



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

ALEXSANDRO SILVA EMILIANO

**AVALIAÇÃO DA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E BALANÇO
OXIDATIVO NO HIPOTÁLAMO DE RATOS SUPERNUTRIDOS DURANTE A
LACTAÇÃO**

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
BACHARELADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA
NÚCLEO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E CIÊNCIAS DO ESPORTE

ALEXSANDRO SILVA EMILIANO

**AVALIAÇÃO DA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E BALANÇO
OXIDATIVO NO HIPOTÁLAMO DE RATOS SUPERNUTRIDOS DURANTE A
LACTAÇÃO**

TCC apresentado ao Curso de Educação Física da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Educação Física.

Orientadora: Claudia Jacques Lagranha

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2017

Catálogo na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca Setorial do CAV
Bibliotecária Jaciane Freire Santana- CRB-4/2018

E53a Emiliano, Alexsandro Silva.

Avaliação da bioenergética mitocondrial e balanço oxidativo no hipotálamo de ratos supernutridos durante a lactação / Alexsandro Silva Emiliano. - Vitória de Santo Antão, 2017.

35 folhas; il.

Orientadora: Claudia Jacques Lagranha

TCC (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Bacharelado em Educação Física, 2017.

Inclui referências e anexos.

1. Hipernutrição - Ratos. 2. Metabolismo animal - ratos. 3. Avaliação bioenergética - Ratos. I. Lagranha, Claudia Jacques (Orientadora). II. Título.

616.02733 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-136/2017

ALEXSANDRO SILVA EMILIANO

**AVALIAÇÃO DA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E BALANÇO
OXIDATIVO NO HIPOTÁLAMO DE RATOS SUPERNUTRIDOS DURANTE A
LACTAÇÃO**

TCC apresentado ao Curso de Educação Física da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Educação Física.

Aprovado em: 14/07/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr. Raquel da Silva Aragão
Universidade Federal de Pernambuco

Ms. Talitta Ricarilly Lopes de Arruda Lima
Universidade Federal de Pernambuco

Ms. Glauber Rudá Feitoza Braz
Universidade Federal de Pernambuco

Dedicatória

À toda minha família, em especial à minha avó Rita Maria, aos meus pais, Elineide e Edvaldo, e irmã, Mayara Emiliano; por sempre estarem ao meu lado quando mais precisei.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me guiou e continua sempre à frente dos meus passos, verdadeiro Pai que acolhe o seu filho e que realiza em minha vida todos os desejos que são de sua vontade.

À minha família, pelo amor, confiança e incentivo constante em todos os momentos; esteio da minha vida e responsável pela minha feliz trajetória.

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

Aos grandes docentes que me influenciaram bastante num amadurecimento profissional, partilhando os ensinamentos para me tornar um bom profissional.

Aos companheiros do Laboratório de Bioquímica Geral, Molecular e do Exercício, onde pude desenvolver o presente trabalho e tantos outros, construídos com dedicação e muita alegria. Em especial a minha orientadora Cláudia Lagranha e co-orientador Glauber Rudá.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro durante a execução deste trabalho.

RESUMO

Estudos têm sugerido que uma supernutrição em períodos precoces da vida ocasionam excesso de peso ou obesidade na vida adulta, desencadeando alterações metabólicas que levam ao surgimento de doenças crônicas não-transmissíveis, como diabetes e hipertensão. Entre essas alterações, encontram-se disfunções mitocondriais e desequilíbrio oxidativo. Entretanto, ainda há uma carência de estudos que associem o insulto da supernutrição neonatal sobre a bioenergética mitocondrial e estresse oxidativo no hipotálamo. O presente estudo analisou o efeito de uma supernutrição durante o período de lactação sobre a bioenergética mitocondrial e estresse oxidativo no hipotálamo de ratos wistar machos aos 60 dias de vida. Para induzir a supernutrição (Grupo supernutrido – GS) a prole foi reduzida para 3 neonatos por lactante três dias após o nascimento de acordo com estudos prévios (PLAGEMANN et al., 2009), e o grupo normonutrido (GN) foi mantido com 9 filhotes. Aos 60 dias de vida o hipotálamo foi coletado para as seguintes análises bioquímicas: capacidade funcional mitocondrial, consumo de oxigênio mitocondrial, potencial transmembrânico mitocondrial, peroxidação lipídica pelo método da quantificação do malondialdeído (MDA), avaliação das atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), grupamento tiois totais (sulfidrilas). Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM), e analisados pelo teste t-student, com significância de $p < 0,05$. Nossos resultados sugerem que uma supernutrição neonatal é capaz de induzir disfunção mitocondrial com elevação na produção de espécies reativas, bem como aumentar o dano a compostos lipídicos e à defesa antioxidante enzimática no hipotálamo.

Palavras Chaves: Supernutrição. Hipotálamo. Estresse oxidativo. Disfunção mitocondrial.

ABSTRACT

Studies have suggested that supernutrition in early life leads to overweight or obesity in adulthood, triggering metabolic changes that lead to the emergence of chronic noncommunicable diseases such as diabetes and hypertension. Among these changes are mitochondrial dysfunctions and oxidative imbalance. However, there is still a lack of studies that associate the insult of neonatal supernutrition on mitochondrial bioenergetics and oxidative stress in the hypothalamus. The present study analyzed the effect of supernutrition during the lactation period on mitochondrial bioenergetics and oxidative stress in the hypothalamus of male Wistar rats at 60 days of age. To induce supernutrition (supernutrition group - GS) offspring were reduced to 3 infants per infant three days after birth according to previous studies (PLAGEMANN et al., 2009), and the normonutrient group (GN) was maintained with 9 pups. At 60 days of life the hypothalamus was collected for the following biochemical analyzes: mitochondrial functional capacity, mitochondrial oxygen consumption, mitochondrial transmembrane potential, lipid peroxidation by the malondialdehyde quantification method (MDA), antioxidant enzyme activities superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), total thiois grouping (sulfhydryl). Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM), and analyzed by the t-student test, with significance of $p < 0.05$. Our results suggest that neonatal supernutrition is capable of inducing mitochondrial dysfunction with elevation in the production of reactive species, as well as increasing the damage to lipid compounds and the enzymatic antioxidant defense in the hypothalamus.

Keywords; Supernutrition. Hypothalamus. Oxidative stress. Mitochondrial dysfunction.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 BREVE REVISÃO DA LITERATURA.....	10
3 OBJETIVOS	13
4 METODOLOGIA.....	14
4.1 ANIMAIS E INDUÇÃO A SUPERNUTRIÇÃO	14
4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	14
4.2.1 Avaliação do peso corporal.....	14
4.2.2 Coleta do material biológico e processamento para análises bioquímicas...	15
4.2.3 Dosagem de proteína	15
4.2.4 Isolamento mitocondrial.....	15
4.2.5 Capacidade funcional da mitocôndria	15
4.2.6 Medida da Substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	16
4.2.7 Defesa antioxidante enzimática	17
4.2.8 Defesa antioxidante não-enzimática	17
4.2.9 Análise estatística.....	17
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL.....	19
5.2 AVALIAÇÃO DA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL	19
5.3 AVALIAÇÃO DO BALANÇO OXIDATIVO	21
6 CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27
ANEXO A – Comitê de Ética.	35

1 INTRODUÇÃO

Estudos evidenciam que durante o início da vida uma redução ou excesso de nutrientes definitivamente altera a modulação dos mecanismos hormonais e metabólicos, levando a um dano oxidativo em diversos tecidos (LAIGHT; VICENT, 1999). Alguns autores sustentam a afirmação que no início da vida o organismo é altamente sensível a mudanças na qualidade nutricional (TREVENZOLI et al., 2007; LAUSTSEN et al., 2007). Evidências clínicas e experimentais sugerem que o ambiente durante a infância tem um papel importante no surgimento de distúrbios metabólicos, hormonais e cardiovasculares a longo prazo (WATERLAND; GARZA, 1999; ANDERSON; COHEN; NAUMOVA, 2006).

