênio, diminuindo assim a toxicidade das moléculas instáveis. Adicionou-se um homogeneizado de 0,3 mg /mL a tampão fosfato 0,1 M (pH 8,0) contendo EDTA 5 mM e incubou-se com o-ftaldialdeído (OPT, 1 mg /mL) à temperatura ambiente durante 15 min. A intensidade de fluorescência foi medida a excitação de 350 nm e comprimentos de onda de emissão de 420 nm e comparada com uma curva GSH

padrão conhecida (0,5-10 μ M) (HISSIN e HILF, 1976). Os resultados foram expressos em μ mol/mg de proteína.

5.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS

5.13.1 Fosfofrutoquinase 1 (PFK1)

A atividade máxima da enzima foi determinada segundo método descrito por por Opie e Newsholme (OPIE e NEWSHOLME, 1967). O sistema de reação consiste de Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 25 mM, EDTA 1,0 mM, mercaptoetanol 5 mM, NADH+13 mM, ATP 20mM, AMP 10 mM, aldolase 5 mM, glicose-6-fosfato desidrogenase 5 mM e triose-fosfato-isomerase 5mM, ao qual foi adicionada a amostra em um volume total de 1 mL. O ensaio foi iniciado pela adição do substrato (frutose-6-fosfato 1mM) e as determinações enzimáticas realizadas a 25°C, por 10 min, a 340 nm em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA). Os resultados foram expressos como mmol/mg prot.

5.13.2 glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

A atividade máxima foi avaliada pelo método descrito por Bergmeyer et al. (BERGMEYER e MOELLERING, 1965). O sistema de reação enzimático continha Tris-HCl 86 mM, MgCl₂ 6.9 mM, NADPH + 0.4 mM, glicose-6-fosfato 1.2 mM, Triton X-100 0.05 % (v/v), pH 7.6. Foi adicionado ao sistema de reação, 0.08 mg de proteína total e o ensaio iniciado pela adição do substrato (glicose-6-fosfato). As determinações enzimáticas foram realizadas a 25°C, por 4 min, a 340 nm em um volume final de 0.25mL, em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA). Os resultados foram expressos como mmol/mg prot.

5.14 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE LIPÍDIOS

5.14.1 β -hidroxyacil-CoA desidrogenase (β -HAD)

A atividade da β -HAD foi determinada segundo Ito et al. (ITO *et al.*, 2010). Sua atividade foi avaliada em espectrofluorímetro a um comprimento de onda de 340nm. Preparou uma solução de Imidazol a 50 mM, depois uma solução Mix de Reação (Imidazol 50mM + EDTA 12mM + NADH 0,018mM) da seguinte maneira: o EDTA foi diluído em 30 mL de solução de Imidazol e em seguida a solução calibrada em pH=7,4, para posterior adição de NADH. Após essa etapa a solução foi somada a tampão de extração e amostra, aquecido por 1 min e adicionado Acetil CoA 0,1mM para iniciar a reação e efetuar a leitura da absorbância

em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

5.14.2 Ácido graxo sintase (FAS)

A atividade da FAS foi determinada segundo Goodridge et al. (GOODRIDGE, 1973). A atividade da ácido graxo sintase foi medida seguindo a diminuição na absorbância a 340 nm, 25°C, resultante da oxidação de NADPH dependente da adição de malonil-CoA. Cada reação continha 0,1 M de fosfato de potássio, 0,025 mM de acetil-CoA, 0,18 mM de NADPH, 3 mM de EDTA, 1 mM de DTT e 24 mg de albumina. A reação foi iniciada pela adição do substrato da enzima e a leitura realizada em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA). (GOODRIDGE, 1973). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

5.15 ATIVIDADE CITRATO SINTASE

A atividade máxima da enzima foi determinada segundo Alp et al. 1976 (ALP *et al.*, 1976) a partir da quantificação do complexo formado entre a CoA liberada com o DTNB do meio. O tampão de ensaio foi contido de Tris-aminometano 50mM, EDTA 1 mM, DTNB 0,2 mM, acetil-CoA 0,1 mM, oxaloacetato 0,5 mM e Triton X-1000,05% (v/v) pH 8,1. A reação foi iniciada pela adição de oxaloacetato ao meio e a atividade enzimática foi realizada a 25°C, por 10 min, a 412 nm, em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

5.16 PREPARAÇÃO DO TECIDO PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

Um grupo de animais, aos 90 dias de vida, livre de qualquer procedimento experimental, foram separados para análise da expressão gênica. Os animais passaram por um período de jejum de 6h e logo em seguida foram eutanasiados através do uso de uma guilhotina. Imediatamente o fígado foi removido, congelado e armazenado a -80° C.

5.17 EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA total de cada amostra foi extraído utilizando o reagente TRIzol™ Reagent (Ambion®, Ambion Europe) e clorofórmio hidratado com água DEPC (dietil pirocarbonato), seguido de precipitação com isopropanol, lavagem com etanol a 70%, centrifugação e ressuspensão com H₂O DEPC, e posteriormente tratado com TURBODNAase (Ambion®, Ambion Europe), com o objetivo de eliminar contaminantes de DNA genômico. A concentração e qualidade do RNA total foram determinadas por espectrofotometria usando o

espectrofotômetro NanoDrop[®] 2000. As amostras de RNA foram quantificadas através de espectrofotometria ($\lambda = 260$ nm) e análise em gel de agarose 1% em comparação com o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen[®], Califórnia, EUA).

5.18 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (QRT-PCR)

A RT-PCR quantitativa foi realizada com o kit Quantitect SYBR[™] Green RT-PCR (QIAGEN) e 100ng de RNA. Todas as reações de RT-PCR quantitativa foram realizadas em duplicata, no sistema de PCR em tempo real da Applied Biosystems (ABI 7500). Cada amostra foi amplificada em um termociclador Applied Biosystems[®] 7500, software v.2.0.6. O programa de RT-PCR quantitativa se deu nas seguintes etapas: uma etapa inicial a 50°C por 30 minutos que permitiu a transcrição reversa; outra etapa de 15 minutos a 95°C para ativar a Taq polimerase seguida por 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Controles negativos foram incluídos para detectar contaminação dos reagentes (mix sem molde de RNA). A expressão relativa do RNAm foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O gene *TBP* foi usado como controle endógeno, usando primers específicos (tabela 3). A reação de RT-PCR quantitativa foi realizada medindo-se a intensidade de fluorescência do Sybr-Green I, na qual todas as amostras puderam ser comparadas. A fluorescência emitida foi captada pelo sistema óptico do termociclador e transmitida para um computador onde o *software* fez a análise final dos dados.

Tabela 3 - Sequências de primers usados para a análise de RT-PCR em tempo real.

Sequência de Gene	F/R	5' - 3'	Tm (°C)	Amplicon Size	Ref NCBI
Tbp	F R	TGGTGTGCACAGGAGCCAAG TTCACATCACAGCTCCCCAC	62	139pb	NM_001004198
Pgc1a	F R	TCCTCTGACCCCAGAGTCAC CTTGGTTGGCTTTATGAGGAGG	60	143pb	NM_031347
Nrf2	F R	CCAAGTCCTGCATTGGGTGG GCAAAACTGCCATAGTTGG	60	404pb	NM_001108841
Pparg	F R	CCTCTCTGTGATGGATGACCA GCAAGGCACTTCTGAAACCGAC	60	453pb	NM_013124,
Foxo3	F R	GAGAGCAGATTTGGCAAAGG CCTCATCTCCACACAGAACG	58	182pb	NM_001106395
Sod1	F R	TGAAGAGAGGCATGTTGGAG CCACCTTTGCCCCAAGTCATC	58	164pb	NM_017050
Sod2	F R	TCATGCAGCTGCACCACAGC CCATTGAACTTCAGTGCAGG	60	138pb	NM_017051
Catalase	F R	CATCGGCACATGAATGGCTA ACCTTGGTCAGGTCAAATGG	60	281pb	NM_012520
Gpx1	F R	GTGAGCCTGGGCTCCCTGCG ACTTGAGGGAATTCAGAATC	60	207pb	NM_030826
Gpx2	F R	GCTTCCCTTGCAACCAGTTC CATAAGGGTAGGGCAGCTTG	60	189pb	NM_183403
UCP2	F R	CCTGAAAGCCAACCTCATGAC AGGATCCCAAGCGGAGAAAGG	60	236pb	NM_019354
Nox1	F R	TTGGTCACACTGGATGATAAGC GAATCTTGCTGGTTGACACTTG	58	241pb	NM_053683.1
Rac1	F R	TCCCAATACTCCCATCATCC GCACTCCAGGTATTTGACAGC	60	157pb	NM_134366
Xdh	F R	TCCTGCCATTGATATTGGAC ATGCTACCAAATGCAGGGAT	58	144pb	NM_017154.1
IL1b	F R	CTCTCCACCTCAATGGACAG TTGGGATCCACACTCTCCAG	60	181pb	NM_031512
Tnfa	F R	CCAGACCCTCACACTCAGATC CTTGGTGGTTTGCTACGACG	58	78pb	NM_012675
NF-KB 1	F R	GTGGAGTACGACAACATCTC CAAGAGTCGTCCAGGTCATA	62	176pb	NM_008689
Mfn2	F R	TTGGATGGACTATGCTAGTG TCCTCCGACCACGAGAATG	60	230pb	NM_130894
Hspa9 (Grp75)	F R	TGATGCCAATGGGATTGTGC CTGCTTCAACACGTTCCTTC	60	175pb	NM_001100658
Ppif (CypD)	F R	GGCTACAAAGGCTCCACCTTC GAAAGCGGCTTCCGTAGATG	62	112pb	NM_172243
Vdac1	F R	AACAGTAACACTCGCTTTGG TTGACGTTCTTGCCATCCAG	60	167pb	NM_031353

Os níveis de expressão de mRNA foram quantificados a partir de cDNAs derivados do fígado para os seguintes genes, proteína de ligação TATA box (Tbp; housekeeping), receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma, coativador 1 alfa (Pgc1a), fator de transcrição da proteína de ligação GA, subunidade alfa (Nrf2) , Receptor ativado por proliferador de

peroxissoma (Pparg), caixa Forkhead O3 (Foxo3), Superóxido dismutase 1 (Sod1), Superóxido dismutase 2 (Sod2), Catalase (Cat), Glutathione peroxidase 1 (Gpx1), Glutathione peroxidase 2 (Gpx2), Proteína de desacoplamento 2 (UCP2), pequena família Rac GTPase 1 (Rac1), NADPH oxidase 1 (Nox1), xantina desidrogenase (Xdh), Interleucina 1 beta (IL1b), Fator de necrose tumoral alfa (Tnfa) e fator nuclear do gene do polipeptídeo kappa light potenciador em células B 1 (NF-KB 1), mitofusina 2 (Mfn2); Proteína 9 de choque térmico (Hspa9); Peptidilprolil isomerase F (Ppif); canal 1 de ânion dependente de voltagem (Vdac); Fator de transcrição A, mitocondrial (Tfam).

Fonte: Simões-Alves A.C., 2021.

5.19 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E PROCEDIMENTOS DE *WESTERN BLOTTING*

Foram utilizados 8 µL de tampão RIPA (com anti-proteases) por mg de tecido hepático e a suspensão resultante foi homogeneizada utilizando um kit Precellys Lysing (Bertin, Montigny-le-Bretonneux, França). Após 30 min, as amostras foram centrifugadas (13.000 g, 10 min a 4 ° C). Os sobrenadantes foram coletados e as concentrações de proteínas foram determinadas pelo método de Bradford. As densidades ópticas foram lidas a 595 nm em um leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

As amostras de proteína foram ajustadas para uma concentração final de 1 µg/µL. Após adição de tampão de amostra de Laemmli (Tris HCl 150 mM, glicerol a 36%, SDS a 3%, β-mercaptoetanol a 12%, azul de bromofenol a 0,03%) e desnaturação, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE padrão como descrito anteriormente (PIROLA et al., 2003; DE BRITO ALVES et al., 2017). Marcadores de tamanho de proteína (Precision Plus Protein Standards, Biorad) foram depositados em paralelo. As proteínas separadas foram então transferidas para as membranas de PVDF por transferência semi-seca usando um aparelho Biorad Transblot Turbo Blotting. Utilizaram-se anticorpos secundários anti-coelho, anti-camundongo e anti-cabra (1: 10.000; Sigma Aldrich, França) e a detecção de sinal foi realizada com o reagente ECL Lumina Forte (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). A quimioluminescência foi adquirida em uma câmera ChemiDoc™ XRS + usando o software Image Lab (v4.1, Biorad).

5.20 ANÁLISES DOS DADOS

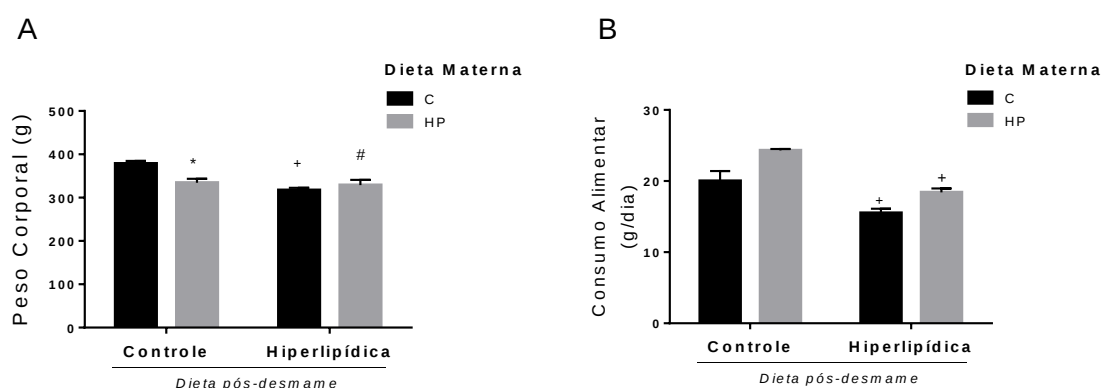
Os resultados estão expressos como média ± epm (erro padrão da média). Para análise estatística, foi utilizado o GraphPad Prism® 6.0 for Windows, e os resultados foram expressos como média ± SEM (erro padrão da média). Os testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk foram aplicados a todos os grupos. O teste ANOVA™ de duas vias foi utilizado para comparar todos os grupos, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi considerado quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 PESO CORPORAL E CONSUMO ALIMENTAR

O peso corporal aos 90 dias foi reduzido nos grupos C-HL ($-14,51\%$, $+ p < 0,05$) e HP-HL ($-11,41\%$, $\# p < 0,05$) quando comparado ao grupo C. No consumo alimentar diário, foi observada uma diminuição no grupo C-HL quando comparado ao C ($-22,47\%$, $+ p < 0,05$); do mesmo modo, HP-HL mostrou um consumo alimentar reduzido quando comparado com HP-C ($-24,22\%$, $+ p < 0,05$) (Figura 6).

Figura 6 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre o peso corporal (A) e consumo alimentar (B) em ratos adultos submetidos à desnutrição proteica perinatal. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM e comparados por ANOVA two way e teste post-hoc de Bonferoni. $n = 6-9$ animais por grupo. $* p < 0,05$ entre os grupos; $+ p < 0,05$ dentro do grupo; $\# p < 0,05$ HP-HL vs. C.



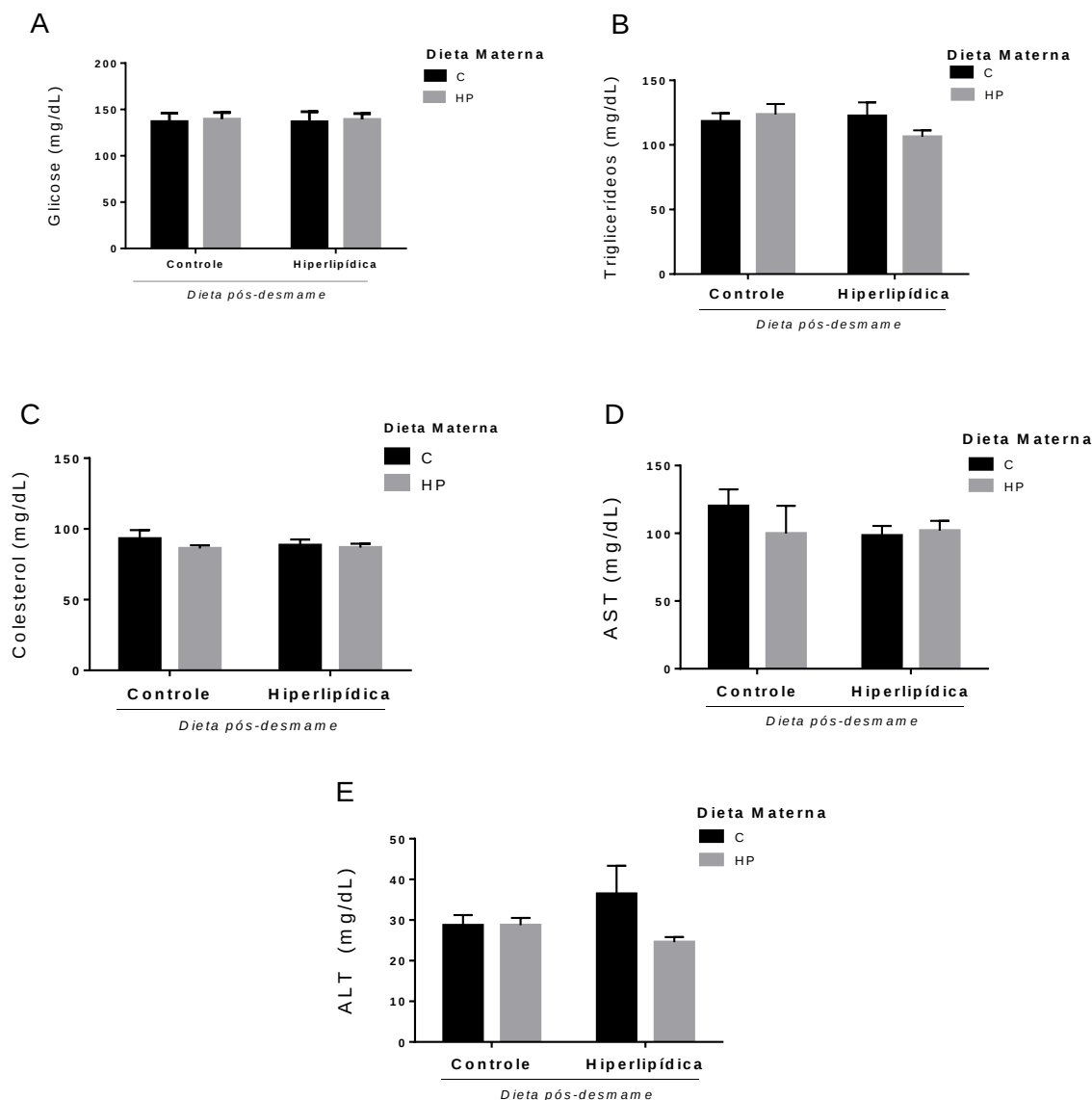
Fonte: Simões-Alves A.C., 2021.

6.2 NÍVEIS SÉRICOS DE GLICOSE, PERFIL LIPÍDICO E MARCADORES DE LESÃO TECIDUAL

Os marcadores circulantes do metabolismo lipídico e da glicose não foram alterados significativamente entre os grupos. Os triglicerídeos, colesterol total e glicose do grupo HP foram semelhantes aos animais controle sob dieta controle e rica em ácidos graxos saturados pós desmame. Assim como não houve alteração nos marcadores de lesão tecidual (ALT e AST) (figura 7).

Figura 7 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre os níveis séricos de glicose (A), triglicerídeos (B), colesterol (C), alanina aminotransferase (ALT) (D) e aspartato aminotransferase (AST) (E) em ratos adultos submetidos à desnutrição proteica perinatal. Os

dados foram expressos como média e $\pm$ SEM e comparados por ANOVA two way e teste post-hoc de Bonferoni. $n = 6-9$ animais por grupo.



Fonte: Simões-Alves A.C., 2021.

