

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
CURSO DE BACHARELADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA**

REGINALDO CORREIA DA SILVA FILHO

**AVALIAÇÃO DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE MITOCÔNDRIAS
HEPÁTICAS DE RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTEICA
PERINATAL**

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
CURSO DE BACHARELADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA**

REGINALDO CORREIA DA SILVA FILHO

**AVALIAÇÃO DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE MITOCÔNDRIAS
HEPÁTICAS DE RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTEICA
PERINATAL**

TCC apresentado ao Curso de Bacharelado
em Educação Física como requisito para
Conclusão do Curso de Bacharel em
Educação Física

ORIENTADORA: PROF. DR. MARIANA PINHEIRO FERNANDES

COORIENTADORA: PROF. DR. CLAUDIA JACQUES LAGRANHA

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2014

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Lúcia Feliciano dos Santos, CRB4: 2005

S586a Silva Filho, Reginaldo Correia da.
Avaliação do metabolismo energético de mitocôndrias hepáticas de ratos submetidos à desnutrição proteica perinatal. / Reginaldo Correia da Silva Filho. Vitória de Santo Antão, 2014.
52 folhas: il.; fig., tab.

Orientadora: Mariana Pinheiro Fernandes
Coorientadora: Claudia Jacques Lagranha

TCC (Graduação) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Bacharelado em Educação Física, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Desnutrição Proteica. 2. Metabolismo Energético. 3. Mitocôndrias Hepáticas. I. Fernandes, Mariana Pinheiro (Orientadora). II. Lagranha, Claudia Jacques (Coorientadora). III. Título.

616.39 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-024/2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

Banca examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso

Reginaldo Correia da Silva Filho

Orientadora: Prof(a) Dr(a) Mariana Pinheiro Fernandes

Coorientadora: Prof(a) Dr(a) Claudia Jacques Lagranha

MEMBROS:

-
1. Prof(a) Dr(a) Mariana Pinheiro Fernandes

 2. Prof(a) Dr(a) Claudia Jacques Lagranha

 3. Prof(a) Dr(a) Ary Gomes Filho

Data: 25 de julho de 2014.

Curso de Bacharelado em Educação Física do Centro Acadêmico de Vitória da
Universidade Federal de Pernambuco.

*À minha mãe, **Maurizete Gomes**,
por sempre se fazer presente e
lutar para que eu pudesse ter
oportunidades.*

*“A mente que se abre a uma nova
idéia jamais voltará a seu tamanho
original.”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos José Augusto, Jocilene, Joelma, e minha mãe, Maurizete Gomes, que me deu as melhores oportunidades mesmo em momentos de grandes dificuldades. Obrigado por me mostrar que desafios são para serem vencidos.

Às Prof. Dras. Mariana Pinheiro Fernandes e Claudia Jacques Lagranha que me estenderam a mão e depositaram confiança sempre. Obrigado por fazerem de mim um profissional capaz. Obrigado por serem minha base e acima de tudo obrigado pela amizade. Vocês sempre serão as melhores referências.

Aos amigos José Atil da Silva e Nilzete de Oliveira que desde o início acompanharam meu desenvolvimento e sempre me acolheram em sua casa para que eu pudesse realizar este trabalho. Minha eterna gratidão.

Às amigas Luciana, Cristiane e Alessandra que foram as primeiras a iniciar esta jornada comigo. Aprendemos muito juntos, foi tudo muito intenso.

Aos novos que chegaram e fazem parte do grupo e também contribuíram: Anderson, Talitta, Rudá, Vitória, Aiany, Diórginis, David, Maísa, Cássia, Érica, Priscilla, Giseli e Shirley.

Aos amigos Ramon e Yuri Uei que já fizeram parte do laboratório e são parceiros.

Ao professor René que nos acolheu em seu laboratório permitindo que fizéssemos nossos trabalhos.

Ao Prof. Dr. João Henrique e seus alunos Viviane e José Luiz, que ajudaram muito ensinando a manipular animais de laboratório e sempre que necessário.

À Prof. Dra. Ana Catarina Rezende Leite pelos ensinamentos e pelas colaborações sem as quais não teria concluído meus experimentos. Muito obrigado pela amizade e assistência, experimentos com você sempre são divertidos.

Ao amigo João Arthur por sua assistência em Maceió. Torço muito por seu crescimento.