A obesidade que é caracterizada pelo aumento no peso corporal que resulta em um acúmulo de gordura excessiva (SIKARIS, 2004), tem sido conhecido como um importante fator subjacente na patogênese de diversas doenças (ALBERTI; ZIMMET, 1998). Uma das prioridades atuais da Organização Mundial de Saúde (OMS) refere-se ao combate às doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Dados da OMS demonstram que, atualmente, mais de 1,4 bilhões de adultos estão com sobrepeso, dentre os quais 500 milhões são obesos, havendo mais de 40 milhões de crianças, abaixo dos cinco anos de idade, já com sobrepeso ou obesidade em 2013 (WHO, 2014).

Evidências derivadas de estudos clínicos tem relacionado a obesidade e estresse oxidativo, estabelecendo uma correlação entre biomarcadores de estresse oxidativo, peroxidação lipídica (malondialdeído) e proteínas carboniladas, com o índice de massa corporal (IMC), quanto maior o IMC maior os níveis de biomarcadores (VINCENT; TAYLOR, 2006; SANKHLA et al., 2012). As espécies reativas de oxigênio (EROs) estão envolvidas em várias funções fisiológicas e tem seus níveis regulados por elementos antioxidantes, dos quais destacam-se os enzimáticos. A diminuição destes e consequente aumento nos níveis de EROs, que em excesso são acumuladas nas mitocôndrias e no citoplasma causando danos oxidativos a componentes

celulares tais como lipídeos de membrana, proteínas e DNA estão diretamente relacionadas com diversas patologias (FERREIRA, 2013; BRAZ et al., 2015; BRAZ et al., 2017; BOSSY-WETZEL et al., 2004; GOLDEN; HINERFELD; MELOV, 2002; MELOV, 2004). O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicaís (CLARKSON; THOMPSON, 2000).

Um estresse oxidativo no hipotálamo, órgão que responsável por controlar a homeostase energética pode estar ligado a disfunção do controle homeostático do balanço energético, podendo contribuir assim com o grau de obesidade (HOCHBERG, 2010). O controle homeostático do balanço energético corporal é exercido por populações específicas de neurônios, que em última instância levam ao consumo de energia. Evidências crescentes sugerem que formas comuns de obesidade envolvem mudanças fundamentais no sistema homeostático favorecendo um elevado aumento da adiposidade corporal (VELLOSO; SANDE-LEE 2012; KIM et al., 2013; GAUR et al., 2014).

Estudos sugerem que a obesidade está relacionada com alterações mitocondriais com a excessiva produção de EROs, conduzindo ao desenvolvimento de diversas doenças relacionadas aos danos oxidativos como hipertensão e diabetes (BONNARD et al., 2008; MATSUDA, 2013). Concomitante, alterações como estresse metabólico intracelular no hipotálamo possivelmente podem está relacionadas com o desenvolvimento de obesidade (KIM et al., 2013; GAUR et al., 2014), visto que ele desempenha papel chave no controle alimentar (MORTON et al., 2014). Um dano a essa estrutura poderia ocasionar a desregulação do controle energético e, conseqüentemente, o acúmulo anormal de gordura corporal (HOCHBERG, 2010).

Tomados em conjunto, esses dados reforçam a necessidade de conhecer o efeito de uma supernutrição sobre o hipotálamo; estrutura reguladora central do balanço energético. Sendo assim, o presente estudo tem como pergunta condutora: Será que uma supernutrição no período de lactação podem causar uma disfunção mitocondrial e estresse oxidativo no hipotálamo?

2 BREVE REVISÃO DA LITERATURA

A obesidade do ponto de vista metabólico é um desequilíbrio entre a quantidade de energia (calorias) consumida na alimentação e a quantidade de energia gasta (dissipada). A manutenção do balanço energético é mantida através da relação entre ingestão calórica e dispêndio energético (SIKARIS, 2004). Tanto o desbalanço na ingestão de nutrientes como a composição corporal materna são condições adversas que resultam em alterações permanentes na estrutura, fisiologia e metabolismo da progênie durante o período crítico de desenvolvimento (SULLIVAN; GROVE, 2010; DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2001; DIETZ, 1994).

Evidências experimentais têm mostrado que uma supernutrição na infância induz sobrepeso, obesidade e doenças correlatas ao longo da vida adulta (PLAGEMANN et al., 1992; VOITS et al., 1996; PLAGEMANN, 2006; 2011). O controle homeostático do balanço energético corporal é processado no cérebro a partir de sinais da adiposidade e saciedade provenientes da periferia que modificam tanto as vias anabólicas como as catabólicas, e conseqüentemente, alteram o comportamento de ingestão alimentar de acordo com o requerimento energético (THALER; SCHWARTZ, 2010; ABIZAID; HORVATH, 2012; KEEN-RHINEHART et al., 2013). O hipotálamo, que corresponde a conjuntos de corpos de neurônios dispersos em uma rede de substância branca (conjunto de axônios), compreende um dos principais centros integradores dos sinais de saciedade ou de fome (MORTON et al., 2006).

Uma das principais regiões hipotalâmicas envolvida nesse controle alimentar é o núcleo arqueado, que está localizado numa região altamente vascularizada, imediatamente adjacente à eminência mediana, permitindo o acesso a vários fatores circulantes (CONE et al., 2001; RODRIGUEZ; BLAZQUEZ; GUERRA, 2010). Esse núcleo que possui uma população de neurônios onde é expresso o neuropeptídeo proopiomelanocortina (POMC), apresenta um papel importante no controle do balanço energético por vias serotoninérgicas. Além do POMC, outras populações de neurônios, tais como as que expressam o neuropeptídeo Y (NPY), modulam o fluxo simpático a

partir do hipotálamo para órgãos-alvo, como o tecido adiposo marrom (TAM), influenciando no metabolismo periférico dos triglicerídeos (BRITO et al., 2007; BRUINSTROOP et al., 2012; GEERLING et al., 2014).

O estresse oxidativo associado com obesidade altera a função de diferentes tipos celulares e teciduais, sendo um importante fator na indução de doenças metabólicas devido a peroxidação lipídica, que constitui uma reação em cadeia dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares, gerado pelos radicais livres que alteram a permeabilidade, fluidez e integridade das membranas (MAHATTANATAWEE, 2006; STAHL, 2001). Esses danos celulares, que se encontram aumentados nos indivíduos obesos, predispõem o organismo a diversas patologias tais como obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares e inúmeras desordens neurológicas (FERREIRA et al., 1997). Contudo, o estresse oxidativo difere entre os sistemas e tecidos, onde alguns apresentam maior susceptibilidade a este tipo de danos (CERETTA, 2012; MANSEGO, 2011).