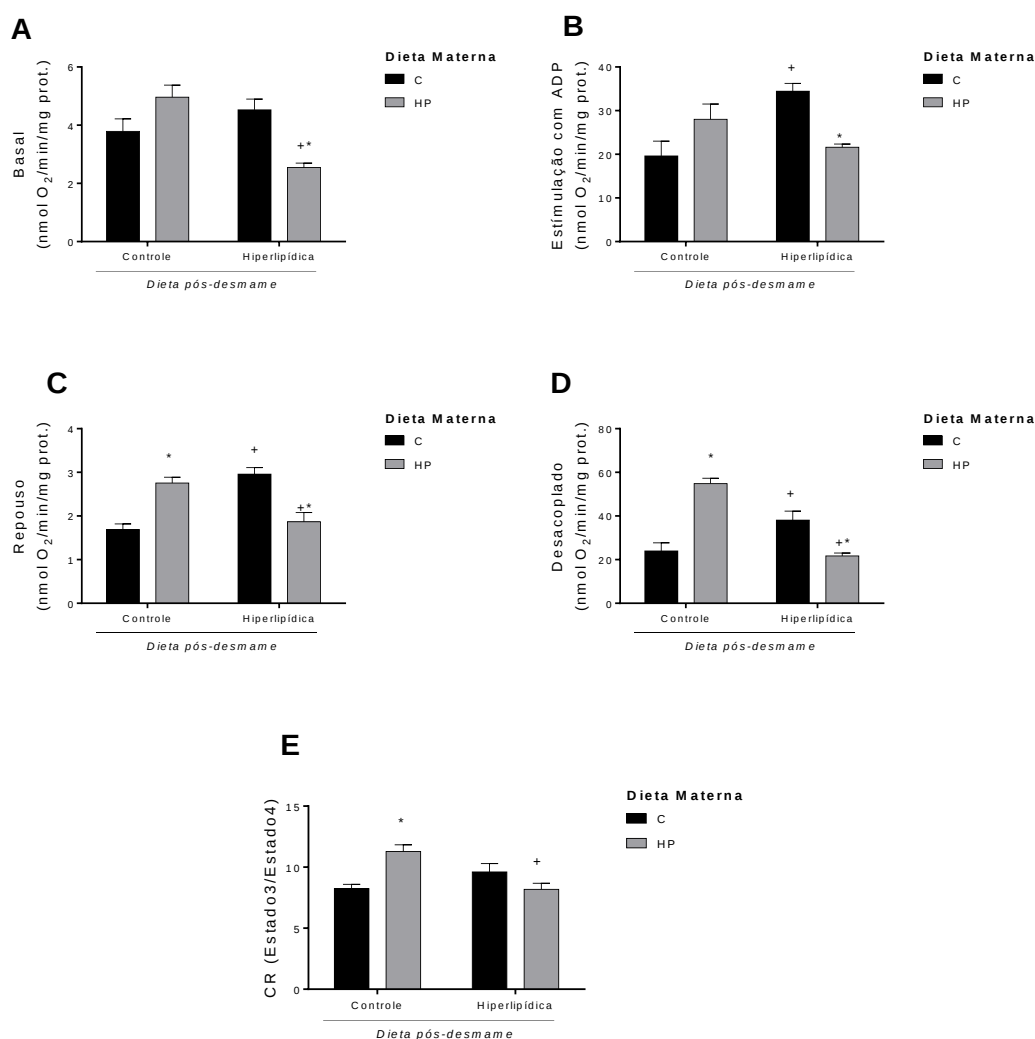
6.3 CAPACIDADE FUNCIONAL DA CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS

6.3.1 Respiração Mitocondrial

A respiração mitocondrial durante o estado basal foi reduzida no grupo HP-HL quando comparada aos grupos HP-C (-43.7% , $p < 0.05$) e C-HL (-48.7% , $p < 0.01$) (Figura 8A); após estimulação com ADP (estado 3), a dieta HL foi capaz de aumentar a fosforilação de ADP no grupo controle (C vs. C-HL) ($+43.01\%$, $p < 0.01$). No entanto, a associação de dietas

em diferentes momentos levou a uma diminuição desse parâmetro (HP-HL vs. C-HL) (-37.3% , $p < 0.01$) (Figura 8B). Na condição de repouso (estado 4), houve aumento nos grupo HP-C ($+63.1\%$, $p < 0.01$) e C-HL ($+75.1\%$, $p < 0.001$) em relação ao respectivo grupo controle (C); e uma diminuição no grupo HP-HL quando comparado com HP-C (-32.1% , $p < 0.05$) e C-HL (-36.8% , $p < 0.01$) (Figura 8C). Da mesma forma, no estado desacoplado, os grupos HP-C ($+128.9\%$, $p < 0.001$) e C-HL ($+59.1\%$, $p < 0.05$) foram maiores do que C; e houve uma diminuição no grupo HP-HL quando comparado com os grupos C-HL (-43.0% , $p < 0.01$) e HP-C (-60.4% , $p < 0.001$) (Figura 8D). O controle respiratório foi significativamente maior no grupo HP-C em comparação com C ($+36.8\%$, $p < 0.05$) e menor no grupo HP-HL em comparação com o grupo HP-C (-25.7% , $p < 0.01$) (Figura 8E).

Figura 8 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre a respiração mitocondrial em ratos adultos submetidos à desnutrição proteica perinatal. Respiração mitocondrial no estado basal (A), com estímulo de ADP (B), estado de repouso (C), estado de desacoplamento (D) e controle respiratório (E), no homogenato de fígado de ratos machos de 90 dias nascidos de mães alimentados com dietas controle (C) ou hipoproteicas (HP), durante a gestação e lactação, e dietas controle (C) ou hiperlipídicas (HL) após o desmame até a idade adulta. $n = 6-9$ animais por grupo. Todos os valores foram expressos como média $\pm$ SEM e comparados por ANOVA two way seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni. * $p < 0,05$ entre os grupos; + $p < 0,05$ dentro do grupo; # $p < 0,05$ HP-HL vs. C.



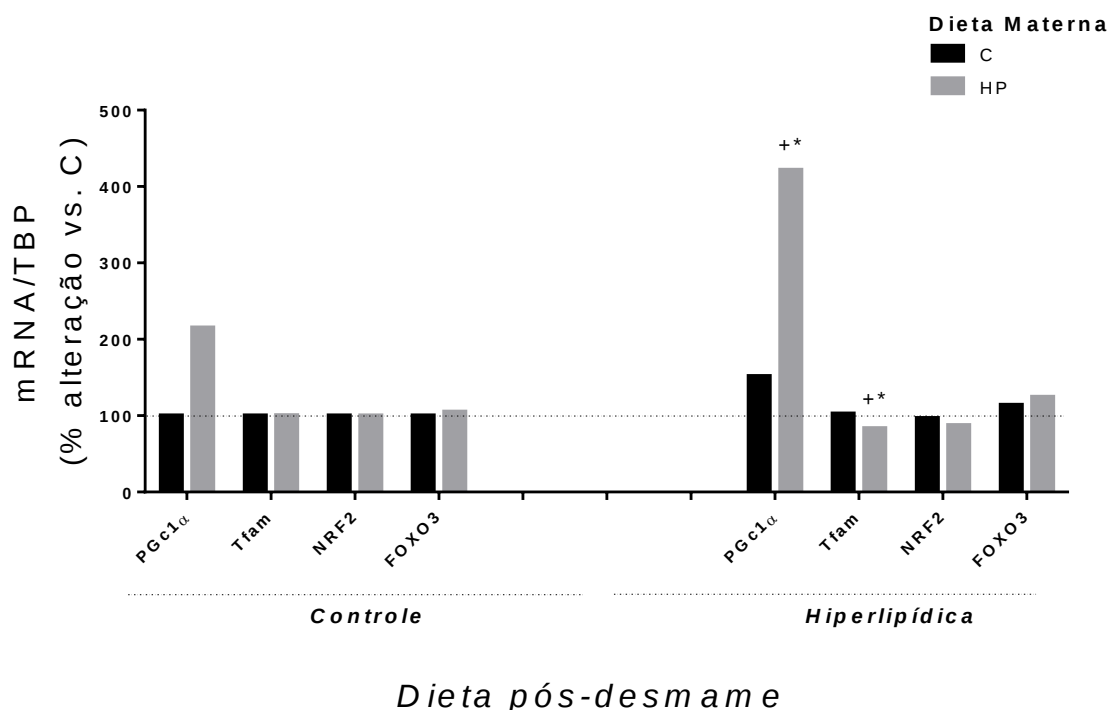
Fonte: Simões-Alves A.C., 2021.

6.4 EXPRESSÃO GENICA DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO RELACIONADOS A BIOENERGÉTICA E BIOGÊNESE MITOCONDRIAL

A expressão de PGC-1 α foi maior no grupo HP-HL quando comparado aos grupos HP-C (+ 178,1%, $p < 0,0001$) e HP-HL (+ 95,9%, $p < 0,001$). Por outro lado, Tfam mostrou uma diminuição entre os grupos HP-HL vs. C-HL (−22,5%, $p < 0,001$) e também entre os grupos HP-HL vs. HP-C (−18,6%, $p < 0,01$) (Figura 9).

Figura 9 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre os níveis de mRNA de PGC-1 α , Tfam, NRF2 e FOXO3 no fígado de ratos adultos submetidos à desnutrição proteica perinatal. Os dados foram padronizados e expressos em variação percentual (%) em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$ entre os grupos; + $p < 0,05$ dentro do grupo; # $p < 0,05$ HP-HL vs.

C. n = 4-5 animais por grupo. Tbp: proteína de ligação ao TATA box, PGC-1 α : Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama coativador 1 alfa, Tfam: fator de transcrição mitocondrial A, NRF2: Fator nuclear 2 relacionado ao eritroide 2, FOXO3: Fator de transcrição Forkhead Box O 3.



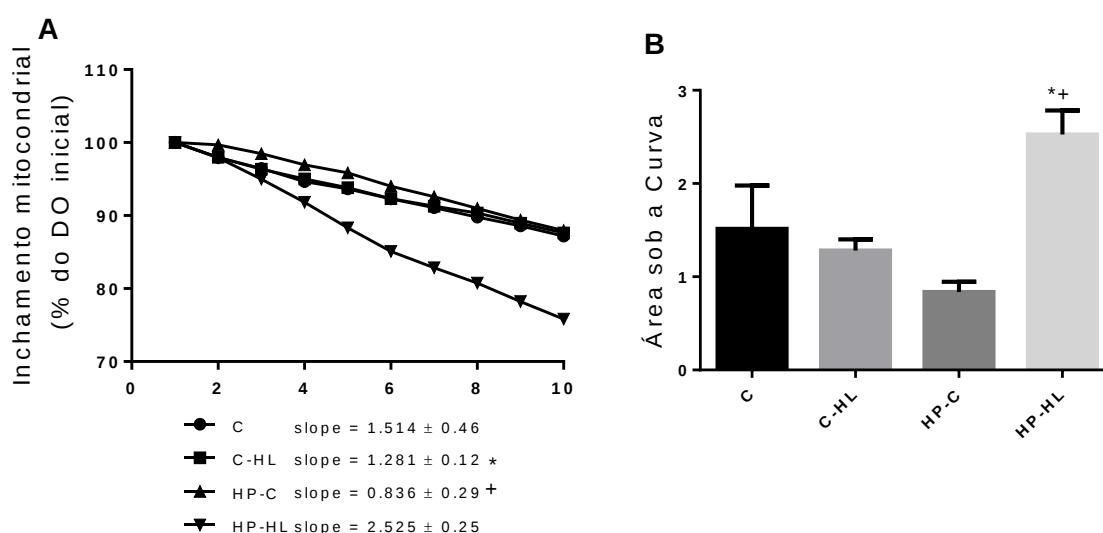
Fonte: Simões-Alves A.C., 2021.

6.5 INTEGRIDADE DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

6.5.1 Inchamento mitocondrial

Os dados de inchamento mitocondrial revelaram que na presença de íon cálcio (10 μ M), a área sob a curva do grupo HP-HL foi maior do que os grupos C-HL (+49.2%, $p < 0.05$) e HP-C (+67.1%, $p < 0.01$) (Figura 10A). Esses achados indicam maior inchamento da organela em animais submetidos a dieta hipoprotéica durante a gestação e lactação e dieta HL pós-desmame (Figura 10B). Após a adição de maiores concentrações de cálcio (20 μ M), o efeito do inchamento no grupo HP-HL (272.1%, $p < 0.01$) foi potencializado. Observou-se que, na presença de CsA (-56%, $p < 0.0001$) e EGTA (-52%, $p < 0.001$), o inchamento mitocondrial foi prevenido no grupo HP-HL.

Figura 10 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre o inchamento mitocondrial em ratos adultos submetidos à desnutrição proteica perinatal. (A) Inchamento mitocondrial (% da absorbância inicial) e (B) área sob a curva nas mitocôndrias isoladas do fígado de ratos machos de 90 dias nascidos de mães alimentadas com uma dieta controle (C) ou baixa proteína (HP), durante a gestação e lactação e dietas controle (C) ou hiperlipídicas (HL) após o desmame até a idade adulta. $n = 6-9$ animais por grupo. Todos os valores foram expressos como média $\pm$ SEM e comparados por ANOVA two way seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni. * $p < 0,05$ entre os grupos; + $p < 0,05$ dentro do grupo.



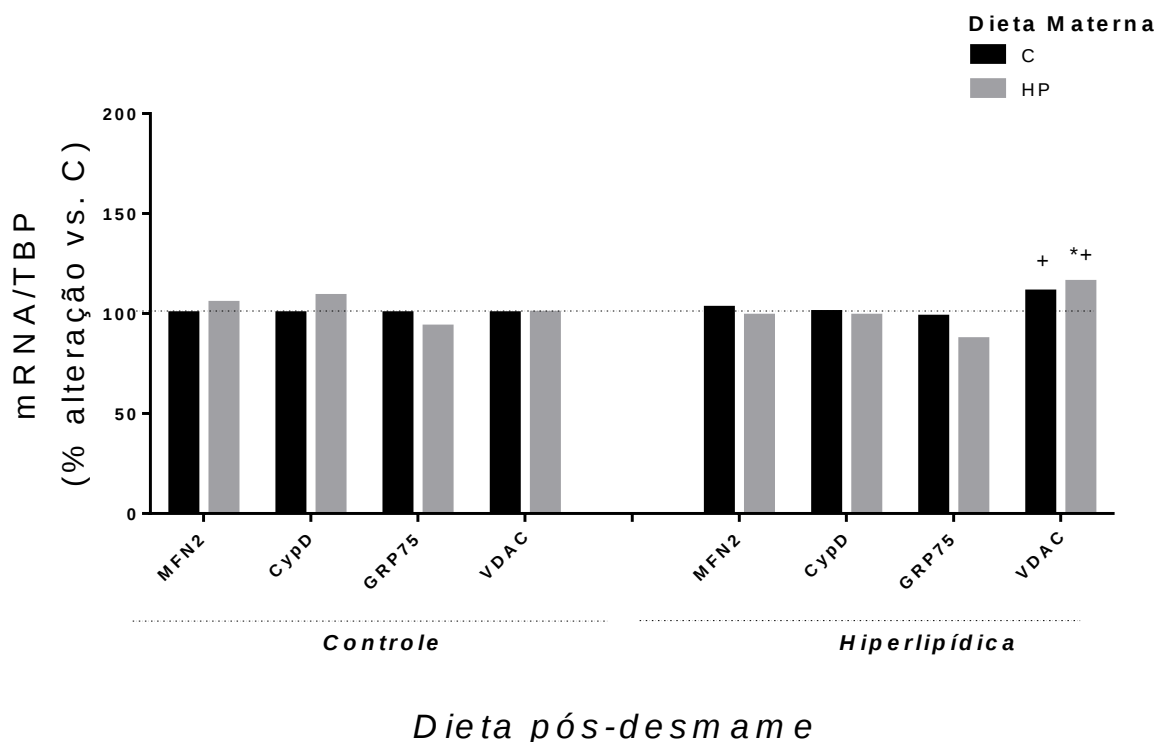
Fonte: Simões-Alves A.C., 2021.

6.5.2 Expressão genica de proteínas relacionadas a homeostase do cálcio

A expressão gênica de MFN2, CypD e GRP75 não mostrou diferenças entre os grupos (Figura 11). Na análise de VDAC, houve aumento quando comparado aos grupos C-HL vs. C (+ 16%, $p < 0,05$), HP-C vs. HP-HL (+ 18,0%, $p < 0,01$), bem como entre HP-HL vs. C-HL (+ 15,1%, $p < 0,05$) (Figura 11D).

Figura 11 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre os níveis de mRNA de MFN2, CypD, GRP75 e VDAC no fígado de ratos adultos submetidos à desnutrição proteica perinatal. Os dados foram padronizados e expressos em variação percentual (%) em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$ entre os grupos; + $p < 0,05$ dentro do grupo. $n = 4-5$ animais por grupo. Tbp: proteína de ligação ao TATA box, MFN2: Mitofusina 2, CypD:

ciclofilina D, GRP75: proteína regulada por glicose 75 (GRP75), VDAC: canal de voltagem dependente de ânion 1.



Fonte: Simões-Alves A.C., 2021.

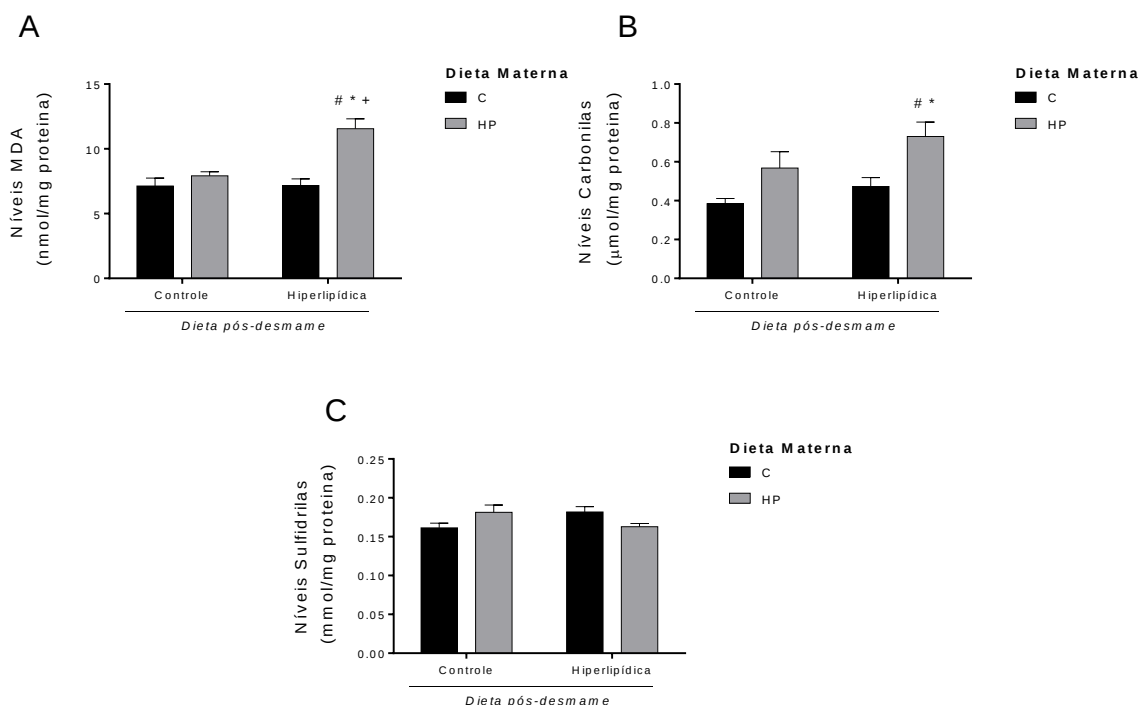
6.6 ESTADO REDOX CELULAR

6.6.1 Biomarcadores de estresse oxidativo

Os biomarcadores de estresse oxidativo mostraram que dieta hipoproteica durante a gestação e lactação seguida por uma dieta rica em ácidos graxos saturados após o desmame aumentou os níveis de malondialdeído (MDA) nos grupos HP-C vs. HP-HL (+42.5%, $p < 0.01$) quando comparados aos grupos C-HL vs. HP-HL (+54.3%, $p < 0.001$) (Figura 12A). Os níveis de carbonilas aumentaram no grupo HP-C vs. HP-HL (+72.2%, $p < 0.01$), como também nos grupos C-HL vs. HP-HL (+60.07%, $p < 0.05$) (Figura 12B). Não houve alteração significativa nos níveis de sulfidrilas (Figura 12C).

Figura 12 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre os níveis de biomarcadores de estresse oxidativo em ratos adultos submetidos à desnutrição proteica perinatal. (A) Níveis de malondialdeído, (B) níveis de carbonilas e (C) níveis de sulfidrilas no homogenato de fígado de ratos machos de 90 dias nascidos de mães alimentadas com uma

dieta controle (C) ou hipoproteica (HP), durante a gestação e lactação, e controle (C) ou dietas hiperlipídicas (HL) após o desmame até a idade adulta. $n = 5-7$ animais por grupo. Todos os valores foram expressos como média $\pm$ SEM e comparados por ANOVA two way seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni. * $p < 0,05$ entre os grupos; + $p < 0,05$ dentro do grupo; # $p < 0,05$ vs. C.

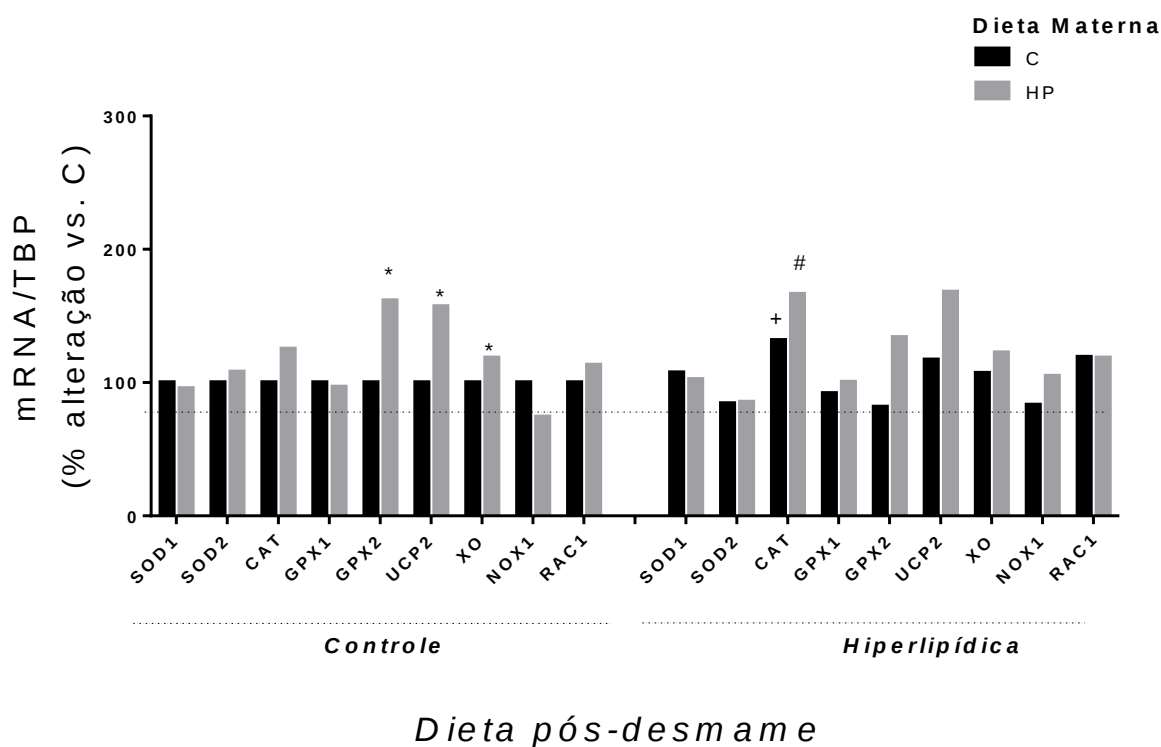


Fonte: Simões-Alves A.C., 2021.