À Prof. Dra Carol Góis Leandro por sempre acreditar em minha capacidade e por suas palavras de motivação que foram fundamentais.

Aos professores do núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte que sempre serão queridos. Obrigado pela força, Ary, Marcelus, Iberê e Marco.

A minha turma de 2010.2, vocês são únicos de uma forma especial.

RESUMO

O moderno estilo de vida tem contribuído para o aumento de doenças crônico-degenerativas na vida adulta. Sabe-se, porém, que este é um fator que se reflete desde a infância. Estudos já apontam que crianças desnutridas são mais propensas a desenvolverem obesidade e doenças correlatas na vida adulta devido a alterações metabólicas. Nos últimos 50 anos as mitocôndrias têm emergido como fonte de sinalização, injúria e morte celular, no entanto os mecanismos relacionados à desnutrição, disfunção mitocondrial e o risco de doenças crônicas na vida adulta ainda são escassos. O presente estudo teve como objetivo verificar como a restrição proteica durante o período crítico do desenvolvimento (gestação e lactação) afeta o metabolismo energético de mitocôndrias hepáticas de ratos jovens. Fêmeas foram divididas em dois grupos de acordo com a dieta. Grupo controle (caseína a 17% durante o período de gestação e lactação) e um grupo desnutrido (caseína a 8% durante o mesmo período). Após esse período, os animais machos de cada grupo receberam dieta de laboratório (Labina-Purina®). Aos 30 dias de vida, os animais de ambos os grupos foram sacrificados, o fígado imediatamente removido e as mitocôndrias isoladas. Avaliamos o controle respiratório (n=5), velocidade de fosforilação (Estado 3) (n=5), velocidade de repouso (Estado 4) (n=5) e velocidade de respiração no estado desacoplado (n=5), inchamento mitocondrial (n=5), potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (n=3), produção de espécies reativas (ER) (n=5) e captação de cálcio (n=3). A análise estatística foi realizada através do teste "t" de *Student* não pareado. Nossos resultados mostraram uma diminuição de 27,53% no estado 3 ($p<0.05$) e diminuição de 39,44% do controle respiratório ($p<0.05$) no grupo desnutrido quando comparado com o grupo controle. O grupo desnutrido também mostrou uma menor capacidade de manutenção do $\Delta\Psi_m$ (Controle: 6,235 min \pm 0,1366 vs Desnutrido: 2,117 min \pm 0,6868, $p<0,05$) e aumento na produção de ER de ≈ 3 vezes ($p<0,05$), sensível a EGTA (quelante de cálcio). Também foi possível observar um significativo inchamento mitocondrial (Controle: 1,03 \pm 0,08 vs Desnutrido: 0,52 \pm 0,08, $p<0,05$) e menor capacidade de retenção de cálcio, no grupo desnutrido em relação ao controle (Controle: 10,7 \pm 0,85 min vs Desnutrido: 5,81 \pm 0,72 min) ($p<0,05$). Estes efeitos foram sensíveis a ciclosporina A, um inibidor clássico do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. Nossos dados sugerem que a restrição proteica perinatal induz transição de permeabilidade mitocondrial de forma que diminui o controle respiratório e estimula a produção de espécies reativas em fígado de ratos jovens.

Palavras-chaves: Desnutrição Proteica, Metabolismo Energético, Mitocôndrias Hepáticas