Nesse contexto, destaca-se o cérebro que utiliza uma grande quantidade de oxigênio para produzir ATP, resultando em uma elevada susceptibilidade ao estresse oxidativo (GOLDEN et al., 2002; GOLDEN et al., 2001). Com isso, o estresse oxidativo intracelular é fortemente associado ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (LIN; BEAL, 2006) e ao envelhecimento cerebral (BISHOP; LU; YANKNER, 2010). Apesar de a exploração a este respeito ser bastante limitada, há evidências na literatura apoiando esta hipótese. A exemplo, a obesidade induzida por dieta hipercalórica mostrou induzir ativação de NADPH oxidase associada ao estresse oxidativo no cérebro de ratos (ZHANG et al., 2005), indicando que o estresse oxidativo cerebral poderia mediar a patogênese das doenças metabólicas relacionadas com a supernutrição metabólica.

A esse respeito, MA et al., 2014 identificaram dano oxidativo e disfunção mitocondrial no cérebro e no plasma de ratos induzidos a uma dieta hiperlipídica. Além disso, FURUKAWA et al., 2014 mostraram que a obesidade em camundongos ocasionou a redução na atividade de enzimas antioxidantes no tecido adiposo. Dessa forma, nota-se que alterações como estresse metabólico intracelular no hipotálamo podem estar diretamente relacionadas

com o desenvolvimento de obesidade (KIM et al., 2010; GAUR et al., 2014). Dessa forma podemos observar que mesmo com a crescente publicação sobre esse tema central supernutrição/obesidade, a disfunção mitocondrial e estresse oxidativo hipotalâmicos ainda não são tão elucidadas, é necessário mais estudos a respeito, associando principalmente o excesso de calorias durante a idade neonatal e suas repercussões tardias.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral: Avaliar o efeito de uma supernutrição durante o período de lactação sobre a bioenergética mitocondrial e estresse oxidativo no hipotálamo de ratos wistar machos aos 60 dias de vida.

Objetivos específicos

A) Avaliar o peso corporal de ratos normonutridos e supernutridos, aos 7, 14, 21, 30, 45 e 59 dias de vida;

B) Avaliar no hipotálamo de ratos normonutridos e supernutridos, aos 60 dias de vida:

I – Capacidade funcional das mitocôndrias:

1. Consumo de oxigênio mitocondrial;
2. Potencial transmembrânico mitocondrial;

II – A produção de espécies reativas derivados das mitocôndrias isoladas

III – Quantificação do balanço oxidativo:

1. Níveis de malondialdeído (MDA);
2. Atividade da Superóxido dismutase (SOD);
3. Atividade da Catalase (CAT);
4. Níveis de grupos tiois totais (Sulfidrilas).

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS E INDUÇÃO A SUPERNUTRIÇÃO

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. As fêmeas selecionadas (n=8) entre 150-180g foram abrigadas em biotério sob condições padrão de temperatura, iluminação e umidade, com água e comida (dieta Labina – Purina S/A) *ad libitum*. Foram promovidos períodos alternados e regulares de luz e escuridão (12/12 horas) e um período de adaptação de 15 dias para sincronizar o ciclo circadiano. Após a adaptação, as ratas quando em período estral, foram acasaladas na proporção 1 fêmea para 1 macho. Após a detecção da prenhez as ratas foram transferidas para gaiolas individuais e após o nascimento dos neonatos, os mesmos foram divididos em dois grupos experimentais, no qual o grupo supernutrido foi reduzido para 3 neonatos por lactante no terceiro dia, conforme as publicações do grupo de Plagemann (PLAGEMANN, 2006, 2011; PLAGEMANN et al., 1992, 1998), sendo: Grupo Supernutrido (S, n=3 por lactante) e Grupo Normonutrido (N, n=9 por lactante) A manipulação e os cuidados com os animais seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovação do Comitê de Ética em Estudos com Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco – Número do processo: 23076.017808/2014-51 (Anexo 1).

Após o desmame (21 dias de vida) os filhotes passaram a receber dieta comercial de laboratório (Presence; 74,5% de carboidratos, 23% de proteínas e 2,5% de lipídeos) e água *ad libitum*. Atingida a idade experimental (60 dias) os animais foram sacrificados.

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.2.1 Avaliação do peso corporal

O peso corporal dos ratos machos de ambos os grupos experimentais foram mensurados durante o período de lactação (3^o, 7^o, 14^o dia de vida) e

também no 21^o, 45^o e 59^o dia de vida. O peso foi registrado através de balança eletrônica digital (Marte, modelo S-100 com sensibilidade de 0.01g) (DA SILVA et al., 2014; DA SILVA et al., 2015).

4.2.2 Coleta do material biológico e processamento para análises bioquímicas

Aos 60 dias de vida os animais foram decapitados e o hipotálamo removido para as análises de estresse oxidativo; homogeneizando-o em tampão de extração (Tris base 100 mM, pH 7,5; EDTA 10 mM; NP 40 (0,1%) e coquetel de inibidores de protease). Para quantificação proteica e demais análises as amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm, a 4°C, por 5 minutos e somente o sobrenadante foi utilizado (DA SILVA et al., 2014).

4.2.3 Dosagem de proteína

A concentração de proteína da suspensão de cada tecido foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Este complexo absorve em comprimento de onda de 595 nm. A absorbância foi considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de albumina de soro bovino a 1% foi utilizada como padrão

4.2.4 Isolamento mitocondrial

Após a coleta, o hipotálamo foi imediatamente homogeneizado e as mitocôndrias isoladas por centrifugação diferencial conforme previamente publicado (LAGRANHA et al., 2010). As mitocôndrias foram isoladas e usadas para análise da capacidade funcional (consumo de oxigênio, potencial de membrana, e produção de ROS) após seu isolamento.

4.2.5 Capacidade funcional da mitocôndria

I. Medida do consumo de oxigênio: O consumo de oxigênio em suspensões de mitocôndrias isoladas foi realizado polarograficamente

utilizando-se um eletrodo tipo Clark. As suspensões foram mantidas em câmara de vidro fechada, termostalizada a 28°C e sob agitação constante, em meio de reação contendo KCl 120 mM, MOPS 5 mM, KH₂PO₄ 5 mM, EGTA 1 mM e BSA 0,2%, pH 7,2. (Liu et al., 2011);

II. Potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$): O $\Delta\Psi$ foi monitorado através da medida das alterações de fluorescência da safranina O na suspensão mitocondrial. A safranina O é um cátion lipofílico que é acumulado por mitocôndrias em quantidades proporcionais ao potencial de membrana. O acúmulo da safranina no microambiente mitocondrial promove uma diminuição da fluorescência global da suspensão (PHAM et al., 2014). As mitocôndrias foram adicionadas ao meio de reação a 37°C contendo KCl 130 mM, HEPES 10 mM, K₂HPO₄ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 30 μ M, pH 7,2, safranina O 5 μ M e substratos. O desacoplador CCCP (1 μ M) foi utilizado para despolarizar a membrana mitocondrial. A análise foi realizada nos comprimentos de onda de 495 nm (excitação) e 586 nm (emissão) no leitor de fluorescência FLUOStart (OMEGA, USA) (Liu et al., 2011);

III. Estimativa da produção de espécies reativas: A geração de espécies reativas (oxigênio e nitrogênio) foi monitorada por técnica fluorimétrica, usando o corante permeável a membrana H₂DCF-DA (diacetato de diclorodihidrofluoreceína, 5 μ M) em 488 nm de excitação e 525 nm de emissão no leitor de fluorescência FLUOStart (OMEGA, USA) (LIU et al., 2011).

4.2.6 Medida da Substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Para a dosagem de TBARS será utilizada a técnica colorimétrica de Buege e Aust (1978) para avaliar a lipoperoxidação. Colocou-se uma alíquota do homogenizado, de ácido tricloroacético a 10% e de ácido tiobarbitúrico 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 3000 xg 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 TBARS por mg de proteína.