6.6.2 Expressão genica de enzimas antioxidantes e pro-oxidantes

Os níveis de mRNA hepático das enzimas XO, NOX1 e RAC1 (genes pró-oxidantes) não evidenciaram diferenças significativas entre os animais HP e controle. Os níveis de mRNA de GPX2 (+ 62%, $p < 0.05$) e UCP2 (+ 57%, $p < 0.05$) foram regulados positivamente no fígado de animais HP em comparação com C, enquanto os níveis de mRNA de SOD1, SOD2, CAT e GPX1 foram semelhantes entre os dois grupos. A dieta hiperlipídica não alterou significativamente o padrão de expressão da maioria desses genes nos dois grupos. No entanto, os níveis de mRNA de CAT foram significativamente maiores nos grupos C (+32%, $p < 0.05$) e HP (+66%, $p < 0.05$) alimentados com dieta hiperlipídica em comparação com os grupos alimentados com dieta controle (Figura 13).

Figura 13 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre os níveis de mRNA de SOD1, SOD2, CAT, GPX1, GPX2, UCP2 (genes antioxidantes) e XO, NOX1 e RAC1 (genes pró-oxidantes) em ratos adultos submetidos à desnutrição proteica perinatal. Para os níveis de mRNA, os dados foram padronizados e expressos em variação percentual (%) em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$ entre os grupos; + $p < 0,05$ dentro do grupo; # $p < 0,05$ vs. C. $n = 4-5$ animais por grupo. Tbp: proteína de ligação ao TATA box, SOD1: Superóxido dismutase 1, SOD2: Superóxido dismutase 2, Cat: Catalase, GPx1: Glutathione peroxidase 1, GPx2: Glutathione peroxidase 2, UCP2: Proteína desacopladora 2, Rac1: família Rac1 GTPase 1, Nox1: NADPH oxidase 1, XO: Xantina desidrogenase, Tub: Tubulina.



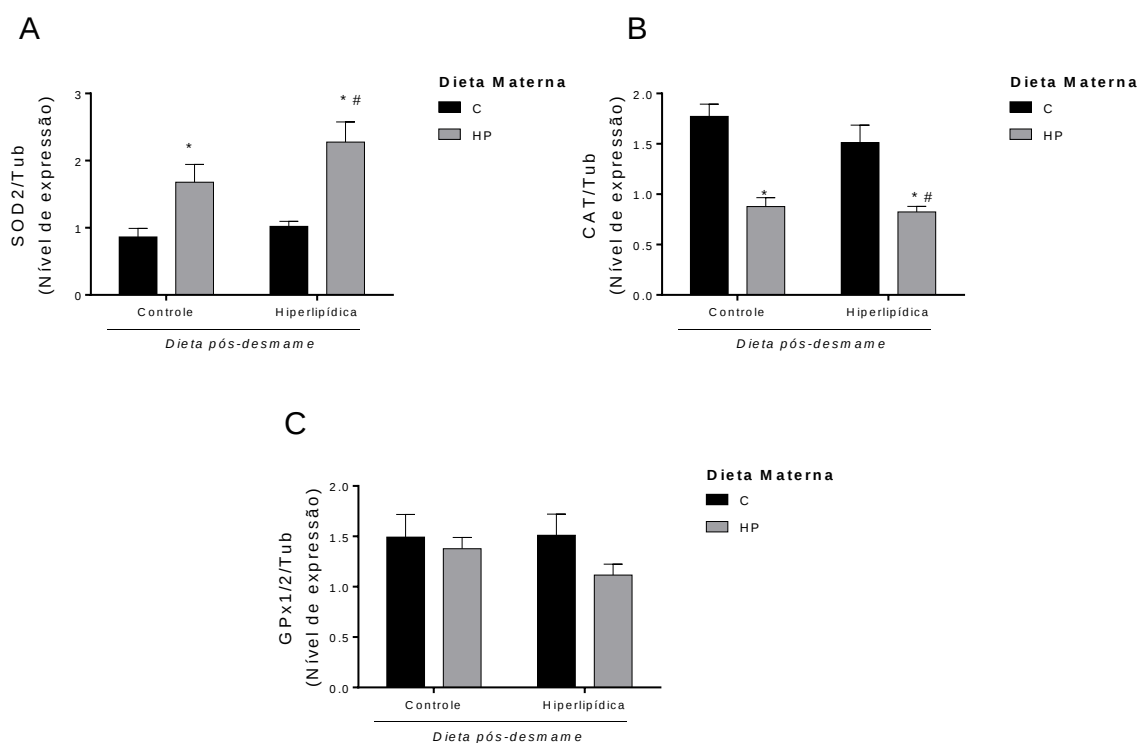
Fonte: Simões-Alves A.C., 2021.

6.6.3 Expressão proteica de enzimas antioxidantes SOD2, CAT, GPX1 / 2

Ao nível de expressão proteica, três enzimas antioxidantes, SOD2, CAT, GPX1/2 foram analisadas como mostrado na figura 14 (A, B e C). Curiosamente, o conteúdo de proteína SOD2 foi ~2 vezes maior no grupo HP em comparação com os animais controle em ambas as dietas controle pós-desmame e hiperlipídica ($p < 0,05$, Figura 14A). Em contraste com a SOD2, o conteúdo de proteína em CAT foi ~ 50% menor no grupo HP em comparação

com animais C submetidos a dietas controle e hiperlipídicas pós-desmame ($p < 0,05$, Figura 14B). Já, a expressão da proteína GPX1 / 2 foi semelhante entre os grupos (Figura 14C).

Figura 14 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre a expressão proteica de Sod2 (A), Cat (B) e Gpx1 / 2 (C) no fígado de ratos adultos submetidos à desnutrição proteica perinatal. Os dados foram normalizados para a expressão de tubulina e apresentados como média $\pm$ SEM. ANOVA two way seguida pelo teste post-hoc de Bonferoni foram usados para comparar os grupos. $n = 4-5$ animais por grupo. * $p < 0,05$ entre os grupos; # $p < 0,05$ vs. C. Tbp: proteína de ligação da TATA box (manutenção), Sod1: Superóxido dismutase 1, Sod2: Superóxido dismutase 2, Cat: Catalase, Gpx1/2: Glutathione peroxidase 1/2, Tub: Tubulina.



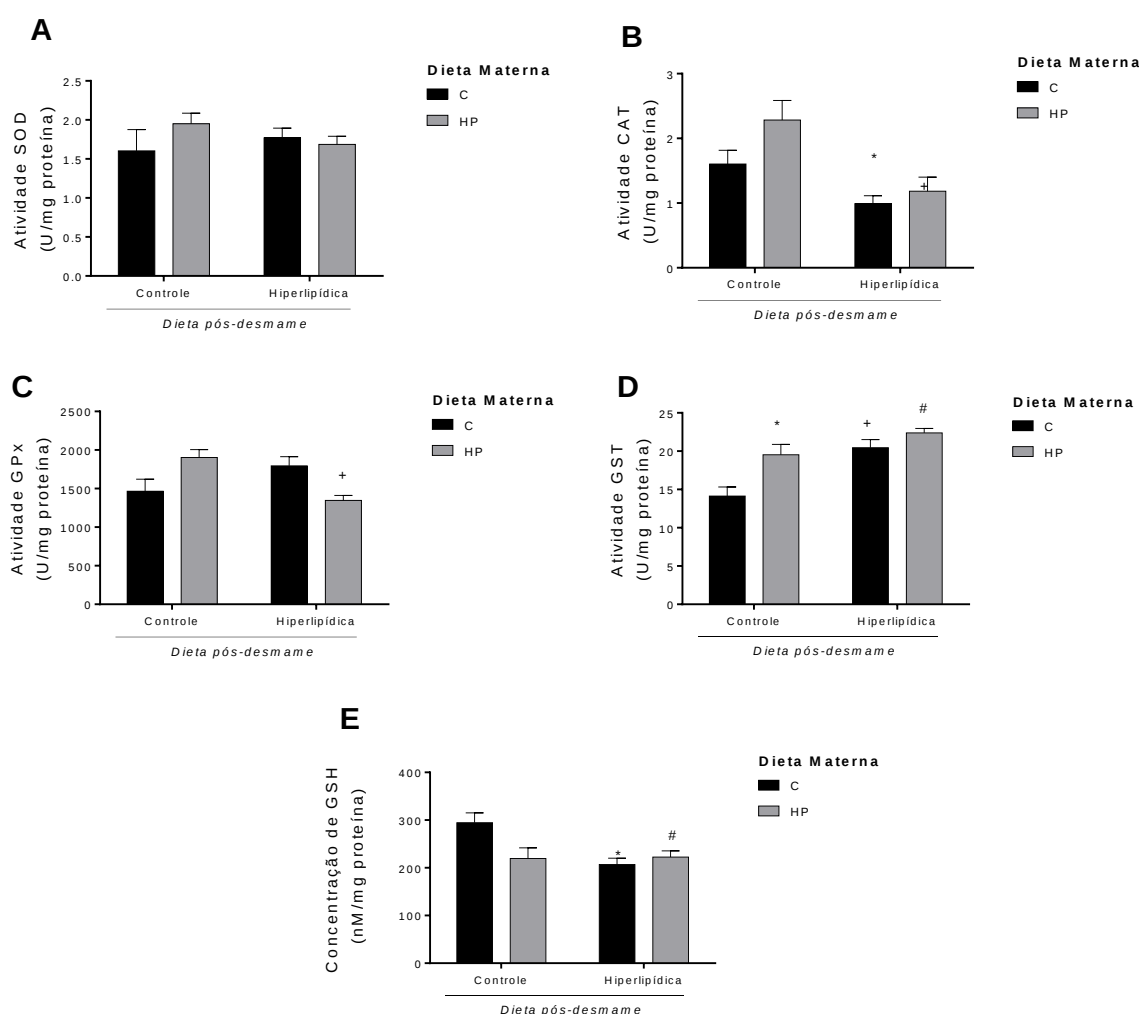
Fonte: Simões-Alves A.C., 2021.

6.6.4 Atividade de enzimas antioxidantes e concentração de glutathione reduzida

A avaliação da resposta antioxidante enzimática revelou que as manipulações nutricionais não alteraram significativamente a atividade da SOD (Figura 15A). No entanto, foi observado que a atividade da CAT ($-48,1\%$, $+p < 0.05$) e GPx (-21% , $+p < 0.05$) foram reduzidos nos grupos HP-C vs. HP-HL (Figura 15B, C, respectivamente). A atividade GST

mostrou um aumento ao comparar os grupos C vs HP-C (+38.1%, + $p < 0.05$), C vs C-HL (+44.5%, * $p < 0.01$) e C vs HP-HL (+58%, # $p < 0.05$) (Figura 15D). A dieta HL levou a uma diminuição na concentração de GSH nos grupos C-HL (-29.7%, * $p < 0.05$) e HP-HL (-24,4%, # $p < 0.05$) em relação ao grupo controle (Figura 15E).

Figura 15 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre a atividade de enzimas antioxidantes e concentração de glutathiona reduzida em ratos adultos submetidos à desnutrição proteica perinatal. (A) Atividade da superóxido dismutase (SOD), (B) atividade da catalase (CAT), (C) atividade da glutathiona peroxidase (GPx), (D) atividade da glutathiona-S-transferase (GST), (E) concentração de glutathiona reduzida (GSH) no homogenato de fígado de ratos machos de 90 dias nascidos de mães alimentadas com uma dieta controle (C) ou hipoprotéica (HP), durante a gestação e lactação, e controle (C) ou dietas hiperlipídicas (HL) após o desmame até a idade adulta. $n = 5-7$ animais por grupo. Todos os valores foram expressos como média $\pm$ SEM e comparados por ANOVA two way seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni. * $p < 0,05$ entre os grupos; + $p < 0,05$ dentro do grupo; # $p < 0,05$ HP-HL vs. C.



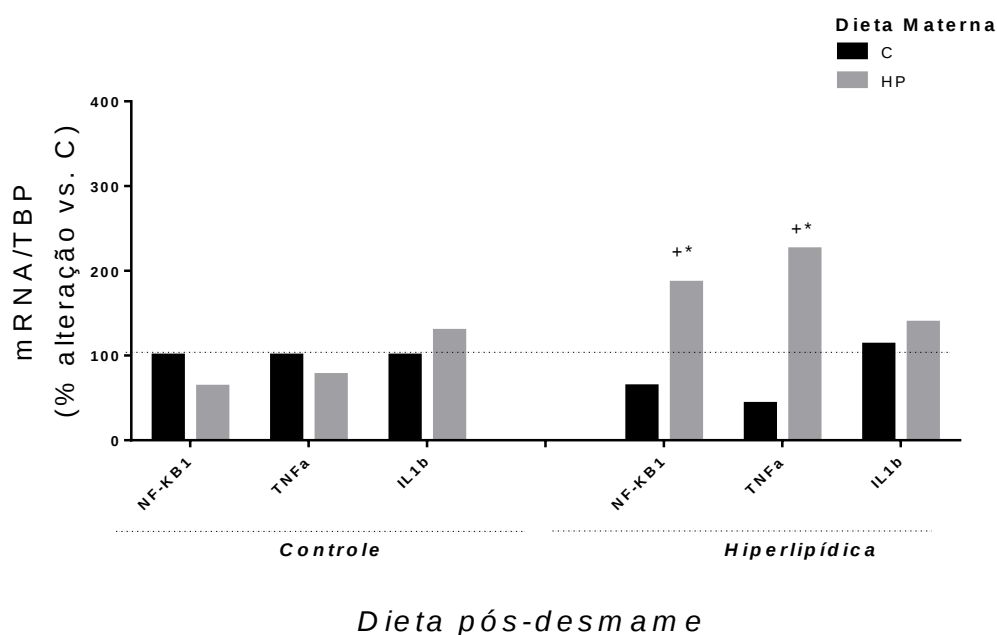
Fonte: Simões-Alves A.C., 2021.

6.7 EXPRESSÃO GENICA DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS

Como o estresse oxidativo e a sinalização de NF- κ B estão intimamente relacionados (Morgan e Liu 2011), investigamos os efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados em marcadores inflamatórios no fígado de ratos adultos submetidos a dieta hipoproteica perinatal (Figura 16). Não foram observadas diferenças significativas entre os animais controle e HP alimentados com a controle após o desmame. No entanto, após uma dieta hiperlipídica, a transcrição gênica de NF- κ B1 (+ 122%, #p <0,05) e TNF α (+ 182%, #p <0,05) foi maior no fígado de animais HP do que nos controles alimentados com dieta HL (C-HL). Além disso, os níveis de mRNA de NF- κ B1 e TNF α foram 123 e 148% maiores no fígado de animais HP alimentados com dieta hiperlipídica do que aqueles alimentados com dieta controle após o desmame (HP-C), respectivamente (p <0,05), enquanto nenhuma

diferença significativa induzida por dieta foi observada nos animais controle alimentados com dieta controle ou hiperlipídica após o desmame. Não foram observadas diferenças significativas na expressão genica de IL1b.

Figura 16 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre os níveis de mRNA de IL1b, Tnf α e NF- κ B1 em ratos adultos submetidos à desnutrição proteica perinatal. Os dados foram expressos em variação percentual (%) em relação ao grupo controle e apresentados como média $\pm$ SEM. ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Bonferoni foram usados para comparar os grupos. n = 4-5 animais por grupo. * p <0,05 entre os grupos; + p <0,05 dentro do grupo. Tbp: proteína de ligação ao TATA box, IL1b: Interleucina 1 beta, Tnf α : Fator de necrose tumoral alfa e NF- κ B1: Fator nuclear do potencializador do gene do polipeptídeo kappa light em células B1.



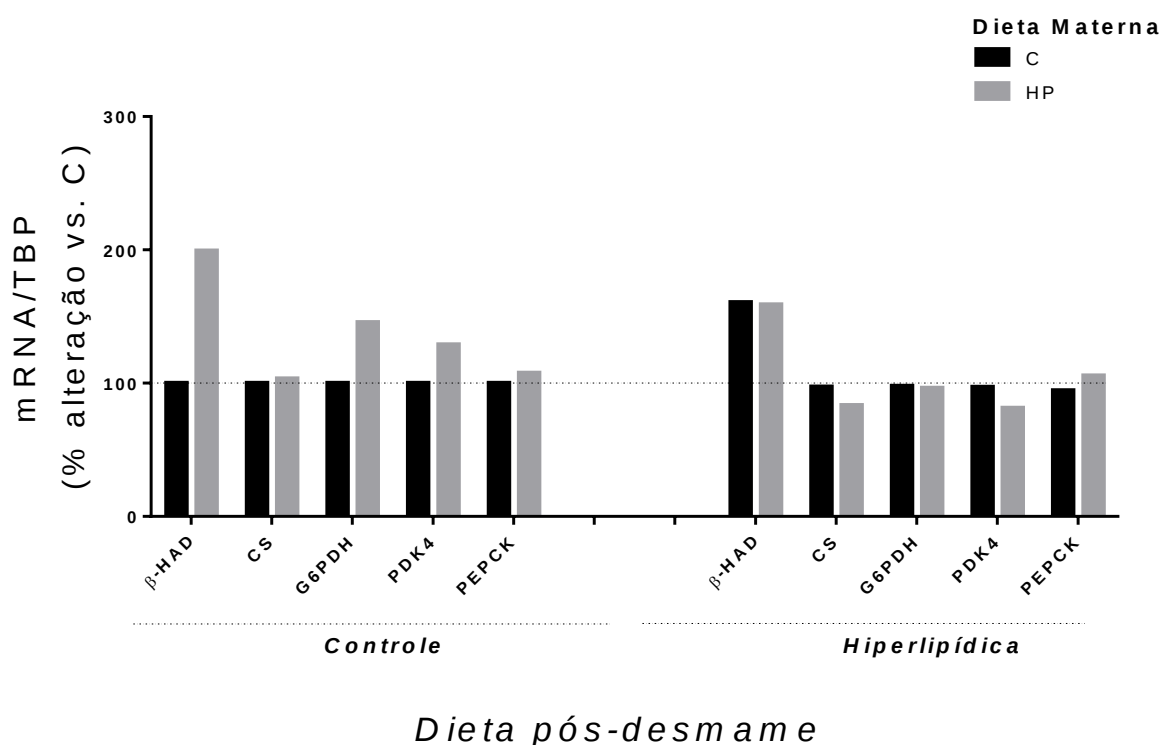
Fonte: Simões-Alves A.C., 2021.

6.8 CAPACIDADE METABÓLICA

6.8.1 Expressão genica de enzimas metabólicas

Os níveis de mRNA hepático das enzimas β -Had, G6PDH, PDK4, CS e PEPCK não evidenciaram diferenças significativas entre os animais HP e controle. A dieta hiperlipídica também não alterou significativamente o padrão de expressão desses genes nos dos grupos alimentados com dieta controle (Figura 17).

Figura 17 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre os níveis de mRNA de β -Had, G6PDH, PDK4, CS e PEPCK em ratos adultos submetidos à desnutrição proteica perinatal. Para os níveis de mRNA, os dados foram padronizados e expressos em variação percentual (%) em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$ entre os grupos; + $p < 0,05$ dentro do grupo; # $p < 0,05$ vs. C. $n = 4-5$ animais por grupo. Tbp: proteína de ligação ao TATA box, β -Had: β -hidroxiacil-coa desidrogenase, G6PDH: Glicose-6-fostato desidrogenase, PDK4: piruvato desidrogenase, CS: Citrato sintase, PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxiquinase.

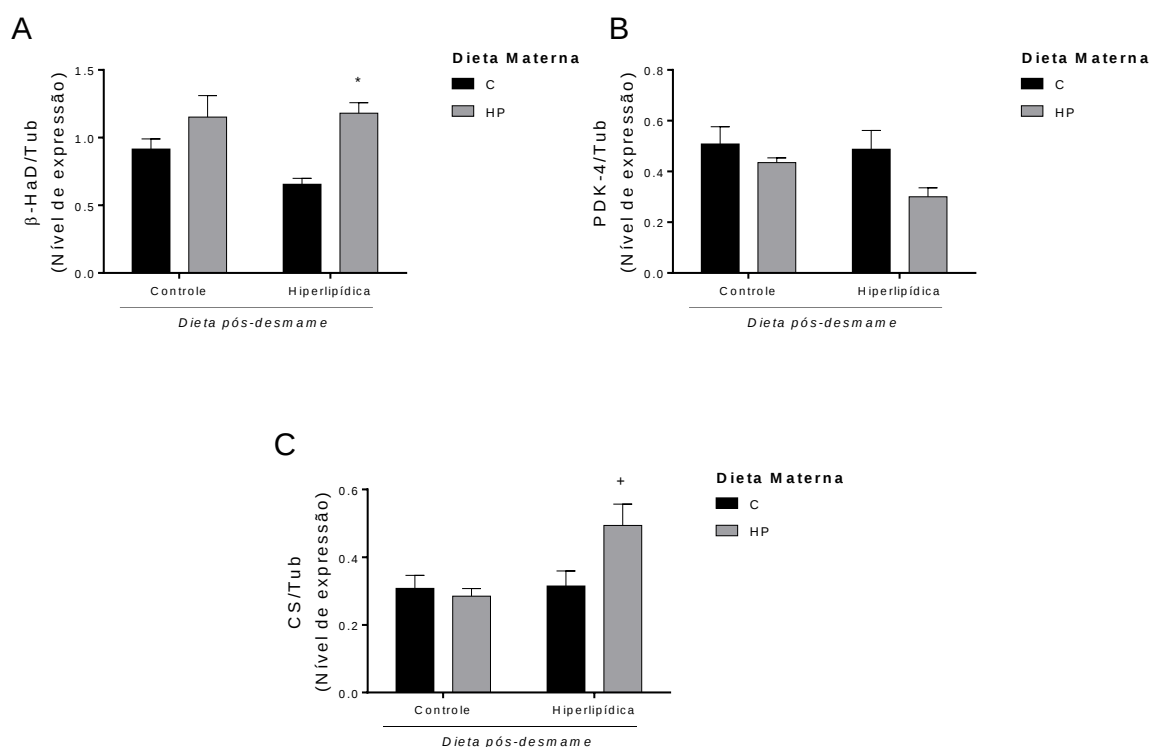


Fonte: Simões-Alves A.C., 2021.