ABSTRACT

The modern lifestyle has contributed to the increase of chronic diseases in adulthood. It is known, that this is a factor modulated since childhood. Studies had shown that low birthweight childrens are more prone to develop obesity and related diseases in adulthood due to metabolic changes. Over the past 50 years mitochondria studies have emerged as a source of signaling, injury and cell death, however the mechanisms related to undernutrition, mitochondrial dysfunction and diseases risk in adulthood are not will now. The present study aimed to determine how the protein restriction during the critical period of development (pregnancy and lactation) affects energy metabolism of liver mitochondria from juvenile rats. Mothers were divided into two groups according to the diet. Control group (17% casein during pregnancy and lactation) and a undernutrition group (casein 8% during the same period).After experimental period, the male pups from each group received communal diet (Labina-Purina ®). At 30 days of life, the animals from both groups were sacrificed, the liver immediately removed and isolated mitochondria. We evaluated the respiratory control ratio (n=5), rate phosphorylation (State 3) (n=5) rate of respiration resting (state 4) (n=5) and rate of respiration in the uncoupled state (n=5), mitochondrial swelling (n=5), mitochondrial membrane electric potential ($\Delta\Psi_m$) (n=3), production of reactive species (RS) (n=5) and calcium uptake (n=3).Statistical analysis was performed using Student t-test. Our results showed a decrease in state 3 (27.53%, $p < 0.05$) and decrease in respiratory control ratio (39.44%, $p < 0.05$) of the undernutrition group compared with the control group. The undernutrition group also showed a lower capacity to maintain $\Delta\Psi_m$ (Control: 6.235 ± 0.1366 min vs Undernutrition: $2,117$ min ± 0.6868 , $p < 0.05$) and increased RS production of ~3 times ($p < 0,05$), sensitive to EGTA (calcium chelator).We also observed a significant mitochondrial swelling(Control: 1.03 ± 0.08 vs Undernutrition: 0.52 ± 0.08 , $p < 0.05$) and lower calcium retention capacity in the Undernutrition group compared to control (Control: 10.7 ± 0.85 min vs Undernutrition: 5.81 ± 0.72 min, $p < 0.05$). These effects were sensitive to cyclosporin A, an inhibitor of the classical mitochondrial transition pore permeability. Our data suggest that perinatal protein restriction induces mitochondrial permeability transition in a way that decreases the respiration capacities and stimulates the production of reactive species in the liver mitochondria from juvenile rats. **Key-words: Undernutrition Protein, Metabolisms Energetics, Liver Mitochondrias**

LISTA DE ABREVIATURAS

AT(D)P – adenosina tri (di) – fosfato

Ca²⁺ – cálcio

CCCP – carbonyl cyanide p-(Trifluoromethoxy) hydrazone

CsA – ciclosporina A

CTE – cadeia de transporte de elétrons

EGTA – etileno glico – bis(b-aminoetil éter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético

EROs – espécies reativas de oxigênio

FADH₂ – flavina adenina dinucleotídeo reduzido

Fe²⁺ – ferro

H₂DCF-DA - diacetato de diclorodihidrofluoresceína

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HEPES – (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])

K⁺ – Potássio

Mg – Magnésio

MFR – mitocôndria de fígado de rato

MnSOD – Mn–superóxido dismutase

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado reduzido)

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)

NAD⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado oxidado)

NADP⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado oxidado)

Pi – fosfato inorgânico

PTPM – poro de transição de permeabilidade mitocondrial

NO⁻ – óxido nítrico

O₂^{•-} – ânion superóxido

OH⁻ – radical hidroxil

TPM – transição de permeabilidade mitocondrial

ΔΨ_m – potencial elétrico de membrana mitocondrial

ΔΨ – potencial elétrico de membrana

ΔpH – gradiente químico de prótons

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO	PÁG.
Figura 1: Anatomia bioquímica de uma mitocôndria	18
Figura 2: Cadeia respiratória mitocondrial e teoria quimiosmótica	20
Figura 3: Modelo proposto para explicar a formação do poro de transição de permeabilidade induzido por Ca^{2+} e EROs na membrana mitocondrial interna	22
 MATERIAIS E MÉTODOS	
Figura 4: Inchamento mitocondrial	28
 RESULTADOS	
Fig. 5: Avaliação do consumo de oxigênio de mitocôndrias hepáticas	30
Fig. 6: Parâmetros respiratórios de mitocôndrias hepáticas	31
Fig. 7: Efeito da desnutrição perinatal no controle respiratório de mitocôndrias hepáticas	32
Fig. 8: Efeito da desnutrição perinatal no inchamento de mitocôndrias hepáticas na presença de cálcio	33
Fig. 9: Avaliação da estimativa do potencial elétrico de membrana mitocondrial de fígado de ratos	35
Fig. 10: Efeito da desnutrição perinatal na geração de espécies reativas em mitocôndrias de fígado de rato	36
Fig. 11: Capacidade de retenção de Ca^{2+} em mitocôndrias de fígado de ratos	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Plasticidade fenotípica e nutrição.....	16
2.2 Restrição proteica e disfunção hepática.....	17
2.3 Mitocôndrias.....	18
2.4 Teoria quimiosmótica de Mitchell: transporte de elétrons e fosforilação oxidativa.....	19
2.5 Espécies reativas de oxigênio (EROs), homeostase do cálcio e transição de permeabilidade mitocondrial.....	21
3 OBJETIVOS.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
6 CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Neste trabalho foi realizado um estudo que avaliou como uma dieta com restrição de proteína ofertada a animais durante o período crítico do desenvolvimento (gestação e lactação) pode influenciar na bioenergética mitocondrial hepática. Esta pesquisa teve como objetivo entender quais os mecanismos bioquímicos envolvidos na plasticidade decorrente de um insulto nutricional e suas repercussões na função mitocondrial hepática em ratos jovens. Para justificar a proposta desse trabalho será apresentada uma introdução sobre a temática, seguida de uma revisão literária e posteriormente os procedimentos envolvidos nas análises, assim como os resultados encontrados.