4.2.7 Defesa antioxidante enzimática

I. Atividade enzimática: Superóxido dismutase (SOD): A atividade da SOD foi avaliada através do método de auto-oxidação da adrenalina, podendo ser medido em espectrofotômetro a 480nm. Em uma cubeta de quartzo de 1mL, adicionou-se tampão fosfato, amostra e adrenalina. A absorbância foi registrada por um período de aproximadamente 3 minutos. Os resultados foram expressos em Unidades por mg proteína (MISRA & FRIDOVICH, 1972).

II. Atividade enzimática: Catalase (CAT): A atividade da catalase foi medida através da avaliação do consumo de peróxido de hidrogênio pelo decréscimo na absorção a 240 nm ([] máx do H₂O₂) de um meio de reação, contendo tampão fosfato (pH=7,0) e H₂O₂. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína (AEBI, 1989).

4.2.8 Defesa antioxidante não-enzimática

Quantificação de grupos tiois totais (Sulfidrilas) Foi realizada através do incubamento à temperatura ambiente da amostra com 5,5dithiobis(2nitrobenzoie acid) (DTNB) 10 mM por trinta minutos, e posterior leitura a 412nm segundo (Ellman, 1959).

4.2.9 Análise estatística

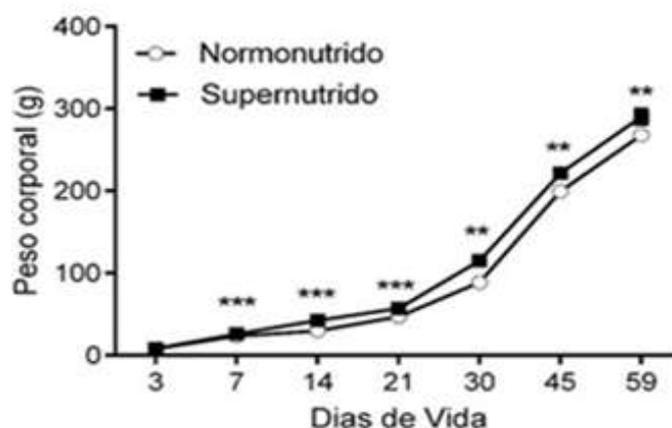
Todos os dados foram analisados segundo a normalidade da distribuição. Os dados que apresentaram-se dentro da distribuição gaussiana foram expressos em média e erro padrão da média (EPM). Estes dados foram analisados pelo teste t student para dados não pareados. Foi adotado o nível de

significância de $p < 0,05$ em todos os casos. A construção do banco de dados e as análises estatísticas foram desenvolvidas no programa Excel (versão 2007, Microsoft, USA) e Graphpad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), respectivamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL

Figura 1. Peso corporal de ratos dos grupos normonutrido e supernutrido.

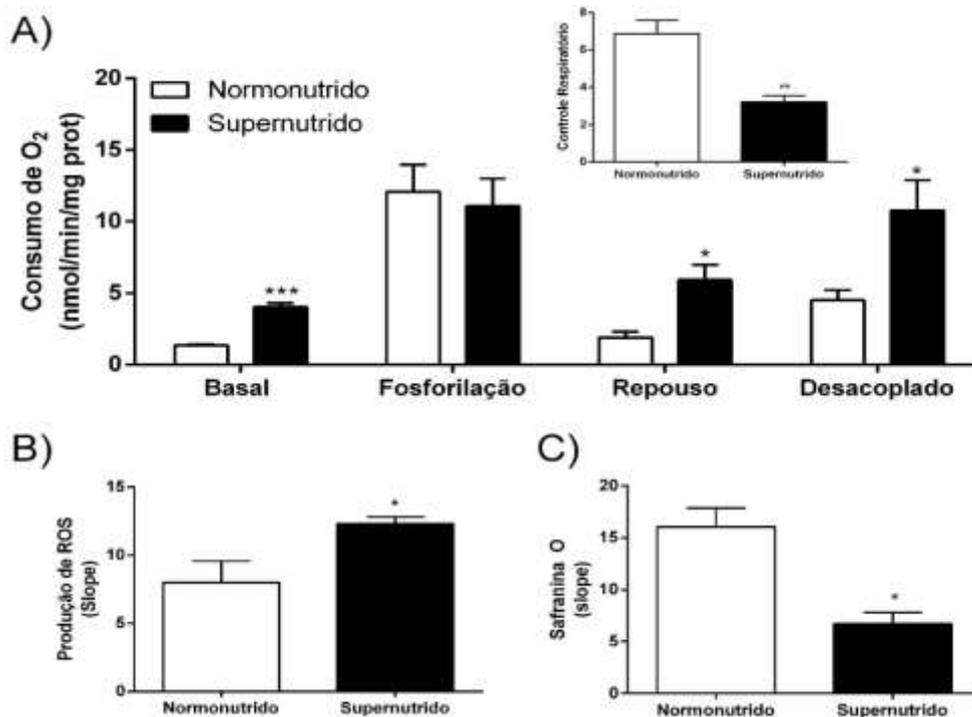


Dados expressos como média \pm erro padrão. N=6 por grupo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$,
*** $p < 0,001$.

Analisando o peso corporal dos animais, verifica-se que o grupo supernutrido apresentou um ganho significativo de peso em todas as idades analisadas, exceto no terceiro dia pós-natal – Figura 1 (Dia 7 – C:14,38 \pm 0,18 / S:18,67 \pm 0,33; $p=0,0001$ / Dia 14 – C:24,63 \pm 0,49 / S:31,33 \pm 0,33; $p=0,0001$ / Dia 21 – C:34,50 \pm 0,92 / S:42,33 \pm 0,33; $p=0,0008$ / Dia 30 – C:74,71 \pm 1,42 / S:84,33 \pm 1,20; $p=0,0036$ / Dia 45 – C:147,1 \pm 2,64 / S:172,7 \pm 5,84; $p=0,0016$ / Dia 59 – C:267,9 \pm 5,78 / S:290 \pm 8,07; $p=0,043$).

5.2 AVALIAÇÃO DA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL

Figura 2. Consumo de oxigênio (A), produção de espécies reativas mitocondriais (B) e potencial de membrana (C) no hipotálamo de ratos dos grupos normonutrido, supernutrido.



. Dados expressos como média \pm erro padrão. N=4-6 por grupo. *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001.