6.8.2 Expressão proteica de enzimas metabólicas

Ao nível de expressão proteica, as três enzimas analisadas, β -Had (A), PDK4 (B) e CS (C) não apresentaram nenhuma alteração significativa quando comparados os grupos HP e controle. Quanto ao conteúdo de proteína da β -Had foi 80% maior no grupo HPHL em comparação com os animais de controle que receberam uma dieta hiperlipídica pós-desmame (* $p < 0,05$, Figura 18A). A expressão da proteína PDK4 foi semelhante entre os grupos (Figura 18B). O conteúdo de proteína da CS foi 73% maior no grupo HPHL em comparação com animais HP (+ $p < 0,05$, Figura 18C).

Figura 18 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre a expressão proteica de β -Had, PDK4 e CS no fígado de ratos adultos submetidos à desnutrição proteica perinatal. Os dados foram normalizados para a expressão de tubulina e apresentados como média $\pm$ SEM. ANOVA two way seguida pelo teste post-hoc de Bonferoni foram usados para comparar os grupos. $n = 4-5$ animais por grupo. * $p < 0,05$ entre os grupos; + $p < 0,05$ dentro do grupo; # $p < 0,05$ vs. C. β -Had: β -hidroxiacil-coa desidrogenase, CS: Citrato Sintase, PDK4: e Tub: Tubulina.



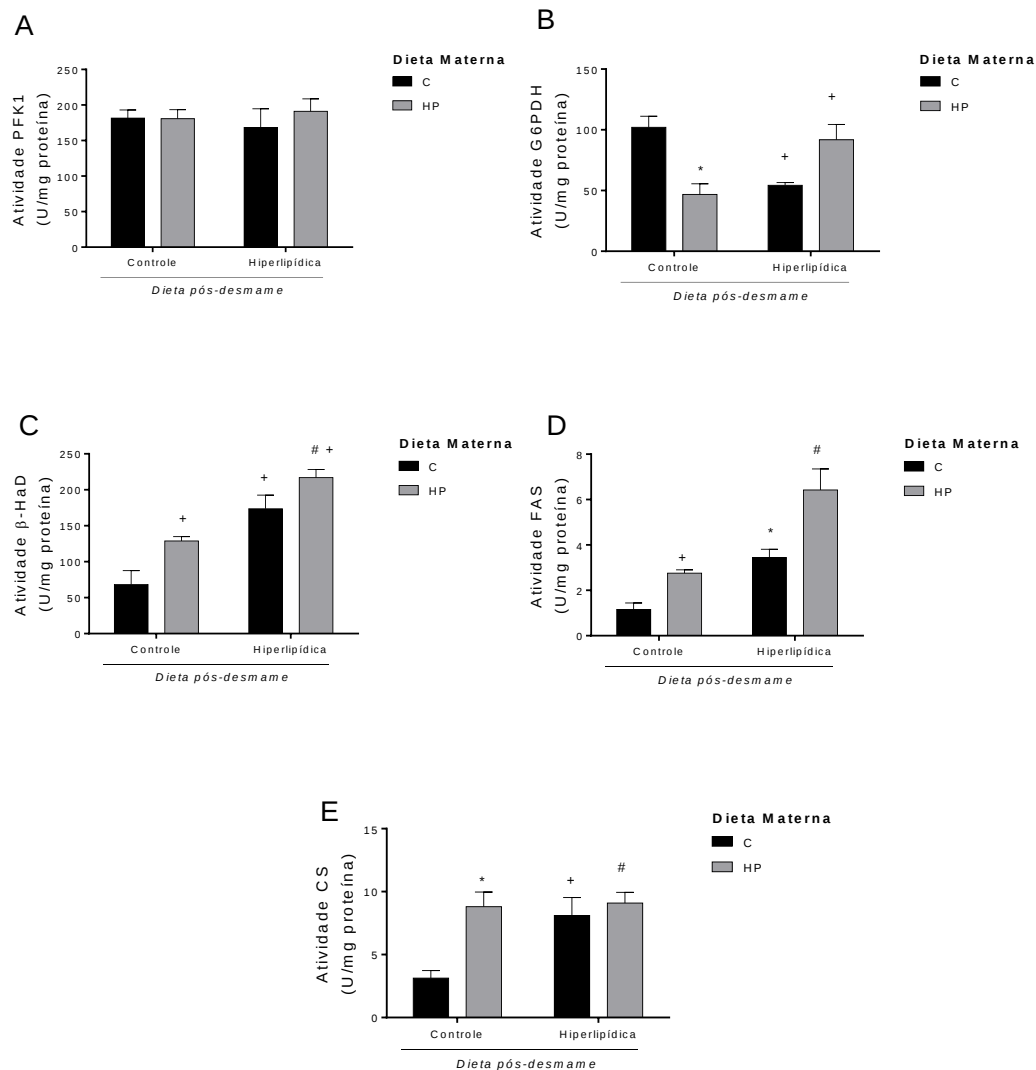
Fonte: Simões-Alves A.C., 2021.

6.8.3 Atividade enzimática de enzimas metabólicas

Os efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre a atividade de enzimas metabólicas em ratos adultos submetidos à desnutrição proteica perinatal são representados na figura 19. A avaliação da atividade da enzima PFK1 revelou que as manipulações nutricionais não foram capazes de alterar significativamente a sua atividade (Figura 19A). No entanto, foi observado que a atividade da G6PDH foi menor nos grupos HP-C (-46% , * $p < 0.05$) e C-HL (-54% , + $p < 0.05$) quando comparado aos animais que receberam dieta controle; os animais que sofreram manipulação nutricional durante o período perinatal e pós-desmame (HP-HL)

apresentaram um aumento de 96% ($+p < 0.05$) na atividade da G6PDH quando comparados aos animais que sofreram apenas manipulação nutricional no período perinatal (C-HP) (Figura 19B). Quanto a atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo de lipídios, observou-se um aumento na atividade da enzima β -Had nos grupos HP-C (+89%, $+p < 0.05$), C-HL (+154%, $+p < 0.05$) e HP-HL (+218%, $\#p < 0.05$) quando comparados ao grupo que recebeu dieta controle, os animais que sofreram manipulação nutricional durante o período perinatal e pós-desmame (HP-HL) apresentaram um aumento (+68%, $+p < 0.05$) na atividade da β -Had quando comparados aos animais que sofreram apenas manipulação nutricional no período perinatal (HP-C) (Figura 19C). O consumo de uma dieta rica em ácidos graxos saturados por ratos submetidos a restrição proteica perinatal elevou a atividade da enzima de síntese de ácidos graxos, FAS, quando comparados aos grupos C (+455%, $\#p < 0.05$) HP-C (+133%, $+p < 0.05$) e C-HL (+86%, $*p < 0.05$) (Figura 19D). A atividade da enzima citrato sintase foi maior nos grupos HP-C (+182%, $*p < 0.05$), C-HL (+159%, $+p < 0.05$) e HP-HL (+191%, $\#p < 0.05$) (Figura 19E) quando comparados ao grupo controle.

Figura 19 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre a atividade de enzimas metabólicas em ratos adultos submetidos à desnutrição proteica perinatal. (A) Atividade da PFK1, (B) atividade da G6PDH, (C) atividade da β -Had, (D) atividade da ácido graxo sintase (FAS), (E) atividade da citrato sintase (CS) no homogenato de fígado de ratos machos de 90 dias nascidos de mães alimentadas com uma dieta controle (C) ou hipoproteica (HP), durante a gestação e lactação, e controle (C) ou dietas hiperlipídicas (HL) após o desmame até a idade adulta. $n = 5-7$ animais por grupo. Todos os valores foram expressos como média $\pm$ SEM e comparados por ANOVA two way seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni. $*p < 0,05$ entre os grupos; $+p < 0,05$ dentro do grupo; $\#p < 0,05$ HP-HL vs. C.

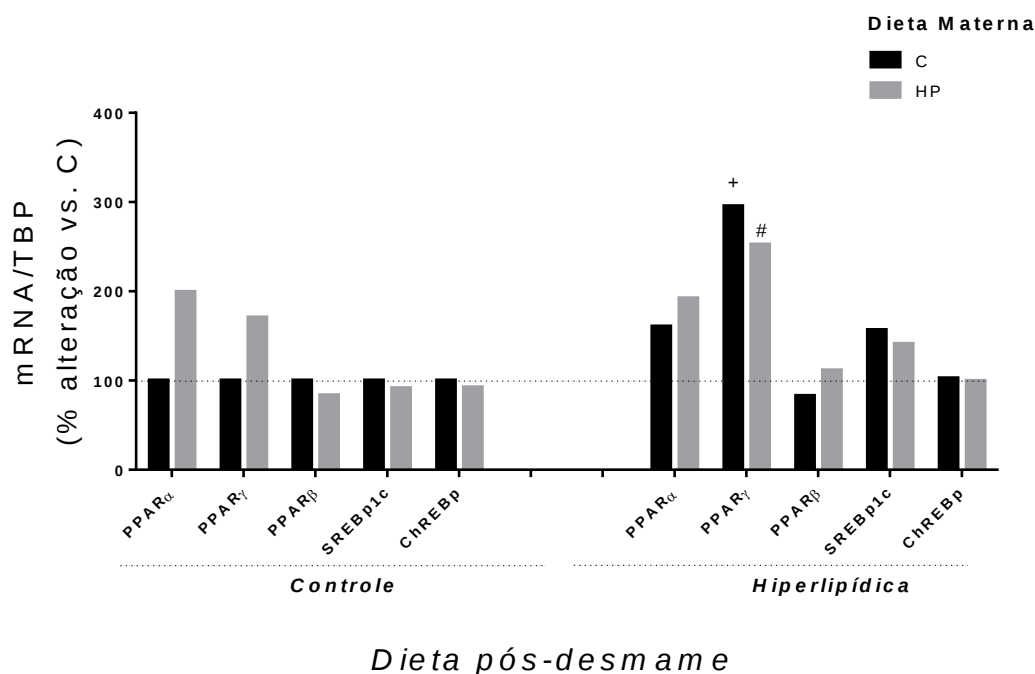


Fonte: Simões-Alves A.C., 2021.

6.8.4 Expressão genica de fatores de transcrição relacionados ao metabolismo

A figura 20 apresenta os efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre a expressão genica de PPAR $\alpha\beta\gamma$, SREBP1c, ChREBP e FOXO3 em ratos adultos submetidos à desnutrição proteica perinatal. A dieta rica em ácidos graxos pós-desmame foi capaz de aumentar os níveis de mRNA de PPAR γ tanto nos animais controle (C-HL) (+195.5% +p <0,05) quanto nos animais desnutridos (HP-HL) (+152.4% *p <0,05) quando comparados ao grupo controle (C); entretanto os níveis de mRNA de PPAR α e PPAR β não foram alterados nos animais submetidos as manipulações nutricionais, assim como nos níveis de SREBP1c, ChREBP e FOXO3 nenhuma alteração significativa foi observada.

Figura 20 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre os níveis de mRNA de PPAR $\alpha\beta\gamma$, SREBP1c e ChREBP no fígado de ratos adultos submetidos à desnutrição proteica perinatal. Para os níveis de mRNA, os dados foram padronizados e expressos em variação percentual (%) em relação ao grupo controle. * p <0,05 entre os grupos; + p <0,05 dentro do grupo; # p <0,05 HP-HL vs. C. n = 4-5 animais por grupo. Tbp: proteína de ligação ao TATA box, PPAR α : Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa, PPAR β : Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma beta, PPAR γ : Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama, SREBP1c: Fator de transcrição 1 de ligação ao elemento regulador de esterol, ChREBP: Proteína de ligação ao elemento responsiva a carboidratos.



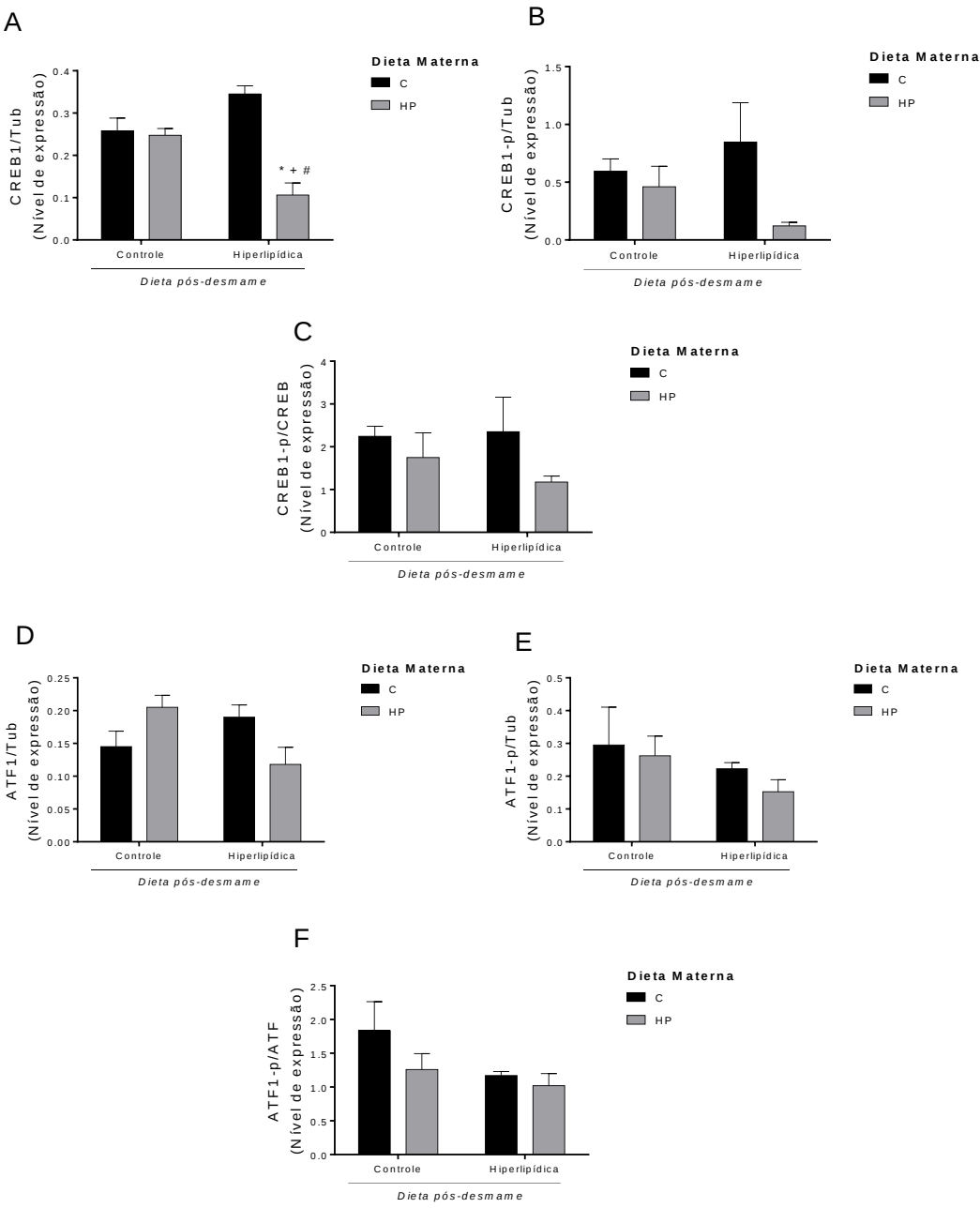
Fonte: Simões-Alves A.C., 2021.

6.8.5 Expressão proteica de CREB1, CREB1p, ATF1 e ATF1p

A figura 21 apresenta os efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre a expressão proteica de CREB1 (A), CREB1p (B), razão CREB1p/ CREB1 (C), ATF1 (D), ATF1p (E) e razão ATF1p/ATF1 (F) em ratos adultos submetidos à desnutrição proteica perinatal. Os animais alimentados com a dieta rica em ácidos graxos no período pós-desmame e desnutridos no período perinatal apresentaram uma menor expressão proteica de CREB1 quando comparado aos grupos C (-59% # p <0,05), HP-C (-57% + p <0,05) e C-HL (-69 % * p <0,05). Não houve nenhuma alteração na expressão proteica de CREB1p, assim como em

ATF1 e ATF1p. A razão de CREB1p/ CREB1 não apresentou nenhuma alteração significativa, assim como na razão ATF1p/ATF1.

Figura 21 - Efeitos de uma dieta rica em ácidos graxos saturados sobre a expressão proteica de CREB1, CREB1p, razão CREB1p/ CREB1, ATF1, ATF1p e razão ATF1p/ATF1 em ratos adultos submetidos à desnutrição proteica perinatal. Os dados foram normalizados para a expressão de tubulina e apresentados como média $\pm$ SEM. ANOVA two way seguida pelo teste post-hoc de Bonferoni foram usados para comparar os grupos. n = 4-5 animais por grupo. * p <0,05 entre os grupos; + p <0,05 dentro do grupo; # p <0,05 HP-HL vs. C. CREB1: proteína de ligação ao elemento responsivo ao cAMP, CREB1p: proteína de ligação ao elemento responsivo ao cAMP fosforilado, ATF1: Fator de transcrição dependente de AMPc, ATF1p: Fator de transcrição dependente de AMPc fosforilado, Tub: Tubulina.



Fonte: Simões-Alves A.C., 2021.

7 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, um novo paradigma nutricional foi identificado em países em desenvolvimento, onde a desnutrição foi substituída pela supernutrição, definindo uma transição nutricional rápida e drástica. Isso tem sido associado ao consumo de dietas ocidentalizadas ricas em AGS, levando ao aumento do risco de doenças crônicas na idade adulta. No presente estudo, avaliamos o impacto do consumo de uma dieta rica em AGS pós-desmame na bioenergética mitocondrial, balanço oxidativo, marcadores inflamatórios e metabolismo hepático de ratos submetidos a restrição proteica durante a gestação e lactação.

Nossos achados mostraram que os filhotes dos grupos alimentados com a dieta controle apresentaram alto consumo de alimentos, com associação direta com o ganho de peso corporal. O peso corporal dos grupos com baixo teor de proteína que receberam ou não dieta rica em ácidos graxos saturados foram reduzidos em relação ao grupo controle. Esses dados confirmam o impacto da desnutrição proteica no início da vida no crescimento (DE BRITO ALVES *et al.*, 2015) e revelam que o consumo pós-desmame de dieta enriquecida com ácidos graxos saturados foi não capaz de induzir excesso de peso em ratos jovens. É bem sabido que as dietas hiperlipídicas podem impactar o crescimento e a deposição de gordura na idade adulta. No entanto, aos 90 dias de vida, nenhum sinal de sobrepeso foi observado. Os níveis séricos de glicose, colesterol, triglicerídeos, ALT e AST (considerados biomarcadores da função hepática), não foram modificados pela mudança de nutrição nesta idade. No entanto, o presente estudo fornece fortes evidências de que disfunção mitocondrial, desequilíbrio oxidativo, indução de vias pró-inflamatórias e alterações no metabolismo do fígado estão acontecem antes mesmo de uma alteração no peso corporal e uma disfunção nesses marcadores clínicos.

Doenças metabólicas estão associadas à estrutura mitocondrial alterada e deficiências bioenergéticas, que são acompanhadas por aumento de dano ao mtDNA e oxidação de lipídios e proteínas por espécies reativas de oxigênio (EROs) (VIDELA *et al.*, 2004; KAWAHARA *et al.*, 2007; GALLOWAY *et al.*, 2014), a resistência à insulina induzida pela introdução de gordura animal na dieta é precedida por alteração da expressão de genes mitocondriais e redução do conteúdo de mtDNA (TAYLOR *et al.*, 2005), assim como a DHGNA e os ganhos de gordura visceral estão associados à disfunção mitocondrial (PESSAYRE e FROMENTY, 2005; PESSAYRE, 2007). Em nosso estudo, os animais alimentados com uma dieta rica em AGS e desnutridos na gestação e lactação apresentaram uma taxa de respiração mitocondrial mais lenta e controle respiratório (CR) menor, sugerindo disfunção mitocondrial. O aumento

significativo do CR das mitocôndrias hepáticas de ratos submetidos a uma dieta pobre em proteínas durante a gestação e lactação mostrou maior atividade da cadeia de transporte de elétrons, como forma de adaptação metabólica ao insulto nutricional sofrido no início da vida desses animais. Esse resultado corrobora com um estudo anterior realizado com filhotes de ratos submetidos a restrição proteica durante a gestação, que mostrou aumento na captação de oxigênio nas mitocôndrias isoladas de fígado de ratos aos 45, 60 e 120 dias de vida (MORAES *et al.*, 2014).

A deficiência nutricional pode afetar vários processos metabólicos essenciais e pode interferir na estabilidade do genoma. Existem evidências sugerindo que uma redução na taxa metabólica basal, que pode ser causada pela diminuição da taxa de consumo de oxigênio celular, atenua os danos ao DNA decorrentes do estresse oxidativo (MOLZ *et al.*, 2016), além disso, AGS são capazes de induzir a interrupção oxidativa e regular a atividade e abundância nuclear de alguns fatores de transcrição (JUMP *et al.* 2013; HIRSOVA *et al.* 2016; ALNAHDI *et al.* 2019). Na presença de estresse oxidativo causado pelo aumento da produção de EROs, certas proteínas regulatórias têm sido relatadas como fatores de transcrição protetores sensíveis ao estado REDOX que contribuem para a restauração da homeostase celular (Dias, Milic *et al.* 2020). Dentre eles, investigamos os níveis transcricionais de PGC1 α , Tfam, NRF2 e FOXO3. Membros da família PGC-1 foram revelados como atores-chave na regulação do metabolismo energético. PGC-1 coordena a atividade dos fatores de transcrição para modular o metabolismo energético e outros processos celulares em resposta a uma variedade de sinais ambientais e fisiológicos (VILLENA, 2015).