Uma das atuais prioridades da Organização Mundial de Saúde refere-se ao combate às doenças crônico-degenerativas. Esta inclui como estratégia, alimentação adequada e mudanças do estilo de vida, as quais devem ser priorizadas desde o início da vida. Evidências epidemiológicas têm mostrado que a deficiência nutricional na infância acompanhada de supernutrição, *a posteriori*, aumentam o risco de obesidade e doenças correlatas (hipertensão, diabetes tipo II, dislipidemias, hiperinsulinemia) na idade adulta (BARKER E OSMOND, 1986; SAWAYA, 1995; BARKER, 1999).

A evolução do estado nutricional da população brasileira passou por um processo de transição nas últimas décadas (FILHO E RISSIN, 2003). Verificou-se um declínio da prevalência de desnutrição infantil e elevação da prevalência de sobrepeso/obesidade em adultos. Neste contexto, parece acontecer um paradoxo entre desnutrição e sobrepeso/obesidade. A desnutrição vem sendo apontada como um dos principais fatores não genéticos implicados na etiologia de doenças metabólicas associadas à obesidade (BARKER, 2007). O mecanismo subjacente parece estar associado aos efeitos irreversíveis da desnutrição no período crítico do desenvolvimento alterando o padrão de eventos celulares, com consequências deletérias tanto na aquisição de padrões fisiológicos maduros do organismo quanto para a ocorrência de eventos metabólicos (LUCAS, 2000).

No Brasil, estudos epidemiológicos demonstraram a estreita relação entre distúrbios nutricionais no período perinatal e desenvolvimento de doenças na fase adulta (SAWAYA *et al.*, 2003). Na região nordeste do Brasil, este quadro é particularmente preocupante visto a prevalência elevada de desnutrição e anemia em períodos precoces da vida, e de síndrome metabólica na vida adulta. Os dados

da III Pesquisa Estadual de Saúde e Nutrição – IIIPESN/2006, Estado de Pernambuco, apontam 8,7% de prevalência de baixo “peso ao nascer” em crianças menores de cinco anos. O peso insuficiente (2500 a 3000g) teve prevalência de 21,7% na Região Metropolitana do Recife. O fato mais preocupante, todavia, refere às repercussões desse quadro de desnutrição na infância e o aparecimento de doenças prevalentes na vida adulta.

Os estudos experimentais com animais fornecem suporte importante no entendimento dos mecanismos associados ao fenômeno da programação de doenças metabólicas (OZANNE, 2001; BONOMO *et al.*, 2008). Um recente estudo do nosso grupo de pesquisa, realizado no Centro Acadêmico de Vitória da UFPE, mostrou que uma restrição protéica perinatal altera a função mitocondrial, com aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuição na atividade de enzimas antioxidantes resultando num desbalanço oxidativo em coração de ratos adultos (NASCIMENTO *et al.*, 2014). Outro estudo do nosso núcleo, utilizando o mesmo modelo experimental, revelou que ratos adultos aos 90 dias de vida, filhos de ratas que receberam dieta com baixo teor de proteína, durante o período perinatal, apresentaram um significativo aumento de pressão arterial (DE BRITO ALVES *et al.*, 2013).

Apesar de alguns estudos epidemiológicos mostrarem a relação entre programação fetal e doenças crônico-degenerativas, pouco se sabe dos mecanismos bioquímicos e moleculares indutores dessas doenças. É interessante observar que as alterações no metabolismo hepático induzidas pela desnutrição ocorrem antes mesmo do que é visto no tecido adiposo e no músculo esquelético. O fígado é o órgão central no metabolismo dos carboidratos e lipídeos, atuando como sensor inicial de nutrientes. O fígado de ratos adultos aos três meses de idade, cujas mães sofreram desnutrição gestacional, apresenta aumento no tamanho dos lóbulos (COTTRELL, *et al.*, 2008).