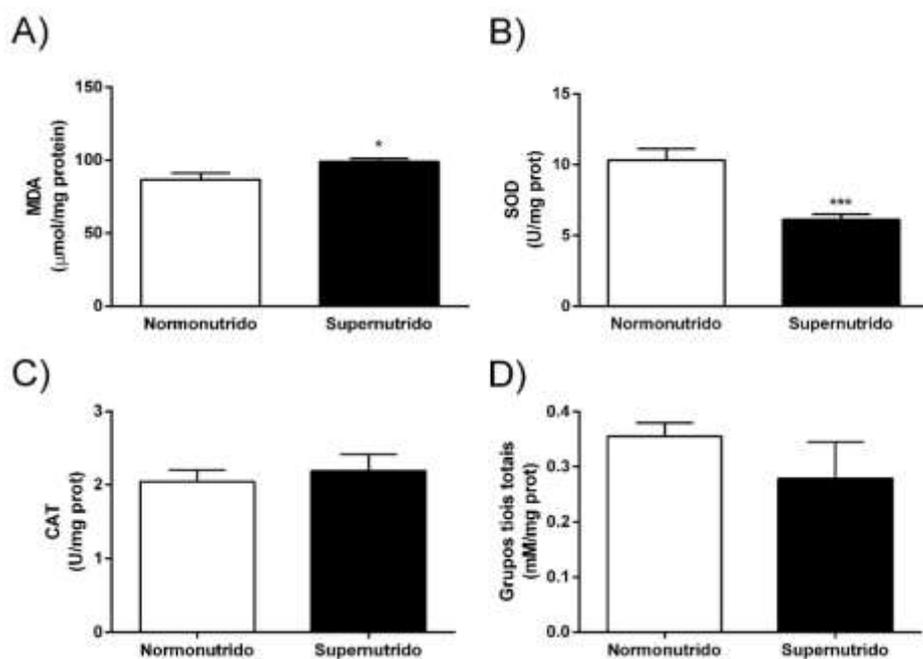
Ao analisar o consumo de oxigênio em mitocôndrias do hipotálamo de ratos supernutridos e normonutridos (Figura 2A), nota-se um aumento significativo no estado 2 (estado basal) com substratos específicos do complexo I, em comparação ao grupo normonutrido (N:1,34 \pm 0,10 vs S:4,73 \pm 0,74 nmol/min/mg prot; n=4-5, p=0,0001). O estado de fosforilação oxidativa ou estado 3 (estimulado por ADP) não diferiu entre os grupos (N:12,09 \pm 1,85 vs S:12,69 \pm 2,11 nmol/min/mg prot; n=4, p=0,722). Após a adição de Oligomicina, avaliamos o estado 4 (estado de repouso), onde o grupo supernutrido novamente obteve um maior consumo de oxigênio comparado ao grupo normonutrido (N:1,74 \pm 0,33 vs S:5,90 \pm 1,04 nmol/min/mg prot; n=5, p=0,011). O estado desacoplado, estimulado por CCCP, foi maior no grupo supernutrido em comparação ao grupo normonutrido (N:11,80 \pm 3,00 vs S:10,80 \pm 2,20 nmol/min/mg prot; n=5, p=0,031). O controle respiratório mostrou-

se diminuído no grupo supernutrado (N:6,78±0,71 vs S:3,24±0,39 prot; n=4-5, p=0,016).

A produção de espécies reativas mitocondriais no grupo supernutrado foi significativamente maior em relação ao grupo normonutrado (N:8,03±1,56 vs S:12,32±0,48 área sobre a curva; n=3-4, p=0,057), enquanto o potencial de membrana mitocondrial sofreu uma redução no grupo supernutrado quando comparado ao grupo normonutrado (N:16,06±1,81 vs S:6,72±1,09 área sobre a curva.; n=3-4, p=0,016).

5.3 AVALIAÇÃO DO BALANÇO OXIDATIVO

Figura 3. Resultados da peroxidação lipídica (A), da atividade das enzimas antioxidantes SOD (B) e catalase (C), e grupamentos tiois totais (D) no hipotálamo de ratos dos grupos normonutridos e supernutridos.



Dados expressos como média ± erro padrão. N=5-8 por grupo. *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001.

Em relação as análises de estresse oxidativo, nota-se um aumento significativo na peroxidação lipídica (Figura 2A) no grupo supernutrido em comparação ao grupo normonutrido (N:86,78±4,23 vs S:98,80±2,17 mmol/mg prot; n=4-5, p=0,030) e uma diminuição significativa na atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (Figura 2B) do grupo supernutrido em comparação ao grupo normonutrido (N:10,31±0,82 vs S:6,11±0,38 U/mg prot; n=5-6, p=0,0171). Não houve alteração significativa na atividade da enzima antioxidante catalase (N:2,043±0,16 vs S:2,19±0,20 U/mg prot; n=4-5, p=0,5906) bem como nos níveis de sulfidrilas (N:0,355±0,024 vs S:0,279±0,0654 U/mg prot; n=4, p=0,2743).

O presente estudo se propôs a investigar o efeito de uma supernutrição durante o período de lactação sobre a bioenergética mitocondrial e estresse oxidativo no hipotálamo de ratos machos adultos da linhagem Wistar. Analisando o peso corporal dos animais (Figura 1), verifica-se que o grupo supernutrido de fato apresentou um ganho significativo de peso após a indução da supernutrição, e essa diferença se manteve até o término do experimento. De acordo com alguns estudos o excesso de alimento é prejudicial, levando a alterações metabólicas. Entre as principais, destacam-se a presença de disfunção mitocondrial (BONNARD et al., 2008; HOLMSTROM et al., 2012; RITOV et al., 2010) e estresse oxidativo (FURUKAWA, 2004; KEANEY et al., 2003; CODONOER et al., 2010).

Sabe-se que as mitocôndrias desempenham um papel central no metabolismo energético, sendo que sua principal função é converter os macronutrientes, provenientes da dieta, em ATP (AW TY et al., 1989). Nesse sentido, pode-se afirmar que o adequado desempenho mitocondrial é de vital importância para as células (ROGGE, 2009). Ao analisar o consumo de oxigênio em mitocôndrias do hipotálamo de ratos supernutridos na lactação (Figura 2A), observou-se que a supernutrição foi capaz de aumentar significativamente o estado basal e de repouso, que estão muito associados a um maior desacoplamento da cadeia respiratória, assim como um aumento no estado de velocidade máxima da respiração mitocondrial (estado desacoplado). Na presença de desacoplamento mitocondrial, há um maior prejuízo à função mitocondrial, contribuindo, portanto para uma formação de espécies reativas de

oxigênio em excesso, também como consequência de um aumento da atividade da cadeia respiratória mitocondrial (COLOMBANI et al., 2009). Isso foi observado por exemplo, em um estudo realizado por Hai et al 2017, os animais induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica, apresentaram uma maior atividade mitocondrial dos complexos I e III em vários tecidos, como coração e fígado. Por serem as principais fontes de EROs mitocondriais essa atividade aumentada é fortemente associada a danos na cadeia respiratória (HAI et al., 2017). Analisando o controle respiratório mitocondrial, indicativo da qualidade funcional da mitocôndria, observamos que os animais supernutridos obtiveram uma redução de mais de 50% em relação aos animais normonutridos (FIGURA 2A). Apesar dessa grande relevância do metabolismo energético para as células, poucos estudos têm investigado essa disfunção no hipotálamo.

As EROs são conhecidas por afetar negativamente as membranas celulares, proteínas e DNA (HALLIWELL, 2007), nesse contexto, as mitocôndrias são altamente susceptíveis ao dano oxidativo. O comprometimento da cadeia respiratória mitocondrial leva a diminuição na produção de ATP em conjunto com o aumento na produção de EROs pela própria cadeia respiratória mitocondrial (LOPEZ et al., 2013; DI et al., 2010). O resultado disso é um ciclo que se repete, contribuindo também para o aumento da inflamação local. Nesse contexto, a integração entre esses processos pode causar dano celular no hipotálamo, centro regulador da homeostase energética corporal. Analisando os níveis de produção de espécies reativas de oxigênio nossos resultados mostraram que os animais supernutridos aumentaram significativamente a produção de EROs quando comparados com os normonutridos (Figura 2B). Demais estudos tem mostrado o efeito da dieta hiperlipídica sobre outras áreas cerebrais. A exemplo, MA et al., 2014, induziram obesidade em ratos, por meio do consumo de uma dieta hiperlipídica, por um período de 10 semanas, e identificaram elevada produção de EROs e disfunção mitocondrial no tecido cerebral desses animais (MA et al., 2014).