A biogênese mitocondrial é regulada para adaptar a população mitocondrial às demandas de energia celular. O Tfam desempenha várias funções para o mtDNA e as interações entre Tfam e mtDNA participam da regulação da biogênese mitocondrial (PICCA; LEZZA, 2015). Nossos resultados mostraram maior expressão de PGC-1 α e diminuição de Tfam no fígado do animal submetido a restrição de proteínas durante períodos críticos de desenvolvimento e, em seguida, receberam uma dieta enriquecida com ácidos graxos saturados pós-desmame até a idade adulta. Descritos inicialmente como reguladores chave do processo de biogênese mitocondrial, estudos recentes usando modelos de animais geneticamente modificados descobriram novas funções para os PGC-1 além da regulação de redes de genes estritamente relacionadas ao metabolismo oxidativo mitocondrial, síntese lipídica, secreção de lipoproteínas, especificação de tipo de fibra muscular, angiogênese, diferenciação de adipócitos, hematopoese e resposta imune estão entre os novos processos celulares e fisiológicos que são descritos como regulados por membros da família PGC-1 (VILLENA,

2015). Nossos resultados do Tfam corroboram com o estudo de SHELDON et al. (2016) que mostraram menor expressão de Tfam no fígado de ratos alimentados com dieta hiperlipídica (45% de gordura, 35% de carboidratos e 20% de proteína) após o desmame.

O NRF2 foi descrito como um dos fatores mais importantes envolvidos na defesa antioxidante endógena (DIAS *et al.* 2020), juntamente com o FOXO3. Em nosso estudo, não foram observadas alterações significativas nos conteúdos de mRNA de NRF2 e FOXO3, sugerindo que essas vias antioxidantes podem não ser ativadas em ratos adultos com restrição proteica expostos à dieta AGS pós-desmame. No presente estudo, uma dieta hiperlipídica leve com 33% de gordura e rica em ácidos graxos saturados foi capaz de induzir a modificação de genes relacionados à biogênese mitocondrial, como Tfam e PGC-1. Esses resultados apoiam a hipótese de que os ácidos graxos saturados têm um impacto nas mitocôndrias, especialmente em animais sujeitos a restrição de proteínas durante o desenvolvimento fetal.

A literatura mostrou que a permeabilidade mitocondrial interna induzida pelo íon cálcio pode estar associada a um aumento inespecífico da permeabilidade da membrana que aumenta as taxas respiratórias e diminui o acoplamento entre o consumo de oxigênio e a fosforilação oxidativa (KOWALTOWSKI, CASTILHO e VERCESI, 1996; FIGUEIRA *et al.*, 2013). O inchamento mitocondrial pode ser causado pelo desdobramento de cristas mitocondriais, como resultado de resposta fisiológica, ou ocorre pela abertura do PTPM, um canal de alta condutância que pode induzir a perda do potencial elétrico de membrana mitocondrial, prejuízo da homeostase do cálcio celular, estresse oxidativo e diminuição da produção de ATP (PÉREZ e QUINTANILLA, 2017). Os experimentos de inchamento mitocondrial mostraram que os animais que receberam dieta pobre em proteínas durante a gestação e lactação eram mais resistentes ao inchamento mitocondrial induzido pelo íon cálcio; mas quando os animais foram submetidos a dieta pobre em proteínas e dieta rica em AGS pós-desmame até a idade adulta, observou-se um maior inchamento da organela. Este efeito foi potencializado após a adição de maiores concentrações de cálcio. Geralmente, o comprometimento mitocondrial é desencadeado pela desregulação do cálcio que pode levar à abertura do PTPM e morte celular (KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007; PÉREZ e QUINTANILLA, 2017). Após a adição de ciclosporina A (inibidor clássico do poro de transição da permeabilidade mitocondrial) e EGTA (quelante de cálcio), o inchamento mitocondrial foi totalmente evitado, mostrando que o aumento do volume mitocondrial observado no HP-HL se devia à abertura do PTPM. O PTPM tem sido considerado um dos principais contribuintes para a morte celular, e está relacionado a doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e Huntington (KALANI, YAN e YAN, 2018), além de

cardiopatas (KWONG e MOLKENTIN, 2015), alguns tipos de câncer (XUE *et al.*, 2018), diabetes (RIOJAS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2015), e esteatose hepática não alcoólica (GONÇALVES *et al.*, 2015).

A regulação mitocondrial de cálcio é essencial para manter a homeostase celular sob a condição de transição nutricional. Nesse contexto, as proteínas VDAC, GRP75, MFN2 e CypD emergiram como essenciais para o controle do fluxo de cálcio nas mitocôndrias. A interrupção no seu padrão transcricional esteve envolvida no acúmulo de cálcio nas mitocôndrias e danos celulares em doenças metabólicas. O VDAC1, localizado na membrana mitocondrial externa, serve como um *gatekeeper* mitocondrial, controlando a interferência metabólica e energética entre as mitocôndrias e o resto da célula. O VDAC1 é altamente permeável a Ca^{2+} , transportando esse íon para o espaço inter membranar e, assim, modulando o acesso de Ca^{2+} aos seus transportadores na membrana mitocondrial interna (SHOSHAN-BARMATZ; KRELIN; SHTEINFER-KUZMINE, 2018). O VDAC desempenha papel fundamental nas interações entre as mitocôndrias e o retículo endoplasmático (RE). Essa interação é muito importante para a regulação mitocondrial de cálcio, a fim de se manter a homeostase celular. Outras proteínas estão implicadas nesse processo, como GRP75, MFN2 e CypD. O GRP75 faz parte do complexo envolvido no fluxo de Ca^{2+} no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias e é composto pelo receptor de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3R) na membrana do RE e do VDAC na membrana mitocondrial externa, e acoplado pelo GRP75 (SZABADKAI *et al.*, 2006). Sabe-se que a redução na expressão de GRP75 afeta a interação entre organelas e prejudica o controle mitocondrial de cálcio. Nossos resultados mostraram aumento da transcrição de VDAC no fígado de animais que receberam uma dieta HL enriquecida com AGS. Esse efeito foi potencializado quando esses animais foram submetidos a restrição proteica durante períodos críticos de desenvolvimento. No entanto, não foram observadas alterações nos níveis transcricionais de GRP75, mostrando que os níveis transcricionais de VDAC e GRP75 são afetados de maneira diferente pela transição nutricional avaliada no presente estudo. O estudo de LE; JIA e SUN (2018) mostraram maior expressão de VDAC1 em ratos tratados com dietas ricas em gordura por 16 semanas. Os autores sugerem que a inibição do VDAC1 pode ser um mecanismo subjacente a medicamentos, como o sennosídeo A, um estimulante laxante clínico comumente usado, para proteger as mitocôndrias na esteatose hepática induzida por HFD em camundongos. O VADC pode ser um alvo promissor no tratamento da doença hepática gordurosa (LE; JIA; SUN, 2018).

A literatura também tem mostrado que Mfn2 e CypD parecem estar envolvidos nas interações entre retículo endoplasmático e mitocôndrias (SEBASTIAN *et al.*, 2012; RIEUSSET *et al.*, 2016). A perda dessas proteínas afeta as interações e induz o estresse do retículo endoplasmático. No entanto, as interações podem aumentar as respostas agudas ao estresse no retículo endoplasmático, levando ao aumento da respiração mitocondrial e ao acúmulo de Ca^{2+} acarretando inchamento e disfunção mitocondrial (BRAVO *et al.*, 2011). Uma de nossas hipóteses testadas após os ensaios de função mitocondrial foi de que maneira a transição nutricional, passando de uma restrição proteica perinatal para uma dieta rica em AGS pós-desmame afetaria a respiração e o inchamento mitocondrial, pelo menos em parte, alterando os níveis transcricionais dessas proteínas. Os dados obtidos neste trabalho, no entanto, indicaram que as alterações observadas nas funções bioenergéticas mitocondriais parecem não estar relacionados à disfunção nos níveis transcricionais de Mfn2 e CypD. Para avaliar os detalhes desse processo, serão necessários experimentos adicionais e específicos.

A nutrição perinatal adequada é importante porque a deficiência de macro e/ou micronutrientes durante períodos críticos de desenvolvimento aumenta o estresse oxidativo pela geração de espécies reativas de oxigênio e diminui a atividade antioxidante associada à resistência à insulina da prole (ZAMBRANO, E *et al.*, 2006; VEGA *et al.*, 2016). Nossos resultados mostraram que a restrição proteica durante a gestação e lactação não alterou os níveis de biomarcadores de estresse oxidativo no fígado de ratos adultos. Entretanto, quando esses animais foram submetidos a uma dieta rica em AGS pós-desmame até a idade adulta, houve um aumento nos níveis de peroxidação lipídica e oxidação de proteínas. Demonstra-se que uma dieta hiperlipídica aumenta a produção de radicais livres que geralmente pode levar a um quadro sistêmico de estresse oxidativo (VIGUERAS-VILLASEÑOR *et al.*, 2011) e pode resultar em esteatose hepática em roedores e humanos pelo aumento da captação hepática de lipídios (TURNER *et al.*, 2013; LINDEBOOM *et al.*, 2014).

Em condições fisiológicas normais, as células requerem defesas antioxidantes sustentadas para combater a geração de EROs em estado estacionário e defesas antioxidantes induzíveis para combater os desafios oxidativos agudos (NITA e GRZYBOWSKI, 2016). No entanto, se as células não conseguiram reduzir os níveis de EROs intracelulares, as vias intrínsecas podem levar à apoptose, em parte por meio de mecanismos dependentes de NF- κ B e TNF α (CAO, LENG e KUFE, 2003; MORGAN e LIU, 2011; SIES, 2017). De fato, estudos têm mostrado que o estresse oxidativo pode ativar a expressão de genes das vias pró-inflamatórias, notadamente por meio da ativação de NF- κ B (ZHOU, JOHNSON e RANDO,

2001; MORGAN e LIU, 2011) e a indução da expressão das citocinas pró-inflamatórias, TNF α e IL1 β (HAN *et al.*, 2009; CHRISTIAN, SMITH e CARMODY, 2016). Além disso, os animais alimentados com uma dieta rica em AGS por 16 semanas pós-desmame tiveram fosforilação de IKK e conteúdo de proteína TNF α aumentados no fígado, uma condição associada com a ativação a montante da via de sinalização NF- κ B e fibrose hepática (LAVRADOR *et al.*, 2019). Por essas razões, avaliamos a expressão dos genes Nf- κ B1, TNF α e IL1B. Aqui, nossos dados revelaram que, isoladamente, a restrição proteica materna ou dieta rica em SFA pós-desmame não são suficientes para desencadear processos pró-inflamatórios, mas que a combinação dos dois foi capaz de aumentar a expressão dos genes NF- κ B1 e TNF α hepáticos. Essa observação reforça a hipótese de que indivíduos desnutridos são mais suscetíveis aos efeitos pró-inflamatórios provocados por dietas hiperlipídicas.

Uma das maneiras mais importantes pelas quais o NF- κ B influencia os níveis de EROs é por meio do aumento da expressão de proteínas antioxidantes, como SOD e GPX (KAIRISALO *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2020). No entanto, o NF- κ B também pode diminuir a regulação de outras enzimas antioxidantes, como a catalase (SCHREIBER *et al.*, 2006).

No presente estudo, nossos resultados mostraram que os níveis transcricionais dos genes pró-oxidantes, como XDH, NOX1 e RAC1, não foram significativamente alterados entre os grupos (sugerindo que o Estresse oxidativo observado nos animais HPHL não é induzido por uma ação de enzimas pró-oxidantes.). Em contraste, trabalhos anteriores sugeriram que a mudança nutricional está associada ao aumento da produção de EROs originada da fosforilação oxidativa mitocondrial (SIMOES-ALVES *et al.*, 2019). De fato, descobrimos que animais com restrição proteica apresentaram maior consumo de oxigênio hepático mitocondrial desacoplado em comparação com animais controle em uma dieta padrão, sugerindo a ação de agentes desacopladores, como UCPs (SIMOES-ALVES *et al.*, 2019) que atuam para dissipar parcialmente o potencial elétrico de membrana mitocondrial para prevenir a formação de EROs (VIDAL-PUIG *et al.*, 2000). Como um aumento na transcrição de UCP2 foi observado no presente estudo no fígado de animais HP, isso corrobora com a nossa hipótese de que as mitocôndrias podem estar se adaptando para mitigar o desequilíbrio REDOX induzido pela restrição proteica materna.

Em nosso estudo, embora os animais com restrição proteica alimentados com dieta rica em AGS após o desmame tenham mostrado maior expressão dos genes Nf- κ B1 e TNF α no fígado, nenhuma alteração foi observada no conteúdo de mRNA de SOD e GPX, enquanto o de CAT foi aumentado. Mais importante ainda, a expressão da proteína SOD2 foi

significativamente aumentada no fígado de descendentes com restrição de proteína, enquanto a da catalase diminuiu significativamente, assim como a sua atividade. A redução na expressão da proteína catalase e na sua atividade ocorreu apesar do aumento do nível de transcrição de seu gene. Pelo menos em parte, o nível aumentado de mRNA de CAT pode representar a resposta da célula à disfunção da catalase, reforçando assim a hipótese de que há instalado o quadro de estresse oxidativo nesses animais, como sugerido anteriormente (SIMOES-ALVES *et al.*, 2019). Assim, dados os níveis normais de transcrição dos genes pró-oxidantes analisados no presente estudo, como XDH, NOX1 e RAC1, a hipótese de que o estresse oxidativo observado no fígado dos animais submetidos à transição nutricional poderia ser induzido por uma ação de enzimas pró-oxidantes eventualmente enfraquece. Em vez disso, esses dados combinados sugerem uma deficiência na detoxificação de EROs, especialmente o H_2O_2 , no fígado devido à diminuição da atividade da catalase (CAO *et al.*, 2003). Outro ponto importante observado no presente estudo é o aumento no teor de proteína SOD2 sob dieta pós-desmame normal ou hipelipídica no grupo HP, que mostra que SOD2 catalisa a dismutação do O_2 em H_2O_2 , que seria subsequentemente desintoxicado em oxigênio e água por catalase ou glutathione peroxidase. A atividade reduzida da catalase e da GPx pode contribuir para o aumento de EROs e oxidação de lipídios e proteínas, conforme observado em animais com restrição proteica alimentados com dieta rica em SFA após o desmame. Nossos resultados corroboram com Tanrikulu Küçük, et al. (TANRIKULU-KUCUK *et al.*, 2019) que também observou uma diminuição na expressão e na atividade da catalase e da GPx no fígado de ratos alimentado com dieta hiperlipídica durante 16 semanas. Dados da literatura também mostram que a depleção de GPx induz peroxidação lipídica em vários tecidos, incluindo o fígado (IMAI *et al.*, 2017) e está associada a carcinomas hepatocelulares (JI e WANG, 2014).

No entanto, os efeitos provocados pelo consumo pós-desmame de uma dieta rica em AGS na resposta transcricional de enzimas pró-oxidantes e antioxidantes no fígado não estão claros. No presente estudo, nossos resultados mostraram que os níveis transcricionais dos genes pró-oxidantes, como XDH, NOX1 e RAC1, não foram significativamente alterados entre os grupos. Em contraste, trabalhos anteriores sugeriram que a mudança nutricional está associada ao aumento da produção de EROs originada da fosforilação oxidativa mitocondrial (SIMOES-ALVES *et al.*, 2019). De fato, descobrimos que animais com restrição proteica apresentaram maior consumo de oxigênio hepático mitocondrial desacoplado em comparação com animais controle em uma dieta padrão, sugerindo a ação de agentes desacopladores,

como UCPs (SIMOES-ALVES *et al.*, 2019) que atuam para dissipar parcialmente o potencial elétrico de membrana mitocondrial para prevenir a formação de EROs (VIDAL-PUIG *et al.*, 2000). Como um aumento na transcrição de UCP2 foi observado no presente estudo no fígado de animais HP, isso corrobora com a nossa hipótese de que as mitocôndrias podem estar se adaptando para mitigar o desequilíbrio REDOX induzido pela restrição proteica materna.

A glutathione-S-transferase (GST), que é uma importante enzima antioxidante, atua no metabolismo dos xenobióticos, participa da sinalização REDOX regulando o produto da peroxidação lipídica, 4-hidroxi-trans 2-nonenal, é ainda envolvida na modulação da expressão gênica, proliferação celular e apoptose (AWASTHI *et al.*, 2017). Nossos dados mostraram que, independentemente do insulto nutricional, restrição de proteína, ou dieta HL, as atividades de GST foram maiores do que nos grupos de controle. Esses resultados podem estar relacionados ao aumento da atividade hepática como forma de compensação metabólica. O sistema antioxidante não enzimático foi avaliado pela dosagem de GSH, um tiol não proteico com uma ampla gama de propriedades antioxidantes que podem eliminar O_2^- e radical OH^- não enzimaticamente, regenerar outros antioxidantes para sua forma ativa, e podem ser conjugados e excretados com toxinas através da reação catalisada por glutathione S-Transferases (GST) (FERREIRA *et al.*, 2016). Os níveis de GSH diminuíram em animais que receberam dieta HL pós-desmame, o que sugere uma redução no sistema antioxidante não enzimático. A homeostase intracelular de GSH é afetada pelo aumento da produção de EROs, sendo associada a doenças hepáticas alcoólicas e não alcoólicas (SACCO, EGGENHOFFNER e GIACOMELLI, 2016). Aumento de oxidações de lipídios e proteínas observados no presente estudo podem ser considerados bons biomarcadores da homeostase celular e sugerir que o equilíbrio oxidativo está prejudicado em animais submetidos à baixa proteína perinatal e dietas HL pós-desmame. Esses dados reforçam a hipótese de que os animais expostos a transição nutricional são incapazes de restaurar a homeostase oxidativa. Pelo menos em parte, mudanças na transcrição e expressão de genes oxidativos estão envolvidos nesses efeitos funcionais.

A ingestão excessiva de gordura tem sido proposta como um fator causal no desenvolvimento de doenças metabólicas. Afim de investigarmos o papel de uma dieta rica em AGS em animais com restrição proteica perinatal sobre o metabolismo da glicose, avaliamos os níveis de mRNA, expressão proteica e atividade de enzimas chaves na degradação de glicose a acetil-CoA, assim como na produção de glicose a partir de outros substratos no fígado. Nossos dados mostraram que os animais alimentados com uma dieta rica

em AGS não apresentam alteração na atividade da enzima PFK1, enzima que catalisa a etapa metabolicamente irreversível que essencialmente compromete a degradação da glicose pela glicólise, os níveis de mRNA de PDK4, assim como o seu conteúdo proteico não foram alterados. Os níveis de mRNA de PEPCK também não foram alterados nesses animais, assim como o conteúdo proteico de CREBp e ATF1p. A manutenção dessas vias sugere uma possível tentativa de utilização de ácidos graxos como fonte de energia (HAN *et al.*, 2016) (RUI, 2014). Outra hipótese para a manutenção dessas vias é a saída da glicose-6-fosfato para via das pentoses para produção de NADPH a partir da que G6PDH como substrato para a FAS (RUI, 2014). Nossos dados mostraram que os animais HP-HL apresentaram aumento na atividade da G6PDH; assim como apresentam aumento na atividade da FAS, indicando o direcionamento do NADPH como substrato dessa enzima (RUI, 2014). Esses dados corroboram com estudos realizados com ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 6 semanas que mostrou um aumento na atividade da G6PDH no fígado associada à resistência à insulina na obesidade induzida por dieta (WANG *et al.*, 2012), além disso a super expressão da glicose-6-fosfato desidrogenase tem sido associada à desregulação lipídica e à resistência à insulina na obesidade (PARK *et al.*, 2005).

A FAS é a enzima que catalisa a síntese de novo de ácidos graxos que podem ser usados para armazenamento de energia, montagem e reparo de membrana e secreção na forma de triglicerídeos de lipoproteína (JENSEN-URSTAD e SEMENKOVICH, 2012a). O produto principal da reação da FAS é o palmitato (C16: 0), mas o estearato (C18: 0) e ácidos graxos mais curtos também podem ser produzidos, além disso, o ácido palmítico pode ser alongado por membros da família de acil-CoA elongase (Elovl) no retículo endoplasmático para gerar ácidos graxos de cadeia longa (> 16 cadeias de carbono); a exclusão de *Elovl6* protege contra a esteatose hepática e inflamação do fígado em camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura; inversamente, a superexpressão hepática específica de *Elovl6* aumenta a gordura no fígado e a fibrose hepática induzida por dietas HL (MATSUZAKA *et al.*, 2012). Nossos dados mostram um aumento significativo na atividade da FAS, sugerindo que os animais alimentados com uma dieta rica em AGS e desnutridos no período perinatal tem uma maior produção de ácidos graxos de cadeia longa. Sabe-se que o palmitato é um dos responsáveis pelo desenvolvimento de esteatose hepática, entretanto, aos 90 dias de vida, esses animais ainda não apresentaram nenhuma deposição de gordura no fígado; para confirmar essa hipótese são necessários mais estudos com animais mais velhos.

Um dado interessante é o fato desses animais HP-HL não apresentarem aumento nos níveis séricos de triglicerídeos assim como de triglicerídeos hepáticos (dados não apresentados), isso pode ser explicado pelo fato da FAS contribuir em pequenas quantidades para a secreção de VLDL e deposição de triglicerídeos no fígado. Camundongos Ob/ob têm lipogênese hepática 10 vezes maior em comparação com camundongos magros, mas nenhuma diferença significativa nos triglicerídeos séricos (WIEGMAN *et al.*, 2003). Em camundongos com nocaute específico do fígado para FAS, os triglicerídeos séricos são normais (CHAKRAVARTHY *et al.*, 2009). Em dietas com alto teor de gordura (30% de gordura, 55% de carboidrato ou 40% de gordura, 45% de carboidrato), a contribuição da lipogênese para os triglicerídeos VLDL é indetectável ou menor, em 0-10% (HUDGINS *et al.*, 1996; HUDGINS *et al.*, 2000). Essas dietas são mais representativas do alto teor de gordura e carboidratos de uma dieta ocidental típica, indicando que, sob condições dietéticas comuns, a lipogênese não contribui significativamente para os triglicerídeos VLDL. Indivíduos obesos não parecem ter triglicerídeos VLDL derivados de FAS aumentados em comparação com indivíduos magros (HUDGINS *et al.*, 2000).