Pesquisas como a de Hai-Tao e colaboradores indicam que a dieta rica em gordura causa dano oxidativo em tecidos e células, o que acelera a ocorrência de apoptose, e causa a diminuição do potencial de membrana

mitocondrial provocando dano oxidativo a tecidos e mitocôndrias (HAI et al., 2017). Ao analisar o potencial de membrana (Figura 2C), nossos dados mostram que houve uma diminuição significativa no grupo supernutrido quando comparado ao normonutrido. Estando o potencial de membrana intimamente relacionado à produção de ATP, a diminuição nesse parâmetro pode ter levado a não alteração do estado de fosforilação oxidativa (estado 3) das mitocôndrias nos animais supernutridos, uma vez que, segundo (Dimroth et al., 2000), a taxa de síntese de ATP aumenta com o aumento no potencial de membrana mitocondrial.

No presente estudo, observou-se que a supernutrição no período crítico de desenvolvimento foi capaz de aumentar significativamente os níveis de peroxidação lipídica (Figura 3A). A peroxidação lipídica constitui uma reação em cadeia dos ácidos gordos polinsaturados das membranas celulares, gerando radicais livres que alteram a permeabilidade, fluidez e integridade da membrana (MAHATTANATAWEE, 2006; STAHL, 2001). Esses danos celulares, que se encontram aumentados nos indivíduos obesos, predispõem às co-morbidades como hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, eventos tromboembólicos, diabetes mellitus, além de neoplasias (FERREIRA, 2007; ALVES, 2011).

Alguns aspectos contribuem para vulnerabilidade do cérebro ao dano oxidativo como alta taxa metabólica e consumo de oxigênio, presença de ácidos graxos poli-insaturados que podem ser facilmente oxidáveis e elevado teor de metais no SNC, permitindo a geração de EROs, (GOLDEN et al., 2002; GOLDEN et al., 2001). O aumento de compostos oxidantes no cérebro é de grande preocupação, visto que a exposição crônica à ERO no cérebro pode causar grande dano nas membranas celulares, levando a perda da integridade e viabilidade celular (LASSMANN, 2011; SUN et al., 2010).

Em contraste à grande produção de EROs, o SNC dispõe de baixos níveis de enzimas antioxidantes, comparado à outros órgãos (HALLIWELL, 2006). Nesse contexto o insulto nutricional da supernutrição pode ter um efeito deletério em potencial que comprometa ainda mais o hipotálamo. No que se refere à atividade da SOD (Figura 3B), observamos uma diminuição

significativa na atividade da SOD, a qual atua como agente redutor e oxidante para formar $H_2O_2 + O_2$ (FLOHÉ; OTTING, 1984). Logo, quanto menor a atividade da SOD maior acúmulo de íon superóxido, podendo favorecer assim a formação de outras espécies reativas e indução do estresse oxidativo (MCCORD; FRIDOVICH, 1969; FERREIRA; LAGRANHA, 2013). No entanto no presente estudo, a supernutrição não causou alteração na atividade da enzima antioxidante CAT (Figura 3C) no hipotálamo. Possivelmente, essa não alteração da atividade da catalase seja devido a redução da atividade da SOD nos supernutridos quando comparados ao grupo controle, uma vez que a catalase tem como substrato o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) derivado da atividade da SOD, pela dismutação do íon superóxido (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; FERREIRA; LAGRANHA, 2013). Avaliando em sequência a defesa antioxidante não enzimática através dos níveis das sulfidrilas (Figura 3D), nossos dados mostram que nos animais supernutridos não houve uma diferença significativa, apenas uma tendência a diminuição na atividade das sulfidrilas, sem alterações significativas.

A disfunção mitocondrial e estresse oxidativo hipotalâmicos ainda são pouco elucidados, apresentando uma carência de respostas específicas. Tomados em conjunto, esses dados reforçam a necessidade de conhecer o efeito de uma supernutrição sobre o hipotálamo; estrutura reguladora central do balanço energético.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que uma supernutrição neonatal é capaz de induzir disfunção mitocondrial com elevação na produção de espécies reativas, bem como aumentar o dano a compostos lipídicos e à defesa antioxidante enzimática no hipotálamo. Tais achados sustentam o efeito deletério da supernutrição/obesidade sobre o hipotálamo, podendo ocasionar o comprometimento do balanço energético e aumentando a susceptibilidade para doenças metabólicas induzidas por disfunção mitocondrial. Apesar dos nossos resultados, acreditamos que mais estudos são necessários para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na disfunção hipotalâmica causada pela disfunção mitocondrial, bem como a relação dessas alterações com o acúmulo de gordura corporal.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** New York, Academic Press. v. 105, n.6, p.121, 1984; Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687984050163>> Acesso em: 09 jul. 2014;
- ABIZAID, A, HORVATH , T.L. Ghrelin and the central regulation of feeding and energy balance. **Indian J Endocr Metab.** Mumbai, v. 16, n. 3, p.617-26, 2012; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3602992/>>. Acesso em: 05 de mar. 2017;
- ANDERSON, S.E et al. Relationship of childhood behavior disorders to weight gain from childhood into adulthood. **Ambul. Pediatr.** Lawrence,KS, v. 6, n. 5, p. 297-301, 2006; Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1530156706001523>> Acesso em: 03 mar. 2017;
- AW TY, JJONES DP. Nutrient supply and mitochondrial function. **Annu Rev Nutr.** Palo Alto, Calif., v.9, p. 229-251, 1989; Disponível em : <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.nu.09.070189.00130>> Acesso em : 05 mai. 2017;
- BISHOP, N. A. et al. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. **Nature.** London, v. 464, n. 7288, p. 529-35, 25 mar. 2010; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2927852/>> Acesso em 02 fev. 2017;
- BONNARD, C. et al. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. **J Clin Invest.** New Haven, v.118, n. 2, p. 789-800, 2008; Disponível em; <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2176186/>> Acesso em; 02 jan. 2017;
- BOSSY-WETZEL, E. et al. Crosstalk between nitric oxide and zinc pathways to neuronal cell death involving mitochondrial dysfunction and p38-activated K⁺ channels. **Neuron.** Cambridge, v. 41, n. 3, p. 351-65, 5 fev. 2004; Disponível em : <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14766175>> Acesso em : 22 abr. 2017;
- BONNARD C. et al. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. **J Clin Invest.** New Haven, v.118, n.2, p.789-800, 2008; Disponível em; <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2176186/>> Acesso em; 13 jan. 2017;
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** San Diego, CA. v. 72, p. 24854, 1976; Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>>. Acesso em: 20 fev. 2015;

BRAZ G. R. F. et al. Neonatal SSRI exposure improves mitochondrial function and antioxidant defense in rat heart. **Applied Physiology Nutrition and Metabolism**, Cambridge. v. 41, p. 1-8, 2015; Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/284791144_Neonatal_SSRI_exposure_improves_mitochondrial_function_and_antioxidant_defense_in_rat_heart> Acesso em; 04 mai. 2017;

BRAZ. G. R. et al. Maternal low-protein diet in female rat heart: possible protective effect of estradiol. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, Cambridge. v. 8, p. 1-9, 2017; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28264755>>. Acesso em: 01 jun. 2017;

BRITO, M. N. et al. Differential activation of the sympathetic innervation of adipose tissues by melanocortin receptor stimulation. **Endocrinology**. v. 148, n. 11, p. 5339-47, 2007; Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/6136630_Differential_Activation_of_the_Sympathetic_Innervation_of_Adipose_Tissues_by_Melanocortin_Receptor_Stimulation> Acesso em: 24 abr. 2017;

BRUINSTROOP, E. et al. Hypothalamic neuropeptide Y (NPY) controls hepatic VLDL-triglyceride secretion in rats via 15 sympathetic nervous system. **Diabetes**. Los Angeles, Calif. v. 61, n. 5, p. 1043-50, 2012; Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/61/5/1043.short>>. Acesso em: 23 jan. 2017;

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, New York. v. 52, p. 302-10, 1978; Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687967100992>>. Acesso em: 20 fev. 2015;

CONE, R. D. et al. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. Hampshire, UK. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 25 Suppl 5, p. S63-7, 2001; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11840218>>. Acesso em: 23 abr. 2016;

DAVIDOWA H, PLAGEMANN A. Inhibition by insulin of hypothalamic VMN neurons in rats overweight due to postnatal overfeeding. **Neuroreport**, Oxford, UK. v.12, n.4, p.3201, 2001; Disponível em: <http://journals.lww.com/neuroreport/Abstract/2001/10290/Inhibition_by_insulin_of_hypothalamic_VMN_neurons.12.aspx>. Acesso em: 16 fev. 2017;

DA SILVA, A. I. et al. Effect of fluoxetine treatment on mitochondrial bioenergetic in central and peripheral rat tissues. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, Ottawa, ON. v. 40, n. 6, p. 565-74, 2015; Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/apnm-2014-0462#.WVf13YjvIU>>. Acesso em: 24 jun. 2017;

DA SILVA, A. I. et al. Fluoxetine treatment of rat neonates significantly reduces oxidative stress in the hippocampus and in behavioral indicators of anxiety later in postnatal life. **Can J Physiol Pharmacol**. Ottawa, ON. v. 92, n. 4, p. 330-

337, 2014; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24708216>>. Acesso em 03 abr. 2017;

DIETZ M.A. Dietary fats, fatty acids, and effects on lipoproteins. **Curr. Atheroscler.** Philadelphia, PA . Rep. 8, 466-71, 2006; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17045072>>. Acesso em: 05 mai. 2017;

DI FILIPPO M. et al. Mitochondria and the Link Between Neuroinflammation and Neurodegeneration. Amsterdam. **J Alzheimers Dis.** v.20, n. 2, p. 369-379. 2010; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4036420/>>. Acesso em: 23 mai. 2017;

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **A bioch and biophy.** New York, NY. v.82, n.1, p.70-7, 1959; Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003986159900906>>. Acesso em 07 jan. 2017;

FERREIRA ALA, MATSUBARA LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. São Paulo. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v.1 ,n. 43, p. 61-68, 1997; Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42301997000100014>. Acesso em: 09 mai. 2017;

FERREIRA, D. J. S.; LAGRANHA, C. J. Desequilíbrio oxidativo: um mecanismo bioquímico associado a desordens cardiovasculares induzidas no início da vida. São Paulo. **Neurobiologia**; v. 76, 2013;

FURUKAWA S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J Clin Invest.** New Haven. v. 114, n.12, p.1752-1761, 2004; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15599400>>. Acesso em: 07 jan. 2017;

GAUR A. et al. Role of Ventromedial hypothalamus in high fat diet induced obesity in male rats: association with lipid profile, thyroid profile and insulin resistance. **Ann Neurosci.** Lucknow. v. 21 n.3, p. 104-107, 2014; Disponível em : <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4158776/>>. Acesso em : 09 abr. 2017;

GEERLING, J. J. et al. Sympathetic nervous system control triglyceride metabolism: novel concepts derived from recent studies. **J Lipid Res**, United States. v. 55, n. 2, p. 180-9, 2014; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24285857>>. Acesso em: 24 mai. 2017;

GOLDEN, T. R. et al. Oxidative stress and aging: beyond correlation. **Aging cell**, Oxford, UK. v. 1, n. 2, p. 117-23, dez. 2002; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12882341>>. Acesso em: 03 dez. 2016;

GOLDEN, T. R.; MELOV, S. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and aging. **Mechanisms of ageing and development**, New York, NY. v. 122, n. 14, p. 1577-89, 30 set. 2001; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11511398>>. Acesso em: 17 mar. 2017;

HAI, T. Y. et al. Oxidative damage of mitochondrial respiratory chain in different organs of a rat model of diet-induced obesity. Darmstadt, Germany. **European Journal Of Nutrition** V.56, n.15, 1 de june de 2017; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28573457>>. Acesso em: 22 mai. 2017;

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?., **British Journal of Pharmacology**, London, Macmillian Journals Ltd. v. 142, p. 231–255, 2004; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15155533>>. Acesso em: 14 mai. 2017;

HALLIWELL B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J Neurochem**. New York. v. 97, n.6, p. 1634-1658, 2006; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16805774>>. Acesso em: 11 de jan. 2017;

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Free radicals in biology and medicine. v. 4, p. 689, New York: Oxford; 2007; Disponível em: <<https://www.journals.elsevier.com/free-radical-biology-and-medicine/>>. Acesso em 25 mai. 2017;

HOCHBERG I, HOCHBERG Z. Expanding the definition of hypothalamic obesity. **Obes Rev**. Oxford, UK. v. 11, n.10, p.709-721, 2010; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20233310>>. Acesso em: 27 abr. 2017;

KEEN- RHINEHART et al. Neuroendocrine regulation of appetitive ingestive behavior. **Neurosci**. Lausanne. v. 7 n. 213, 2013; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24298235>>. Acesso em: 17 jun. 2017;

KEANEY J.F. et al. D, et al. Obesity and systemic oxidative stress:clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. Dallas, TX. n. 23, p. 434-439, 2003; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615693>>. Acesso em: 13 jan. 2017;

KIM JH, CHOI JH. Pathophysiology and clinical characteristics of hypothalamic obesity in children and adolescents. **Ann Pediatr Endocrinol Metab**. Seoul, Korea. v. 18, n.4, p.161-167, 2013; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24904871>>. Acesso em: 27 mai. 2017;

LAGRANHA, C. J. et al. Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females **Circ Res**. Baltimore, Md. v. 106, n. 11, p. 1681-91, 2010; Disponível em : <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20413785>>. Acesso em : 22 abr. 2017;

LAIGHT, D. W. et al. F2- isoprostane evidence of oxidant stress in the insulin resistant, obese Zucker rat: effects of vitamin E. **Eur J Pharmacol**. Amsterdam, North Holland. v. 377, p. 89–92, 1999; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10448931>>. Acesso em: 22 mai. 2017;

LAUSTSEN, P. G. et al. Essential role of insulin and insulin-like growth factor 1 receptor signaling in cardiac development and function. **Mol Cell Biol**.