Um papel inesperado para a FAS como uma enzima de sinalização surgiu com a descoberta de que essa enzima pode afetar a oxidação de ácidos graxos através do PPAR α (JENSEN-URSTAD e SEMENKOVICH, 2012b). A expressão do gene PPAR α -dependente é prejudicada com a inativação da FAS, sugerindo que a mesma está envolvida na geração de um ligante PPAR α , e que esses ligantes sejam subprodutos da reação da FAS (CHAKRAVARTHY *et al.*, 2009). Em relação a degradação de ácidos graxos, nossos dados mostram que os animais HP-HL apresentam aumento no conteúdo proteico e na atividade da β -Had, importante enzima da β oxidação de ácidos graxos, entretanto esses animais não apresentam alteração nos níveis de mRNA de PPAR α . Desse modo, os produtos da FAS podem estar impulsionando a β oxidação de ácidos graxos nos animais alimentados com uma dieta rica em AGS submetidos a restrição proteica durante gestação e lactação, entretanto, para testar essa hipótese serão necessários mais estudos.

A β -oxidação mitocondrial é a rota primária para a oxidação da maioria dos ácidos graxos encontrados nos hepatócitos, incluindo os ácidos graxos de cadeia curta (<C4), média (C4-C12) e longa (C12-C20) resultando na formação de acetil-CoA, que pode ser oxidado completamente a dióxido de carbono no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (NGUYEN *et al.*, 2008). Ao avaliarmos a expressão proteica e a atividade da citrato sintase, observamos que os animais HP-HL apresentaram aumento tanto no conteúdo proteico quanto na atividade dessa

enzima, em resposta ao aumento da oferta de acetil-CoA pela β oxidação de ácidos graxos que esta aumentada nesses animais. O aumento da β oxidação, seguida do aumento da atividade da citrato sintase pode estar relacionada a uma tentativa de aumentar as coenzimas reduzidas para melhorar a fosforilação oxidativa e consequentemente aumentar a produção de energia nas mitocôndrias (SIMOES-ALVES *et al.*, 2019) em animais alimentados com uma dieta rica em AGS pós-desmame e desnutridos na gestação e lactação. Entretanto, esses animais apresentam disfunção mitocondrial; assim, supomos que o citrato produzido na reação pela citrato sintase é direcionado para produção de ácidos graxos pela FAS, que está aumentada nesses animais.

Em conjunto, hipotetizamos que um aumento da disponibilidade de ácidos graxos para a β oxidação aumenta a produção de acetil-CoA na mitocôndria, que inibe a piruvato desidrogenase, enzima necessária para a completa oxidação de glicose. Como resultado, a utilização oxidativa da glicose será reduzida (assim como no quadro de resistência à insulina). Além disso, o citrato (formado a partir de acetil-CoA) em parte sai da mitocôndria e no citosol inibe a PFK, que diminui ainda mais a utilização da glicose. O citrato que saiu da mitocôndria é direcionado para a lipogênese *de novo* (BELFIORE e IANNELLO, 1998; PERRY *et al.*, 2018). Acredita-se que a mudança do metabolismo da glicose para o metabolismo de ácidos graxos seja principalmente orquestrada por uma diminuição nas concentrações de insulina no plasma e um aumento nas concentrações de glucagon, que pode regular a gliconeogênese hepática principalmente pela regulação transcricional de principais enzimas unidirecionais, PEPCCK, frutose-1,6-bifosfatase e glicose-6-fosfatase pelo FOXO1 e PGC-1 α (PERRY *et al.*, 2018). Entretanto, serão necessários mais estudos para confirmar essa hipótese. Pelo menos em parte, aos 90 dias de vida, os animais alimentados com uma dieta rica em AGS e desnutridos na gestação e lactação apresentam uma utilização de ácidos graxos maior do que de glicose como fonte de energia.

Os ácidos graxos regulam a expressão gênica controlando a atividade ou abundância de fatores-chave de transcrição, que em nível molecular desempenham um papel crucial; isso foi particularmente ilustrado pela ligação entre as alterações em suas funções e a ocorrência de doenças metabólicas (JUMP *et al.*, 2005; NGUYEN *et al.*, 2008). Muitos fatores de transcrição foram identificados como alvos prospectivos para a regulação de ácidos graxos, incluindo receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR α , β e γ) (SCHOONJANS, STAELS e AUWERX, 1996) e SREBP-1c (XU *et al.*, 1999). Eles integram sinais de várias vias e coordenam a atividade da maquinaria metabólica necessária para o metabolismo. Afim de investigarmos a regulação do metabolismo hepático de animais

alimentados com uma dieta rica em AGS e desnutridos no período perinatal nós avaliamos os níveis de mRNA de PPAR α , PPAR β , PPAR γ , SREBP-1c e ChREBP.

Nossos dados mostraram que os animais alimentados com uma dieta rica em AGS pós-desmame e desnutridos na gestação e lactação apresentaram níveis de mRNA aumentados de PPAR γ . O PPAR γ hepático estimula a expressão de muitos genes que controlam a captação, o tráfico e a biossíntese de ácidos graxos no fígado (LEE *et al.*, 2012), sua ativação é seguida pela superexpressão de enzimas lipogênicas (como a acetil-CoA carboxilase e FAS, por exemplo) (ZELCER e TONTONZOZ, 2006). Hepatócitos que expressam continuamente PPAR γ demonstraram que o mesmo é capaz de induzir o acúmulo de lipídios nos hepatócitos, além de aumentar a expressão de SREBP-1, bem como ACC e FAS; este achado sugere que um mecanismo pelo qual o PPAR γ conduz o acúmulo de lipídios nos hepatócitos é aumentando as vias de biossíntese de ácido graxo no fígado (SCHADINGER *et al.*, 2005). Em nosso estudo, sugerimos que o aumento acentuado da atividade da FAS e consequentemente aumento da biossíntese de ácidos graxos pode ser em resposta ao aumento da expressão gênica de PPAR γ , entretanto, para confirmar essa hipótese são necessários mais estudos da expressão proteica de PPAR γ , assim como atividade de outras enzimas da via de biossíntese de ácidos graxos.

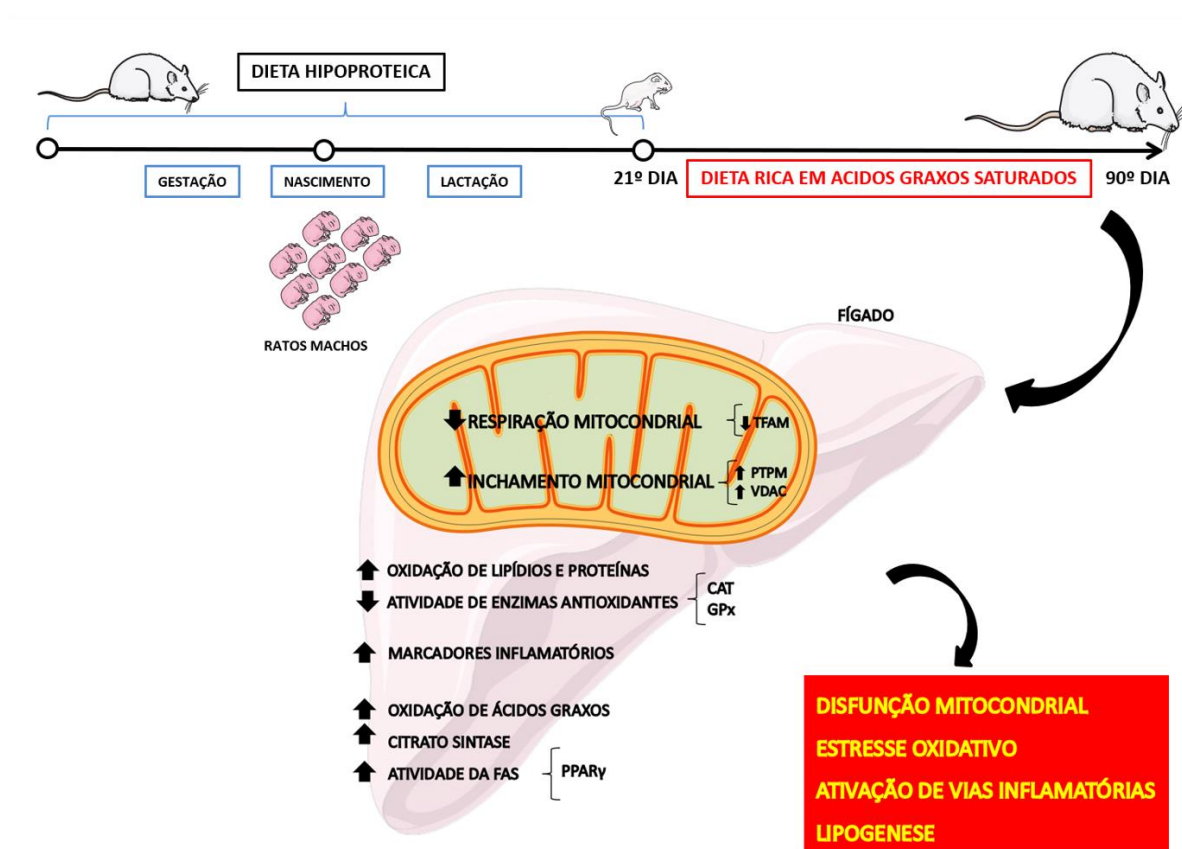
O PPAR α é altamente expresso no fígado e nos tecidos que utilizam muita energia derivada dos lipídios, onde regula um conjunto de enzimas cruciais para a oxidação dos ácidos graxos (EVERETT, GALLI e CRABB, 2000). Dietas ricas em gordura aumentam a expressão de genes ativados por PPAR α , especialmente de enzimas da β oxidação; estimulando a β oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, independentemente dos ácidos graxos de cadeia longa serem poliinsaturados, monoinsaturados ou saturados (KERSTEN *et al.*, 1999; BONILLA *et al.*, 2000). Sendo o PPAR α um dos estimuladores da β oxidação de ácidos graxos, hipotetizamos que o aumento na expressão proteica e atividade da β -HAD seria em resposta a um aumento de PPAR α ; entretanto, em nosso estudo não observamos nenhuma diferença na expressão gênica de PPAR α . Assim, serão necessários estudos da expressão proteica de PPAR α para confirmar essa hipótese.

A transcrição de muitos genes lipogênicos é regulada por membros da família SREBP, a isoforma SREBP-2 ativa genes da via colesterogênica, enquanto as duas isoformas SREBP-1 são mais ativas na regulação da síntese de ácidos graxos, pelo menos em parte, dependente de insulina (HORTON, GOLDSTEIN e BROWN, 2002). SREBP-1c é ativado no fígado de roedores obesos geneticamente e induzidos por dieta (SHIMOMURA, BASHMAKOV e

HORTON, 1999). O ChREBP também estimula a expressão de genes lipogênicos, incluindo a enzima FAS. A sua deleção sistêmica diminui a expressão de genes lipogênicos, inibindo assim a glicólise e a lipogênese hepática, e a glicose é então usada para sintetizar glicogênio no fígado em camundongos nulos para ChREBP (IIZUKA *et al.*, 2004). A glicose promove a acetilação de ChREBP em Lys672 por p300, o que estimula a sua atividade (BRICAMBERT *et al.*, 2010). Nossos dados não mostraram nenhuma diferença na expressão gênica de ChREBP. Os dados obtidos neste trabalho, no entanto, indicaram que o aumento da atividade da FAS parece não estar relacionado a alterações a nível transcricional de SREBP e ChREBP.

8 CONCLUSÃO

Assim, concluímos que ratos adultos que consumiram uma dieta rica em AGS pós-desmame que foram submetidos a restrição proteica durante a gestação e a lactação apresentam disfunção mitocondrial associado a diminuição de fatores de transcrição de biogênese mitocondrial, aumento a sensibilidade ao íon cálcio e maior expressão de VDAC1 que potencializa a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial; induz estresse oxidativo e ativa vias pró-inflamatórias no fígado. Além disso, esses animais apresentam aumento da oxidação de ácidos graxos, acompanhado de aumento da atividade de citrato sintase e de G6PDH gerando substratos para a FAS, aumentando a lipogênese em resposta a ativação de PPAR γ no fígado de ratos aos 90 dias de vida.



REFERENCIAS

ABDULLAH, A. The Double Burden of Undernutrition and Overnutrition in Developing Countries: an Update. **Current Obesity Reports**, v. 4, n. 3, p. 337-349, 2015/09/01 2015.

ADAM-VIZI, V.ECHINOPOULOS, C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. **Trends Pharmacol Sci**, v. 27, n. 12, p. 639-45, Dec 2006.

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

AKSENOV, M. Y.EMARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett**, v. 302, n. 2-3, p. 141-5, Apr 20 2001.

ALHEIROS-LIRA, M. C. et al. Effects of high-fat diet on somatic growth, metabolic parameters and function of peritoneal macrophages of young rats submitted to a maternal low-protein diet. **Br J Nutr**, v. 117, n. 6, p. 796-803, Mar 2017.

ALTOBELLI, G. et al. Genome-wide methylation and gene expression changes in newborn rats following maternal protein restriction and reversal by folic acid. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82989, 2013.

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

ANDERSEN, L. G. et al. Birth weight in relation to leisure time physical activity in adolescence and adulthood: meta-analysis of results from 13 nordic cohorts. **PloS one**, v. 4, n. 12, p. e8192, 2009.

ANGULO, P. et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Gastroenterology**, v. 149, n. 2, p. 389-97.e10, Aug 2015.

AUBIN, M. C. et al. Female rats fed a high-fat diet were associated with vascular dysfunction and cardiac fibrosis in the absence of overt obesity and hyperlipidemia: therapeutic potential of resveratrol. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 325, n. 3, p. 961-8, Jun 2008.

AWASTHI, Y. C. et al. Regulatory roles of glutathione-S-transferases and 4-hydroxynonenal in stress-mediated signaling and toxicity. **Free Radic Biol Med**, v. 111, p. 235-243, Oct 2017.

BAINES, C. P. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. **Basic Res Cardiol**, v. 104, n. 2, p. 181-8, 2009.

BARBOSA, S. D. S. et al. Consumption of a high-fat diet does not potentiate the deleterious effects on lipid and protein levels and body development in rats subjected to maternal protein restriction. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 47, n. 3, p. 412-421, Mar 2020.

BARKER, D. J. Fetal origins of cardiovascular disease. **Ann Med**, v. 31 Suppl 1, p. 3-6, Apr 1999.

_____. The origins of the developmental origins theory. **J Intern Med**, v. 261, n. 5, p. 412-7, May 2007.

BARKER, D. J. et al. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. **Lancet**, v. 341, n. 8850, p. 938-41, Apr 10 1993.

BARKER, D. J. E. OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet**, v. 1, n. 8489, p. 1077-81, May 10 1986.

BARKER, D. J. et al. Trajectories of growth among children who have coronary events as adults. **The New England journal of medicine**, v. 353, n. 17, p. 1802-9, Oct 27 2005.

_____. Maternal and social origins of hypertension. **Hypertension**. 2007 Sep;50(3):565-71. Epub 2007 Jul 9., 2007.

BARKER, D. J. et al. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **Lancet**, v. 2, n. 8663, p. 577-80, Sep 9 1989.

BARROS, M. A. et al. Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 25, n. 1, p. 123-30, Jan 2015.

BARTOSZ, G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? **Biochem Pharmacol**, v. 77, n. 8, p. 1303-15, Apr 15 2009.

BATISTA FILHO, M. E. BATISTA, L. V. Transição alimentar/ nutricional ou mutação antropológica? **Ciência e Cultura**, v. 62, p. 26-30, 2010.

BATISTA FILHO, M. E. RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. S181-S191, 2003.

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

BEAL, M. F. Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Trends Neurosci**, v. 23, n. 7, p. 298-304, 2000.

BELFIORE, F. IANNELLO, S. Insulin resistance in obesity: metabolic mechanisms and measurement methods. **Mol Genet Metab**, v. 65, n. 2, p. 121-8, Oct 1998.

BERENDS, L. M. et al. Programming of central and peripheral insulin resistance by low birthweight and postnatal catch-up growth in male mice. **Diabetologia**, v. 61, n. 10, p. 2225-2234, Oct 2018.

BERGMEYER, H. U. MOELLERING, H. [Acylphosphate: D-glucose-6-phosphotransferase]. **Biochem Z**, v. 343, n. 1, p. 97-102, Nov 05 1965.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D. RODERICK, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 4, n. 7, p. 517-29, 2003.

BIOSCA, M. et al. Central adiposity in children born small and large for gestational age. **Nutricion hospitalaria : organo oficial de la Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral**, v. 26, n. 5, p. 971-6, Sep-Oct 2011.

BLACK, R. E. et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. **Lancet (London, England)**, v. 382, n. 9890, p. 427-451, 2013.

BONILLA, S. et al. High-fat diets affect the expression of nuclear retinoic acid receptor in rat liver. **The British journal of nutrition**, v. 83, n. 6, p. 665-71, Jun 2000.

BORGES, M. C. et al. High-fat diet blunts activation of the nuclear factor-kappaB signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated peritoneal macrophages of Wistar rats. **Nutrition**, v. 29, n. 2, p. 443-9, Feb 2013.

BOULTER, L. et al. Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. **Nat Med**, v. 18, n. 4, p. 572-9, Mar 4 2012.

BOWMAN, G. D.EPOIRIER, M. G. Post-translational modifications of histones that influence nucleosome dynamics. **Chem Rev**, v. 115, n. 6, p. 2274-95, 2015.

BRAWLEY, L. et al. Dietary protein restriction in pregnancy induces hypertension and vascular defects in rat male offspring. **Pediatr Res**, v. 54, n. 1, p. 83-90, Jul 2003.

BRICAMBERT, J. et al. Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. **J Clin Invest**, v. 120, n. 12, p. 4316-31, 2010.

BROEKEMEIER, K. M.; DEMPSEY, M. E.EPFEIFFER, D. R. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. **J Biol Chem**, v. 264, n. 14, p. 7826-30, 1989.

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

BRUCE, K. D. et al. Altered cellular redox status, sirtuin abundance and clock gene expression in a mouse model of developmentally primed NASH. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1861, n. 7, p. 584-593, 2016.

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

CADENAS, E.EDAVIES, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radic Biol Med**, v. 29, n. 3-4, p. 222-30, 2000.

CAO, C.; LENG, Y. EKUFE, D. Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response. **J Biol Chem**, v. 278, n. 32, p. 29667-75, Aug 8 2003.

CAO, C. et al. Catalase is regulated by ubiquitination and proteosomal degradation. Role of the c-Abl and Arg tyrosine kinases. **Biochemistry**, v. 42, n. 35, p. 10348-53, Sep 9 2003.

CAPE, J. L.; BOWMAN, M. K. EKRAMER, D. M. A semiquinone intermediate generated at the Qo site of the cytochrome bc1 complex: importance for the Q-cycle and superoxide production. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 19, p. 7887-92, 2007.

CARAFOLI, E. The fateful encounter of mitochondria with calcium: how did it happen? **Biochim Biophys Acta**, v. 1797, n. 6-7, p. 595-606, Jun-Jul 2010.

CARDOSO, A. R. et al. Mitochondrial compartmentalization of redox processes. **Free Radic Biol Med**, v. 52, n. 11-12, p. 2201-8, 2012.

CARDOSO, A. R.; KAKIMOTO, P. A. EKOWALTOWSKI, A. J. Diet-sensitive sources of reactive oxygen species in liver mitochondria: role of very long chain acyl-CoA dehydrogenases. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77088, 2013.

CARTA, G. et al. Palmitic acid: Physiological role, metabolism and nutritional implications. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 902, 2017.

CHAKRAVARTHY, M. V. et al. Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. **Cell**, v. 138, n. 3, p. 476-88, 2009.

CHANGO, A. EPOGRIBNY, I. P. Considering maternal dietary modulators for epigenetic regulation and programming of the fetal epigenome. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p. 2748-70, Apr 2015.

CHAUDHURI, A. D. et al. MicroRNA-7 Regulates the Function of Mitochondrial Permeability Transition Pore by Targeting VDAC1 Expression. **J Biol Chem**, v. 291, n. 12, p. 6483-93, Mar 18 2016.

CHAURASIA, B.ESUMMERS, S. A. Ceramides - Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders. **Trends Endocrinol Metab**, v. 26, n. 10, p. 538-50, Oct 2015.

CHEN, J. H. et al. Maternal protein restriction affects postnatal growth and the expression of key proteins involved in lifespan regulation in mice. **PLoS One**, v. 4, n. 3, p. e4950, 2009.

CHEN, J. H. et al. Maternal protein restriction affects gene expression profiles in the kidney at weaning with implications for the regulation of renal function and lifespan. **Clin Sci (Lond)**, v. 119, n. 9, p. 373-84, Nov 2010.

CHEN, M. et al. Lipopolysaccharide mediates hepatic stellate cell activation by regulating autophagy and retinoic acid signaling. **Autophagy**, v. 13, n. 11, p. 1813-1827, 2017.

CHITTURI, S.eFARRELL, G. C. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Seminars in liver disease*, 2001, Copyright© 2001 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New p.027-042.

CHONG, S.EWHITELOW, E. Epigenetic germline inheritance. **Curr Opin Genet Dev**, v. 14, n. 6, p. 692-6, Dec 2004.

CHRISTIAN, F.; SMITH, E. L.ECARMODY, R. J. The Regulation of NF-kappaB Subunits by Phosphorylation. **Cells**, v. 5, n. 1, Mar 18 2016.

CLAYCOMBE, K. J. et al. Skeletal muscle Sirt3 expression and mitochondrial respiration are regulated by a prenatal low-protein diet. **J Nutr Biochem**, v. 26, n. 2, p. 184-9, Feb 2015.

COSTA-SILVA, J. et al. Chronic undernutrition alters renal active Na⁺ transport in young rats: potential hidden basis for pathophysiological alterations in adulthood? **European Journal of Nutrition**, v. 48, n. 7, p. 437-445, 2009.