- Washington, DC. v. 27,1649-64. 2007; Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17189427>>. Acesso 13 jun. 2017;
- LASSMANN H. Mechanisms of neurodegeneration shared between multiple sclerosis and Alzheimer's disease. **J Neural Transm (Vienna)**. Wien, New York. n.5, p.747-752, 2011;
- LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**. Oxford. v. 443, n. 7113, p. 787-95, 19 out. 2006;
Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17051205>>. Acesso em:29 mai. 2017;
- LIU, Y. et al. Advanced glycation end products accelerate ischemia/reperfusion injury through receptor of advanced end product/nitrative thioredoxin inactivation in cardiac microvascular endothelial cells. **Antioxid Redox Signal**. Larchmont, NY. v. 15, n. 7, p. 1769-78, 2011;
- LOPEZ A.M.J et al.. Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response. **Mitochondrion**. Amsterdam, New York. v.13, n. 2, p.106-118, 2013;
Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23333405>>. Acesso em: 29 mai. 2017;
- MA W. et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in the brain of diet-induced obese rats but not in diet-resistant rats. **Life Sci**. Oxford; Elmsford, NY. v.2, n.110, p. 53-60, 2014; Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320514006274>>.
Acesso em: 14 mai. 2017;
- MATSUDA M, SHIMOMUR I. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. **Obes Res Clin**. Amsterdam, Elsevier. Pract.;7(5):330-341. 2013;
Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24455761>>. Acesso em: 2 abr. 2017;
- MAHATTANATAWE, K. et al. Total antioxidant activity and fiber content of select Flori-dagrown tropical fruits. **J. Agric. Food Chem**. Washington. v. 54, n. 12, 735563, 12, 2006; Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968105>>. Acesso em: 11 de fev. 2017;
- MISRA H.P; FRIDOVICH I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**. London, Nisbe. 247(10):3170-5, 1972; Disponível em:
<<http://www.jbc.org/content/247/10/3170.long>>. Acesso em: 13 jun 2017;
- MORTON G.J et al. Neurobiology of food intake in health and disease. **Nat Rev Neurosci**. London, Uk. ;15(6):367-378. 2013; Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24840801>>. Acesso em 13 jun. 2017;
- MORTON, G. J. et al. Central nervous system control of food intake and body

weight. **Nature**, London. v. 443, n. 7109, p. 289-95, 21 set. 2006;

OGUNBODE A.M. et al. Obesity: An emerging disease. **Journal clinica practice**. Mumbai. Oct-Dec; v.14, n.4, p.390-4, 2011; Disponível em : <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22248935>>. Acesso em; 28 mai. 2017;

PARTON L.E. et al. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. **Nature**. London. v. 449, n. 7159, p. 228-232, 2007;

PHAM, T. et al. Mitochondrial inefficiencies and anoxic ATP hydrolysis capacities in diabetic rat heart. **Am J Physiol Cell Physiol**. Bethesda, Md. v. 307, n. 6, p. C499-507, 2014; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24920675>>. Acesso em: 30 mai. 2017;

PLAGEMANN, A. Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. **Horm Res**. Basel, New York, Karger. v. 65 Suppl 3, p. 83-9, 2006; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16612119>>. Acesso em: 11 jan. 2017;

PLAGEMANN, A. et al. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. **Exp Clin Endocrinol**. Leipzig . v. 99, n. 3, p. 154-8, 1992; Disponível em : <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1526266>>. Acesso em : 27 mai. 2017;

PLAGEMANN, A. et al. Alterations of hypothalamic catecholamines in the newborn offspring of gestational diabetic mother rats. **Brain Res Dev Brain Res**. Amsterdam. v.109, n. 2, p. 201-9, 1998; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9729385>>. Acesso em: 19 fev. 2017;

RODRIGUEZ H. et al. Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. **Int J Endocrinol**. Cairo, Egypt. V.11, n.1, 2013;

ROGGE MM. The role of impaired mitochondrial lipid oxidation in obesity. **Biol Res Nurs**. Thousand Oaks, CA. v,10, n.4, p, 356-373, 2009;

RITOV V.B. et al. Deficiency of electron transport chain in human skeletal muscle mitochondria in type 2 diabetes mellitus and obesity. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. Bethesda, MD. V. 298, n.1, p. 49-58, 2010; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19887598>>. Acesso em: 20 jan. 2017;

SANKHLA M. et al. Relationship of oxidative stress with obesity and its role in obesity induced metabolic syndrome. **Clin Lab**. Heidelberg. v.58, n. 5-6, p. 385-392, 2012; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22783566>>. Acesso em: 17 abr. 2017;

STAHL, W et al. Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: Tocopherols and carotenoids. **J Chromatogr**. Oxford. v. 936, p. 83-93, 2001;

SIKARIS, K. The clinical biochemistry of obesity. **Clin.Biochem.Rev**. Chippendale. v. 25, 165-81, 2004; Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1880830/>>. Acesso em 24 jun. 2017;

SULLIVAN EL and GROVE KL. Metabolic Imprinting of Obesity. **Forum Nutr.** Basel, New York. v. 63, p. 186–194, 2010; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3255478/>>. Acesso em: 28 abr. 2017;

SUN AY, Et al Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. **Mol Neurobiol.** Clifton, NJ. v.41, n.2, p.375-383, 2010; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20306310>>. Acesso em: 14 jun. 2017;

THALER, J. P.; SCHWARTZ, M. W. Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. **Endocrinology.** Los Angeles. v. 151, n. 9, p. 4109-15, set. 2010; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20573720>>. Acesso em: 19 abr. 2017;

TREVENZOLI, I.H. et al. Neonatal hyperleptinaemiaprogrammes adrenal medullary function in adult rats: effects on cardiovascular parameters. **J. Physiol.** London. v. 580, n. 2, p. 629-37, 2007;

VELLOSO L.A, SANDE-LEE S.V. Disfunção hipotalâmica na obesidade. **Arq Bras Endocrinol Metab.** São Paulo, SP. V. 56, n. 6, 2012; Disponível em : <<http://www.scielo.br/pdf/abem/v56n6/01.pdf>>. Acesso em : 10 fev. 2017;

VINCENT, H. K. et al. Obesity is associated with increased myocardial oxidative stress. **Int Obes. Relat. Metab. Disord.** Hampshire, UK . v.23, n. 1, p.67–74, 1999; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10094579>>. Acesso em 11 mai. 2017;

VINCENT H.K, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. **Int J Obes** London. 2006;30(3):400-418; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16302012>>. Acesso em: 27 jun. 2017;

WATERLAND, R. A. GARZA, C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. **Am. J. Clin. Nutr.** Bethesda, Md. v. 69, n. 2, p. 179-97, 1999; Disponível em : <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9989679>>. Acesso em : 26 fev. 2017;

YE J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. **Front Med.** Beijing . v. 7, n.1, p.14-24, 2013; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23471659>>. Acesso em: 14 mai. 2017;

ZHANG, X. et al. High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. **Experimental neurology,** New York. v. 191, n. 2, p. 318-25, fev. 2005; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15649487>>. Acesso em: 30 mai. 2017;

ZHANG, X. et al. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. **Cell**. Cambridge, MIT Press. v. 135, n. 1, p. 61-73, 3 out. 2008; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18854155>>. Acesso em: 13 de fev. 2017;

ANEXO A – Comitê de Ética.



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

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

Recife, 9 de outubro de 2014.

Ofício nº 56/14

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: **Prof. Claudia Jacques Lagranha**
 Centro Acadêmico de Vitória - CAV
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 23076.017808/2014-51

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Estudo da programação fetal de doenças metabólicas da vida adulta nos tecidos vitais: Avaliação dos efeitos da supernutrição”**.

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

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

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

Origem dos animais: Biotério; Animal: ratos; Linhagem: Wistar;
 Idade: Progenitores adultos e prole após desmame e adulta;
 Peso: Após desmame: 30 – 90g; Sexo: machos e fêmeas;
 Número total de animais previsto no protocolo: 92.

Atenciosamente,

Prof. Marcia Vasconcelos
 Vice-Presidente do CEUA/CCB-UFPE
 SIAPE 2199835

CCB: Integrar para desenvolver