COSTA-SILVA, J. H. et al. New Insights on the Maternal Diet Induced-Hypertension: Potential Role of the Phenotypic Plasticity and Sympathetic-Respiratory Overactivity. **Front Physiol**, v. 6, p. 345, 2015.

COSTA, L. R. et al. Safflower (*Catharmus tinctorius* L.) oil supplementation in overnourished rats during early neonatal development: effects on heart and liver function in the adult. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 41, n. 12, p. 1271-1277, Dec 2016.

COSTA, R. A. et al. Protective effects of l-carnitine and piracetam against mitochondrial permeability transition and PC3 cell necrosis induced by simvastatin. **Eur J Pharmacol**, v. 701, n. 1-3, p. 82-6, Feb 15 2013.

D'IPPOLITO, E.EIORIO, M. V. MicroRNAs and triple negative breast cancer. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 11, p. 22202-20, Nov 11 2013.

DA SILVA ARAGAO, R. et al. Maternal protein restriction impairs the transcriptional metabolic flexibility of skeletal muscle in adult rat offspring. **Br J Nutr**, v. 112, n. 3, p. 328-37, Aug 14 2014.

DE BRITO ALVES, J. L.ECOSTA-SILVA, J. H. Maternal protein malnutrition induced-hypertension: New evidence about the autonomic and respiratory dysfunctions and epigenetic mechanisms. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 45, n. 5, p. 422-429, May 2018.

DE BRITO ALVES, J. L. 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**, Sep 9 2016.

DE BRITO ALVES, J. L. et al. Maternal protein restriction increases respiratory and sympathetic activities and sensitizes peripheral chemoreflex in male rat offspring. **J Nutr**, v. 145, n. 5, p. 907-14, May 2015.

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

DE BRITO ALVES, J. L. et al. Transcriptional response of skeletal muscle to a low protein perinatal diet in rat offspring at different ages: The role of key enzymes of glucose-fatty acid oxidation. **J Nutr Biochem**, v. 41, p. 117-123, Mar 2017.

DELAHAYE, F. et al. Maternal perinatal undernutrition programs a "brown-like" phenotype of gonadal white fat in male rat at weaning. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 299, n. 1, p. R101-10, Jul 2010.

DESAI, M.; BABU, J.EROSS, M. G. Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 293, n. 6, p. R2306-14, Dec 2007.

DHILLON, A.eSTEADMAN, R. H. Liver Diseases. In: (Ed.). **Anesthesia and Uncommon Diseases (Sixth Edition)**: Elsevier, 2012. p.162-214.

DING, H. R. et al. Lipometabolism and Glycometabolism in Liver Diseases. **Biomed Res Int**, v. 2018, p. 1287127, 2018.

DORIGHELLO, G. G. et al. Correlation between Mitochondrial Reactive Oxygen and Severity of Atherosclerosis. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 7843685, 2016.

EGGER, G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, n. 6990, p. 457-63, May 27 2004.

EKSTEDT, M. et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. **Hepatology**, v. 61, n. 5, p. 1547-54, May 2015.

ERHUMA, A. et al. Prenatal exposure to a low-protein diet programs disordered regulation of lipid metabolism in the aging rat. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 292, n. 6, p. E1702-14, Jun 2007.

ERIKCI ERTUNC, M.EHOTAMISLIGIL, G. S. Lipid signaling and lipotoxicity in metabolic inflammation: indications for metabolic disease pathogenesis and treatment. **J Lipid Res**, Jun 21 2016.

EVERETT, L.; GALLI, A.ECRABB, D. The role of hepatic peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in health and disease. **Liver**, v. 20, n. 3, p. 191-9, Jun 2000.

FALCAO-TEBAS, F. et al. Maternal low-protein diet-induced delayed reflex ontogeny is attenuated by moderate physical training during gestation in rats. **Br J Nutr**, v. 107, n. 3, p. 372-7, Feb 2012.

FENG, A. et al. Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD): Implications for health and nutritional issues among rural children in China. **Bioscience trends**, v. 9, n. 2, p. 82-87, 2015.

FERRAMOSCA, A.EZARA, V. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 7, p. 1746-55, Feb 21 2014.

FERRE, P.EFOUFELLE, F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. **Diabetes Obes Metab**, v. 12 Suppl 2, p. 83-92, Oct 2010.

FERREIRA, D. J. et al. Perinatal low-protein diet alters brainstem antioxidant metabolism in adult offspring. **Nutr Neurosci**, v. 19, n. 8, p. 369-375, Jun 2 2015.

FERREIRA, D. J. S. et al. Mitochondrial dysfunction: maternal protein restriction as a trigger of reactive species overproduction and brainstem energy failure in male offspring brainstem. **Nutr Neurosci**, v. 1, p. 1-11, 2018.

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

FERRO CAVALCANTE, T. C. et al. Effects of a Westernized Diet on the Reflexes and Physical Maturation of Male Rat Offspring During the Perinatal Period. **Lipids**, v. 48, n. 11, p. 1157-1168, November 01 2013.

FIDALGO, M. et al. Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training. **The British journal of nutrition**, v. 1, p. 1-8, May 1 2012.

_____. Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training. **The British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 03, p. 449-456, May 1 2013.

FIGUEIRA, T. R. et al. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 16, p. 2029-74, Jun 1 2013.

FIORITO, G. et al. B-vitamins intake, DNA-methylation of One Carbon Metabolism and homocysteine pathway genes and myocardial infarction risk: the EPICOR study. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 24, n. 5, p. 483-8, May 2014.

FLANNERY, C. et al. Skeletal muscle insulin resistance promotes increased hepatic de novo lipogenesis, hyperlipidemia, and hepatic steatosis in the elderly. **Diabetes**, v. 61, n. 11, p. 2711-7, Nov 2012.

FRANCO, M. C. et al. Circulating renin-angiotensin system and catecholamines in childhood: is there a role for birthweight? **Clin Sci (Lond)**, v. 114, n. 5, p. 375-80, Mar 2008.

FRANCO MDO, C. et al. Intrauterine undernutrition: expression and activity of the endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. **Cardiovasc Res**, v. 56, n. 1, p. 145-53, Oct 2002.

FUKUI, H.EMORAES, C. T. The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis? **Trends Neurosci**, v. 31, n. 5, p. 251-6, May 2008.

GALLOWAY, C. A. et al. Decreasing mitochondrial fission alleviates hepatic steatosis in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 307, n. 6, p. G632-41, Sep 15 2014.

GARCIA-RUIZ, C.; KAPLOWITZ, N. EFERNANDEZ-CHECA, J. C. Role of Mitochondria in Alcoholic Liver Disease. **Curr Pathobiol Rep**, v. 1, n. 3, p. 159-168, Sep 1 2013.

GARLID, K. D. et al. On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. **J Biol Chem**, v. 271, n. 5, p. 2615-20, 1996.

GHIBAUDI, L. et al. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. **Obes Res**, v. 10, n. 9, p. 956-63, Sep 2002.

GLANCY, B. & BALABAN, R. S. Role of mitochondrial Ca^{2+} in the regulation of cellular energetics. **Biochemistry**, v. 51, n. 14, p. 2959-73, 2012.

GLUCKMAN, P. D. et al. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 1, p. 61-73, 2008.

GODFREY, K. M. et al. Epigenetic mechanisms and the mismatch concept of the developmental origins of health and disease. **Pediatric research**, v. 61, n. 5 Part 2, p. 5R, 2007.

GONÇALVES, I. O. et al. Exercise mitigates mitochondrial permeability transition pore and quality control mechanisms alterations in nonalcoholic steatohepatitis. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 41, n. 3, p. 298-306, 2015.

GONG, L.; PAN, Y. X. & CHEN, H. Gestational low protein diet in the rat mediates Igf2 gene expression in male offspring via altered hepatic DNA methylation. **Epigenetics**, v. 5, n. 7, p. 619-26, Oct 1 2010.

GOODRIDGE, A. G. Regulation of fatty acid synthesis in isolated hepatocytes. Evidence for a physiological role for long chain fatty acyl coenzyme A and citrate. **J Biol Chem**, v. 248, n. 12, p. 4318-26, Jun 25 1973.

GORDILLO, M.; EVANS, T. & GOUGHON-EVANS, V. Orchestrating liver development. **Development**, v. 142, n. 12, p. 2094-108, Jun 15 2015.

GOSBY, A. K.; MALONEY, C. A. & CATERSON, I. D. Elevated insulin sensitivity in low-protein offspring rats is prevented by a high-fat diet and is associated with visceral fat. **Obesity (Silver Spring)**, v. 18, n. 8, p. 1593-600, Aug 2010.

GOYAL, R. et al. Brain renin-angiotensin system: fetal epigenetic programming by maternal protein restriction during pregnancy. **Reprod Sci**, v. 17, n. 3, p. 227-38, 2010.

GRAFF, J.ETSAI, L. H. Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 2, p. 97-111, Feb 2013.

HABIG, W. H.EJAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases (rat and human). **Methods Enzymol**, v. 77, p. 218-31, 1981.

HALESTRAP, A. P.EPASDOIS, P. The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 11, n. 15, p. 8, 2009.

HALLIWELL, B.eGUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. OUP Oxford, 2007. ISBN 9780198568698.

HAN, D. et al. Redox regulation of tumor necrosis factor signaling. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 9, p. 2245-63, Sep 2009.

HAN, H. S. et al. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. **Exp Mol Med**, v. 48, p. e218, Mar 11 2016.

HARDY, T. M.ETOLLEFSBOL, T. O. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. **Epigenomics**, v. 3, n. 4, p. 503-18, Aug 2011.

HIDALGO, C.EDONOSO, P. Crosstalk between calcium and redox signaling: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 7, p. 1275-312, Jul 2008.

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

HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J. L. EBROWN, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **J Clin Invest**, v. 109, n. 9, p. 1125-31, May 2002.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860-7, Dec 14 2006.

HOU, L. et al. Pre-natal undernutrition and post-natal overnutrition are associated with permanent changes in hepatic metabolism markers and fatty acid composition in sheep. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 210, n. 2, p. 317-29, Feb 2014.

HROUDOVA, J. et al. Progress in drug development for Alzheimer's disease: An overview in relation to mitochondrial energy metabolism. **Eur J Med Chem**, Mar 30 2016.

HUDGINS, L. C. et al. Human fatty acid synthesis is stimulated by a eucaloric low fat, high carbohydrate diet. **J Clin Invest**, v. 97, n. 9, p. 2081-91, 1996.

HUDGINS, L. C. et al. Relationship between carbohydrate-induced hypertriglyceridemia and fatty acid synthesis in lean and obese subjects. **J Lipid Res**, v. 41, n. 4, p. 595-604, 2000.

HUSSAIN, M. M. et al. Clearance of chylomicron remnants by the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. **J Biol Chem**, v. 266, n. 21, p. 13936-40, Jul 25 1991.

HWANG, J. H. et al. Impaired net hepatic glycogen synthesis in insulin-dependent diabetic subjects during mixed meal ingestion. A ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy study. **J Clin Invest**, v. 95, n. 2, p. 783-7, Feb 1995.

IIZUKA, K. et al. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 19, p. 7281-6, 2004.

IMAI, H. et al. Lipid Peroxidation-Dependent Cell Death Regulated by GPx4 and Ferroptosis. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 403, p. 143-170, 2017.

INDO, H. P. et al. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. **J Clin Biochem Nutr**, v. 56, n. 1, p. 1-7, Jan 2015.

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

ITO, T. et al. Maternal undernutrition induces the expression of hypoxia-related genes in the fetal brain. **Tohoku J Exp Med**, v. 226, n. 1, p. 37-44, 2012.

ITO, T. et al. Aberrant expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in the fetal heart is associated with maternal undernutrition. **Tohoku J Exp Med**, v. 224, n. 3, p. 163-71, 2011.

JABLONKA, E.ELAMB, M. J. The changing concept of epigenetics. **Ann N Y Acad Sci**, v. 981, p. 82-96, Dec 2002.

JENSEN-URSTAD, A. P.ESEMENKOVICH, C. F. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger? **Biochim Biophys Acta**, v. 1821, n. 5, p. 747-53, May 2012a.

_____. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger? **Biochim Biophys Acta**, v. 5, p. 747-53, 2012b.

JEZEK, P.EHLAVATA, L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 12, p. 2478-503, Dec 2005.

Jl, X.EWANG, K. [Research of glutathione peroxidase and thioredoxin reductases on development of hepatocellular carcinoma]. **Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi**, v. 22, n. 8, p. 639-40, Aug 2014.

JIA, Y. et al. Maternal low-protein diet induces gender-dependent changes in epigenetic regulation of the glucose-6-phosphatase gene in newborn piglet liver. **J Nutr**, v. 142, n. 9, p. 1659-65, Sep 2012.

JOHANSSON, S. et al. Increased catecholamines and heart rate in children with low birth weight: perinatal contributions to sympathoadrenal overactivity. **J Intern Med**, v. 261, n. 5, p. 480-7, May 2007.

JORNAYVAZ, F. R.ESHULMAN, G. I. Regulation of mitochondrial biogenesis. **Essays Biochem**, v. 47, p. 69-84, 2010.

JOUSSE, C. et al. Perinatal protein malnutrition affects mitochondrial function in adult and results in a resistance to high fat diet-induced obesity. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104896, 2014.

JUMP, D. B. et al. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **J Nutr**, v. 135, n. 11, p. 2503-6, Nov 2005.

KAIRISALO, M. et al. X-linked inhibitor of apoptosis protein increases mitochondrial antioxidants through NF-kappaB activation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 364, n. 1, p. 138-44, Dec 7 2007.

KAKIMOTO, P. A. et al. H₂O₂ release from the very long chain acyl-CoA dehydrogenase. **Redox biology**, v. 4, p. 375-380, 2015.

KALANI, K.; YAN, S. F. EYAN, S. S. Mitochondrial permeability transition pore: a potential drug target for neurodegeneration. **Drug discovery today**, 2018.

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

KATAYAMA, K. Zinc and protein metabolism in chronic liver diseases. **Nutr Res**, v. 74, p. 1-9, Feb 2020.

KAWAHARA, H. et al. Mutation of mitochondrial DNA in livers from patients with alcoholic hepatitis and nonalcoholic steatohepatitis. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 31, n. 1 Suppl, p. S54-60, Jan 2007.

KAWANO, Y. E COHEN, D. E. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. **J Gastroenterol**, v. 48, n. 4, p. 434-41, Apr 2013.

KEDING, G. Nutrition Transition in Rural Tanzania and Kenya. 2016.

KERSTEN, S. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. **J Clin Invest**, v. 103, n. 11, p. 1489-98, 1999.

KEVIN FOSKETT, J.EMADESH, M. Regulation of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter by MICU1 and MICU2. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 449, n. 4, p. 377-83, Jul 11 2014.

KING, A. L. et al. Chronic ethanol consumption enhances sensitivity to Ca^{2+} -mediated opening of the mitochondrial permeability transition pore and increases cyclophilin D in liver. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 299, n. 4, p. G954-66, Oct 2010.

KING, A. L. et al. Involvement of the mitochondrial permeability transition pore in chronic ethanol-mediated liver injury in mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 306, n. 4, p. G265-77, Feb 15 2014.

KOPP, J. L.; GROMPE, M.ESANDER, M. Stem cells versus plasticity in liver and pancreas regeneration. **Nat Cell Biol**, v. 18, n. 3, p. 238-45, Feb 25 2016.

KOSAKA, S.EUMEZAKI, M. A systematic review of the prevalence and predictors of the double burden of malnutrition within households. **The British journal of nutrition**, v. 117, n. 8, p. 1118-1127, 2017.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.EVERCESI, A. E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca^{2+} is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. **FEBS letters**, v. 378, n. 2, p. 150-152, 1996.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.EVERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett**, v. 495, n. 1-2, p. 12-5, 2001.

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

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

KROEMER, G.; GALLUZZI, L. EBRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 99-163, 2007.

KROKER, F. et al. The double burden of undernutrition and excess body weight in Mexico. **The American journal of clinical nutrition**, v. 100, p. 1652S-8S, 12/01 2014.

KUMASHIRO, N. et al. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 39, p. 16381-5, Sep 27 2011.

KWONG, J. Q. EMOLKENTIN, J. D. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. **Cell metabolism**, v. 21, n. 2, p. 206-214, 2015.

LABAYEN, I. et al. Early programming of body composition and fat distribution in adolescents. **The Journal of nutrition**, v. 136, n. 1, p. 147-52, Jan 2006.

LAVRADOR, M. S. F. et al. Interesterified Fats Induce Deleterious Effects on Adipose Tissue and Liver in LDLr-KO Mice. **Nutrients**, v. 11, n. 2, Feb 22 2019.

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

LEE, Y. J. et al. Nuclear receptor PPAR γ -regulated monoacylglycerol O-acyltransferase 1 (MGAT1) expression is responsible for the lipid accumulation in diet-induced hepatic steatosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 34, p. 13656-61, 2012.

LEMASTERS, J. J. et al. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. **Biochim Biophys Acta**, v. 11, n. 401, p. 1, 2009.

LENAZ, G. Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? **Adv Exp Med Biol**, v. 942, p. 93-136, 2012.

LILLYCROP, K. A. et al. Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications. **Br J Nutr**, v. 97, n. 6, p. 1064-73, Jun 2007.

LINDBLOM, R. et al. Targeting Mitochondria and Reactive Oxygen Species-Driven Pathogenesis in Diabetic Nephropathy. **Rev Diabet Stud**, v. 12, n. 1-2, p. 134-56, Spring-Summer 2015.

LINDEBOOM, L. et al. Proton magnetic resonance spectroscopy reveals increased hepatic lipid content after a single high-fat meal with no additional modulation by added protein. **The American journal of clinical nutrition**, v. 101, n. 1, p. 65-71, 2014.

LU, C.; XU, W.EZHENG, S. Nrf2 activation is required for curcumin to induce lipocyte phenotype in hepatic stellate cells. **Biomed Pharmacother**, v. 95, p. 1-10, Nov 2017.

LUKASZEWSKI, M. A. et al. Maternal prenatal undernutrition programs adipose tissue gene expression in adult male rat offspring under high-fat diet. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 301, n. 3, p. E548-59, Sep 2011.

LYONS, C. L.; KENNEDY, E. B.EROCHE, H. M. Metabolic Inflammation-Differential Modulation by Dietary Constituents. **Nutrients**, v. 8, n. 5, p. 247, 2016.

MAGRI, T. P. et al. Interesterified fat or palm oil as substitutes for partially hydrogenated fat in maternal diet can predispose obesity in adult male offspring. **Clin Nutr**, v. 34, n. 5, p. 904-10, Oct 2015.

MALAGUTI, C. et al. Oxidative stress and susceptibility to mitochondrial permeability transition precedes the onset of diabetes in autoimmune non-obese diabetic mice. **Free Radic Res**, v. 48, n. 12, p. 1494-504, Dec 2014.

MANSEGO, M. L. et al. Techniques of DNA methylation analysis with nutritional applications. **J Nutrigenet Nutrigenomics**, v. 6, n. 2, p. 83-96, 2013.

MANTENA, S. K. et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases. **Free Radic Biol Med**, v. 44, n. 7, p. 1259-72, Apr 1 2008.

MARTIN-GRONERT, M. S. et al. Cell-autonomous programming of rat adipose tissue insulin signalling proteins by maternal nutrition. **Diabetologia**, v. 59, n. 6, p. 1266-75, Jun 2016.

MATSUZAKA, T. et al. Elovl6 promotes nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 56, n. 6, p. 2199-208, Dec 2012.

MAZZIO, E. A.ESOLIMAN, K. F. Epigenetics and nutritional environmental signals. **Integr Comp Biol**, v. 54, n. 1, p. 21-30, Jul 2014.

MBYE, L. H. et al. Comparative neuroprotective effects of cyclosporin A and NIM811, a nonimmunosuppressive cyclosporin A analog, following traumatic brain injury. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 29, n. 1, p. 87-97, 2009.

MEHTA, S. et al. The 2 micron plasmid purloins the yeast cohesin complex: a mechanism for coupling plasmid partitioning and chromosome segregation? **J Cell Biol**, v. 158, n. 4, p. 625-637, 2002.

MITCHELL, C.; SCHNEPER, L. M. ENOTTERMAN, D. A. DNA methylation, early life environment, and health outcomes. **Pediatr Res**, v. 79, n. 1-2, p. 212-9, Jan 2016.

MIYAJIMA, A.; TANAKA, M. ITOH, T. Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 5, p. 561-74, May 1 2014.

MORA-GARCIA, G. et al. Changes in diet quality over 10 years of nutrition transition in Colombia: analysis of the 2005 and 2015 nationally representative cross-sectional surveys. **Int J Public Health**, v. 65, n. 5, p. 547-558, Jun 2020.

MORAES, C. et al. Effect of maternal protein restriction on liver metabolism in rat offspring. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 64, n. 5, p. 347-355, 2014.

MORGAN, M. J. ELIU, Z. G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. **Cell Res**, v. 21, n. 1, p. 103-15, 2011.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem J**, v. 417, n. 1, p. 1-13, 2009.

NAITO, M. et al. Differentiation and function of Kupffer cells. **Med Electron Microsc**, v. 37, n. 1, p. 16-28, Mar 2004.

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**, v. 39, n. 8, p. 880-7, Aug 2014.

NELSON, D. L. C., M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5º Edition. 2011.

NG, M. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 384, n. 9945, p. 766-81, Aug 30 2014.

NGUYEN, P. et al. Liver lipid metabolism. **J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)**, v. 92, n. 3, p. 272-83, Jun 2008.

NICHOLLS, D. G. Mitochondrial calcium function and dysfunction in the central nervous system. **Biochim Biophys Acta**, v. 11, n. 24, p. 17, 2009.

NITA, M. EGRZYBOWSKI, A. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 3164734, 2016.

NOGUEIRA, V. et al. Carotid body removal normalizes arterial blood pressure and respiratory frequency in offspring of protein-restricted mothers. **Hypertens Res**, v. 41, n. 12, p. 1000-1012, Dec 2018.

NOHL, H.; GILLE, L. ESTANIEK, K. Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. **Biochem Pharmacol**, v. 69, n. 5, p. 719-23, Mar 1 2005.

NORENBERG, M. D. ERAO, K. V. The mitochondrial permeability transition in neurologic disease. **Neurochem Int**, v. 50, n. 7-8, p. 983-97, 2007.

NUYT, A. M. Mechanisms underlying developmental programming of elevated blood pressure and vascular dysfunction: evidence from human studies and experimental animal models. **Clin Sci (Lond)**, v. 114, n. 1, p. 1-17, Jan 2008.

NUYT, A. M.EALEXANDER, B. T. Developmental programming and hypertension. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 18, n. 2, p. 144-52, Mar 2009.

OAKES, N. D. et al. Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. **Diabetes**, v. 46, n. 11, p. 1768-74, Nov 1997.

OLIVEIRA, J. M. Nature and cause of mitochondrial dysfunction in Huntington's disease: focusing on huntingtin and the striatum. **J Neurochem**, v. 114, n. 1, p. 1-12, 2010.

OPIE, L. H.ENEWSHOLME, E. A. The activities of fructose 1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in white muscle and red muscle. **Biochem J**, v. 103, n. 2, p. 391-9, May 1967.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 2, p. 85-97, Feb 2011.

OZANNE, S. E.EHALES, C. N. Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. **Nature**, v. 427, n. 6973, p. 411-2, Jan 29 2004.

OZAWA, T. Mitochondrial genome mutation in cell death and aging. **J Bioenerg Biomembr**, v. 31, n. 4, p. 377-90, 1999.

PAGLIA, D. E.EVALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967.

PALMIERI, F. et al. Mitochondrial substrate carriers. **Biochim Biophys Acta**, v. 1101, n. 2, p. 223-7, Jul 17 1992.

PARK, J. et al. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with lipid dysregulation and insulin resistance in obesity. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 12, p. 5146-57, Jun 2005.

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

PARKS, E. J. et al. Dietary sugars stimulate fatty acid synthesis in adults. **J Nutr**, v. 138, n. 6, p. 1039-46, Jun 2008.

PAULINO-SILVA, K. M. COSTA-SILVA, J. H. Hypertension in rat offspring subjected to perinatal protein malnutrition is not related to the baroreflex dysfunction. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 46, n. 11, p. 1046-1053, Jul 27 2016.

PÉREZ, M. J. QUINTANILLA, R. A. Development or disease: duality of the mitochondrial permeability transition pore. **Developmental biology**, v. 426, n. 1, p. 1-7, 2017.

PERRY, R. J. et al. Leptin Mediates a Glucose-Fatty Acid Cycle to Maintain Glucose Homeostasis in Starvation. **Cell**, v. 172, n. 1-2, p. 234-248 e17, Jan 11 2018.

PESSAYRE, D. Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 22 Suppl 1, p. S20-7, Jun 2007.

PESSAYRE, D. FROMENTY, B. NASH: a mitochondrial disease. **J Hepatol**, v. 42, n. 6, p. 928-40, Jun 2005.

PETERSEN, K. F. et al. Mechanism by which glucose and insulin inhibit net hepatic glycogenolysis in humans. **J Clin Invest**, v. 101, n. 6, p. 1203-9, Mar 15 1998.

PLANQUÉ, R. et al. Maintaining maximal metabolic flux by gene expression control. **PLoS computational biology**, v. 14, n. 9, p. e1006412-e1006412, 2018.

POPKIN, B. M. Nutrition Transition and the Global Diabetes Epidemic. **Current diabetes reports**, v. 15, n. 9, p. 64-64, 2015.

POSTIC, C. EGIRARD, J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. **J Clin Invest**, v. 118, n. 3, p. 829-38, Mar 2008.

PRUIS, M. et al. Lipotoxicity and the role of maternal nutrition. **Acta Physiologica**, v. 210, n. 2, p. 296-306, 2014.

PUCHE, J. E.; SAIMAN, Y. FRIEDMAN, S. L. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. **Compr Physiol**, v. 3, n. 4, p. 1473-92, Oct 2013.

PUGA, A. et al. Activation of transcription factors activator protein-1 and nuclear factor-kappaB by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Biochem Pharmacol**, v. 59, n. 8, p. 997-1005, Apr 15 2000.

QUIJANO, C. et al. Interplay between oxidant species and energy metabolism. **Redox Biol**, v. 8, p. 28-42, Nov 30 2015.

RADFORD, E. J. et al. In utero effects. In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism. **Science**, v. 345, n. 6198, p. 1255903, Aug 15 2014.

RAMADAN, W. S.; ALSHIRAIHI, I.EAL-KARIM, S. Effect of maternal low protein diet during pregnancy on the fetal liver of rats. **Ann Anat**, v. 195, n. 1, p. 68-76, Jan 2013.

RANGEL, M. et al. Modification of epigenetic patterns in low birth weight children: importance of hypomethylation of the ACE gene promoter. **PLoS One**, v. 9, n. 8, 2014.

RASHEED, M. Z.; TABASSUM, H.EPARVEZ, S. Mitochondrial permeability transition pore: a promising target for the treatment of Parkinson's disease. **Protoplasma**, Jan 29 2016.

RASOLA, A.EBERNARDI, P. Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. **Cell Calcium**, v. 50, n. 3, p. 222-33, Sep 2011.

_____. The mitochondrial permeability transition pore and its adaptive responses in tumor cells. **Cell Calcium**, v. 56, n. 6, p. 437-45, Dec 2014.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.EFAHEY, G. C., JR. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

RESHETNYAK, V. I. Physiological and molecular biochemical mechanisms of bile formation. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 42, p. 7341-60, 2013.

REZNICK, A. Z.EPACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 357-63, 1994.

RIBEIRO, A. M. et al. [Low birth weight and obesity: causal or casual association?]. **Rev Paul Pediatr**, v. 33, n. 3, p. 341-9, Jul-Sep 2015.

RIOJAS-HERNÁNDEZ, A. et al. Enhanced oxidative stress sensitizes the mitochondrial permeability transition pore to opening in heart from Zucker Fa/fa rats with type 2 diabetes. **Life sciences**, v. 141, p. 32-43, 2015.

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

RODRIGUES, C. M. et al. Amyloid beta-peptide disrupts mitochondrial membrane lipid and protein structure: protective role of tauroursodeoxycholate. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 281, n. 2, p. 468-74, 2001.

ROHLMANN, A. et al. Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. **J Clin Invest**, v. 101, n. 3, p. 689-95, Feb 1 1998.

ROLO, A. P.; TEODORO, J. S.EPALMEIRA, C. M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Free Radic Biol Med**, v. 52, n. 1, p. 59-69, Jan 01 2012.

RONCHI, J. A. et al. Increased Susceptibility of Gracilinanus microtarsus Liver Mitochondria to Ca(2)(+)-Induced Permeability Transition Is Associated with a More Oxidized State of NAD(P). **Oxid Med Cell Longev**, v. 2015, p. 940627, 2015.

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

RUSSMANN, S.; KULLAK-UBLICK, G. A.EGRATTAGLIANO, I. Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity. **Curr Med Chem**, v. 16, n. 23, p. 3041-53, 2009.

SACCO, R.; EGGENHOFFNER, R. EGIACOMELLI, L. Glutathione in the treatment of liver diseases: insights from clinical practice. **Minerva Gastroenterol Dietol**, v. 62, n. 4, p. 316-324, Dec 2016.

SADAKIERSKA-CHUDY, A. FILIP, M. A comprehensive view of the epigenetic landscape. Part II: Histone post-translational modification, nucleosome level, and chromatin regulation by ncRNAs. **Neurotox Res**, v. 27, n. 2, p. 172-97, Feb 2015.

SANDOVICI, I. et al. Maternal diet and aging alter the epigenetic control of a promoter-enhancer interaction at the Hnf4a gene in rat pancreatic islets. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 13, p. 5449-54, Mar 29 2011.

SANTO-DOMINGO, J.; WIEDERKEHR, A. DE MARCHI, U. Modulation of the matrix redox signaling by mitochondrial Ca(2+). **World J Biol Chem**, v. 6, n. 4, p. 310-23, Nov 26 2015.

SARIH, M.; SOUVANNAVONG, V. ADAM, A. Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 191, n. 2, p. 503-8, Mar 15 1993.

SARMIENTO, O. et al. The dual burden of malnutrition in Colombia. **The American journal of clinical nutrition**, v. 100, p. 1628S-35S, 12/01 2014.

SCHADINGER, S. E. et al. PPARgamma2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 288, n. 6, p. 11, 2005.

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

SCHOONJANS, K.; STAELS, B. EAUWERX, J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. **Biochim Biophys Acta**, v. 26, n. 2, p. 93-109, 1996.

SCHREIBER, J. et al. Coordinated binding of NF-kappaB family members in the response of human cells to lipopolysaccharide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 15, p. 5899-904, Apr 11 2006.

SHIMOMURA, I.; BASHMAKOV, Y. E HORTON, J. D. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. **J Biol Chem**, v. 274, n. 42, p. 30028-32, Oct 15 1999.

SHULGA, N. E PASTORINO, J. G. Ethanol sensitizes mitochondria to the permeability transition by inhibiting deacetylation of cyclophilin-D mediated by sirtuin-3. **J Cell Sci**, v. 123, n. Pt 23, p. 4117-27, 2010.

SIDDIQUE, K. et al. Effect of postnatal maternal protein intake on prenatal programming of hypertension. **Reprod Sci**, v. 21, n. 12, p. 1499-507, Dec 2014.

SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox Biol**, v. 11, p. 613-619, Apr 2017.

SILVA-FILHO, R. **MATERNAL PROTEIN RESTRICTION INDUCE LIVER MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION ON YOUNG RATS**. 2013. Departamento de Educação Física e Ciências do Esporte, Universidade Federal de Pernambuco

SIMOES-ALVES, A. C. et al. Saturated Fatty Acid-Enriched Diet-Impaired Mitochondrial Bioenergetics in Liver From Undernourished Rats During Critical Periods of Development. **Cells**, v. 8, n. 4, Apr 10 2019.

SINGH, S. P. et al. PGC-1 alpha regulates HO-1 expression, mitochondrial dynamics and biogenesis: Role of epoxyeicosatrienoic acid. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 125, p. 8-18, 2016.

SLUSE, F. E. JARMUSZKIEWICZ, W. Uncoupling proteins outside the animal and plant kingdoms: functional and evolutionary aspects. **FEBS Lett**, v. 510, n. 3, p. 117-20, 2002.

SLUSE, F. E. et al. Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact. **Biochim Biophys Acta**, p. 6, 2006.

SOSA-LARIOS, T. C. et al. Alterations in lipid metabolism due to a protein-restricted diet in rats during gestation and/or lactation. **Food Funct**, v. 3, n. 10, 2017.

SOUSA, C. P. D. C.; OLINDA, R. A. D. PEDRAZA, D. F. Prevalence of stunting and overweight/obesity among Brazilian children according to different epidemiological scenarios: systematic review and meta-analysis. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 134, p. 251-262, 2016.

SPITELLER, G. Are changes of the cell membrane structure causally involved in the aging process? **Ann N Y Acad Sci**, v. 959, p. 30-44, 2002.

STANIEK, K. ENOHL, H. Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? **Biochim Biophys Acta**, v. 1460, n. 2-3, p. 268-75, Nov 20 2000.

STEYN, N. P. MCHIZA, Z. J. Obesity and the nutrition transition in Sub-Saharan Africa. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1311, n. 1, p. 88-101, 2014.

STONE, N. et al. Bioinformatic and genetic association analysis of microRNA target sites in one-carbon metabolism genes. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e21851, 2011.

SZARC VEL SZIC, K. et al. From inflammaging to healthy aging by dietary lifestyle choices: is epigenetics the key to personalized nutrition? **Clin Epigenetics**, v. 7, p. 33, 2015.

TAGUCHI, Y. et al. Triglyceride synthesis in hepatocytes isolated from rats fed a low-protein diet is enhanced independently of upregulation of insulin signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 490, n. 3, p. 800-805, 2017/08/26/ 2017.

TAHARA, E. B.; NAVARETE, F. D. EKOWALTOWSKI, A. J. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. **Free Radic Biol Med**, v. 46, n. 9, p. 1283-97, May 1 2009.

TANRIKULU-KUCUK, S. et al. Effect of dietary curcumin and capsaicin on testicular and hepatic oxidant-antioxidant status in rats fed a high-fat diet. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 44, n. 7, p. 774-782, Jul 2019.

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

TAYLOR, P. D. et al. Impaired glucose homeostasis and mitochondrial abnormalities in offspring of rats fed a fat-rich diet in pregnancy. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 288, n. 1, p. R134-9, Jan 2005.

TEODORO, J. S. et al. Differential alterations in mitochondrial function induced by a choline-deficient diet: understanding fatty liver disease progression. **Mitochondrion**, v. 8, n. 5-6, p. 367-76, Dec 2008.

TIFFON, C. The Impact of Nutrition and Environmental Epigenetics on Human Health and Disease. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 11, Nov 1 2018.

TOYOSHIMA, Y. et al. Dietary protein deprivation upregulates insulin signaling and inhibits gluconeogenesis in rat liver. **J Mol Endocrinol**, v. 45, n. 5, p. 329-40, Nov 2010.

TREMBLAY, K. D.EZARET, K. S. Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues. **Dev Biol**, v. 280, n. 1, p. 87-99, Apr 1 2005.

TURNER, N. et al. Distinct patterns of tissue-specific lipid accumulation during the induction of insulin resistance in mice by high-fat feeding. **Diabetologia**, v. 56, n. 7, p. 1638-1648, 2013.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAN DER LAAN, M.; HORVATH, S. E.EPFANNER, N. Mitochondrial contact site and cristae organizing system. **Curr Opin Cell Biol**, v. 41, p. 33-42, 2016.

VAN HUL, N. et al. Kupffer cells influence parenchymal invasion and phenotypic orientation, but not the proliferation, of liver progenitor cells in a murine model of liver injury. **Am J Pathol**, v. 179, n. 4, p. 1839-50, 2011.

VAN STRATEN, E. M. et al. The liver X-receptor gene promoter is hypermethylated in a mouse model of prenatal protein restriction. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 298, n. 2, p. R275-82, Feb 2010.

VAN ZUTPHEN, T. et al. Malnutrition-associated liver steatosis and ATP depletion is caused by peroxisomal and mitochondrial dysfunction. **J Hepatol**, Jun 13 2016.

VAZQUEZ-ACEVEDO, M. et al. Dissecting the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae. **Biochim Biophys Acta**, v. 10, n. 16, p. 30022-6, 2016.

VEGA, C. C. et al. Resveratrol partially prevents oxidative stress and metabolic dysfunction in pregnant rats fed a low protein diet and their offspring. **The Journal of physiology**, v. 594, n. 5, p. 1483-1499, 2016.

VERCESI, A. E. et al. Ca^{2+} -dependent NAD(P)^{+} -induced alterations of rat liver and hepatoma mitochondrial membrane permeability. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 154, n. 3, p. 934-41, Aug 15 1988.

VERCESI, A. E. et al. ATP and Ca^{2+} homeostasis in *Trypanosoma cruzi*. **Braz J Med Biol Res**, v. 26, n. 4, p. 355-63, Apr 1993.

VERCESI, A. E. et al. Thapsigargin causes Ca^{2+} release and collapse of the membrane potential of *Trypanosoma brucei* mitochondria in situ and of isolated rat liver mitochondria. **J Biol Chem**, v. 268, n. 12, p. 8564-8, Apr 25 1993.

VICKERS, M. H. et al. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 279, n. 1, p. E83-7, Jul 2000.

VIDAL-PUIG, A. J. et al. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. **J Biol Chem**, v. 275, n. 21, p. 16258-66, May 26 2000.

VIDELA, L. A. et al. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. **Clin Sci (Lond)**, v. 106, n. 3, p. 261-8, Mar 2004.

VIGUERAS-VILLASEÑOR, R. M. et al. Alterations in the spermatogenic function generated by obesity in rats. **Acta histochemica**, v. 113, n. 2, p. 214-220, 2011.

WANG, F. et al. Activated glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with insulin resistance by upregulating pentose and pentosidine in diet-induced obesity of rats. **Horm Metab Res**, v. 44, n. 13, p. 938-42, Dec 2012.

WANG, J. et al. Catch-up growth following food restriction exacerbates adulthood glucose intolerance in pigs exposed to intrauterine undernutrition. **Nutrition**, v. 32, n. 11-12, p. 1275-84, Nov-Dec 2016.

WANG, Y. et al. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 16, n. 11, p. 678-89, Nov 2015.

WARNE, J. et al. Selective Inhibition of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Protects against Neurodegeneration in Experimental Multiple Sclerosis. **J Biol Chem**, v. 291, n. 9, p. 4356-73, Feb 26 2016.

WATERLAND, R. A.EMICHELS, K. B. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. **Annu Rev Nutr**, v. 27, p. 363-88, 2007.

WELLS, J. C. The programming effects of early growth. **Early Hum Dev**, v. 83, n. 12, p. 743-8, Dec 2007.

_____. The thrifty phenotype: An adaptation in growth or metabolism? **Am J Hum Biol**, v. 23, n. 1, p. 65-75, Jan-Feb 2011.

WENSVEEN, F. M. et al. NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. **Nat Immunol**, v. 16, n. 4, p. 376-85, Apr 2015.

WEST-EBERHARD, M. J. Developmental plasticity and the origin of species differences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. suppl 1, p. 6543-6549, 2005.

WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. **J Exp Zool B Mol Dev Evol**, v. 304, n. 6, p. 610-8, Nov 15 2005.

WIEGMAN, C. H. et al. Hepatic VLDL production in ob/ob mice is not stimulated by massive de novo lipogenesis but is less sensitive to the suppressive effects of insulin. **Diabetes**, v. 52, n. 5, p. 1081-9, 2003.

WINICHAGOON, P. Transition of maternal and child nutrition in Asia: implications for public health. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 18, n. 3, p. 312-317, 2015.

WOODFIELD, K. Y.; PRICE, N. T. EHALESTRAP, A. P. cDNA cloning of rat mitochondrial cyclophilin. **Biochim Biophys Acta**, v. 20, p. 1-2, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. Malnutrition - Fact sheets from WHO. 2017. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> >.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. Obesity and overweight - Fact sheets from WHO. **Fact sheet from WHO** 2017. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> >.

XU, J. et al. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. **J Biol Chem**, v. 274, n. 33, p. 23577-83, 1999.

XUE, L. et al. Ribonucleotide reductase subunit M2B deficiency leads to mitochondrial permeability transition pore opening and is associated with aggressive clinicopathologic manifestations of breast cancer. **American journal of translational research**, v. 10, n. 11, p. 3635, 2018.

YOON, H. J.ECHA, B. S. Pathogenesis and therapeutic approaches for non-alcoholic fatty liver disease. **World J Hepatol**, v. 6, n. 11, p. 800-11, Nov 27 2014.

YU, W. et al. Cyclosporine A Suppressed Glucose Oxidase Induced P53 Mitochondrial Translocation and Hepatic Cell Apoptosis through Blocking Mitochondrial Permeability Transition. **Int J Biol Sci**, v. 12, n. 2, p. 198-209, 2016.

ZAMBRANO, E. et al. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex-and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. **The Journal of physiology**, v. 571, n. 1, p. 221-230, 2006.

ZAMBRANO, E. et al. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex-and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. **J Physiol**, v. 571, n. Pt 1, p. 221-30, Feb 15 2006.

ZELCER, N.ETONTONNOZ, P. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. **J Clin Invest**, v. 116, n. 3, p. 607-14, 2006.

ZHANG, Y. et al. Insulin-like growth factor 1 alleviates high-fat diet-induced myocardial contractile dysfunction: role of insulin signaling and mitochondrial function. **Hypertension**, v. 59, n. 3, p. 680-93, Mar 2012.

ZHENG, J. et al. Maternal Low-Protein Diet Modulates Glucose Metabolism and Hepatic MicroRNAs Expression in the Early Life of Offspring dagger. **Nutrients**, v. 9, n. 3, Feb 27 2017.

ZHENG, S.; ROLLET, M.EPAN, Y. X. Protein restriction during gestation alters histone modifications at the glucose transporter 4 (GLUT4) promoter region and induces GLUT4

expression in skeletal muscle of female rat offspring. **J Nutr Biochem**, v. 23, n. 9, p. 1064-71, 2012.

ZHOU, L. Z.; JOHNSON, A. P.ERANDO, T. A. NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 11, p. 1405-16, Dec 1 2001.

ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270-273, Mar 2020.

ZHU, Z.; CAO, F.ELI, X. Epigenetic Programming and Fetal Metabolic Programming. **Frontiers in endocrinology**, v. 10, p. 764-764, 2019.

ZOHDI, V. et al. Developmental programming of cardiovascular disease following intrauterine growth restriction: findings utilising a rat model of maternal protein restriction. **Nutrients**, v. 7, n. 1, p. 119-52, Jan 2015.

ZOHDI, V. et al. Low Birth Weight due to Intrauterine Growth Restriction and/or Preterm Birth: Effects on Nephron Number and Long-Term Renal Health. **Int J Nephrol**, v. 2012, p. 136942, 2012.

ZOROV, D. B. et al. Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. **Cardiovasc Res**, v. 83, n. 2, p. 213-25, 2009.

ANEXO A - PARECER COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 05 de junho de 2019

Ofício nº 30/19

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

Para: **Prof. João Henrique da Costa Silva**

Centro Acadêmico de Vitória

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.046459/2018-17

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos de uma dieta em ácidos graxos saturados sobre a composição corporal, o metabolismo lipídico e a pressão arterial de ratos submetidos a desnutrição perinatal." registrado com o nº 23076.046459/2018-17 sob a responsabilidade de **Prof. João Henrique da Costa Silva** o 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 28/05/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	28/05/2019 a 01/04/2023
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogenico
Nº de animais	68
Peso/Idade	100g/ 30 dias
Sexo	Macho (56) Femea (12)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Departamento de Nutrição
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do CAV

Atenciosamente