Em relação à função mitocondrial, a literatura tem demonstrado prejuízo da fosforilação oxidativa em músculos esqueléticos de ratos que apresentaram um retardo no crescimento intra-uterino (SELAK *et al.*, 2003). Foi observada uma elevada peroxidação lipídica no plasma e vários tecidos de ratos de 13 dias de vida, refletindo numa elevada produção de espécies reativas de oxigênio (JENKINS *et al.*, 1984). Também foram observadas mudanças na atividade de enzimas antioxidantes no coração de ratos entre 6 e 48 semanas de idade (GUPTA *et al.*, 1989). Foi

demonstrado que mal nutrição proteica durante a gestação e lactação causou diminuição nos níveis de DNAmT de fígado e músculo esquelético na vida adulta, no entanto os mecanismos mediadores dessas mudanças ainda não foram elucidados (PARK et al., 2003). A avaliação da função mitocondrial, em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos, possibilitará uma melhor compreensão dos efeitos de uma restrição protéica perinatal no metabolismo energético hepático.

Dessa forma, o intuito do presente estudo é verificar a associação entre disfunção mitocondrial hepática induzida pela desnutrição com o aparecimento e a progressão das doenças crônico-degenerativas associadas à programação nutricional no período perinatal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Plasticidade Fenotípica e Nutrição

A plasticidade fenotípica pode ser entendida como um fenômeno que ocorre durante as fases de desenvolvimento de um indivíduo onde certas condições específicas podem gerar resultados em fases posteriores da vida. Condições como a desnutrição materna, diabetes gestacional e obesidade durante a gestação e lactação são fatores que podem contribuir para o surgimento da obesidade na prole decorrente de alterações metabólicas (LEVIN, 2006).

Um dos conceitos utilizados para definir tais eventos é o DOHAD - Developmental origins of health and disease (Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença). Este conceito tem como base a suposição de que fatores ambientais atuam no início da vida (geralmente na vida fetal) causando graves efeitos que pode predispor o indivíduo a desenvolver doenças, muitas vezes na vida adulta (GLUCKMAN *et al*, 2010).

Algumas evidências mostraram que, bebês que passaram por um retardo de crescimento intrauterino são conhecidos por apresentarem anormalidades, estrutural e metabólicas. Dentre estas anormalidades está, por exemplo, a redução do tamanho de alguns órgãos, incluindo o fígado, assim com o metabolismo anormal da glicose - insulina (COLLINS *et al.*, 1990) e presença de triglicerídeos no plasma (FOSBROOK *et al.*, 1973).

Os primeiros dados relacionados com programação perinatal surge de um estudo geográfico realizado na Inglaterra em 1911, associando a taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares com o baixo peso ao nascer (BARKER *et al.*, 1989). Este tipo de evidência foi comprovado em um estudo realizado por RAVELLI *et al.* (1976), onde verificou-se que jovens aos 19 anos, cujas mães foram expostas à fome durante o período de gestação nos anos 1944-1945, se tornaram obesos. Além destas evidências, outras mostram que homens que tiveram baixo peso ao nascer tiveram morte ocasionada por doenças cardiovasculares (BARKER *et al.*, 1986) e outros estudos revelaram a presença de diabetes em homens com baixo peso ao nascer e no primeiro ano de vida (HALLES *et al.*, 1991).

Para se entender os mecanismos que envolvem as alterações no organismo decorrentes de eventos sofridos durante o período crítico do desenvolvimento (gestação e lactação), são necessários, muitas vezes, estudos mais detalhados. Nesta perspectiva, cada vez mais estudos com animais são utilizados como ferramenta para tentar explicar tais acontecimentos.

Pesquisas desenvolvidas com animais em diferentes fases do desenvolvimento fetal tendo com modelo a sub ou supernutrição, têm demonstrado diferentes efeitos (PRUIS et al. 2013), como mostra em um estudo em ratos, onde uma restrição protéica imposta à mães em diferentes fases da gestação causou efeitos diferenciados sobre prole (LANGLEY-EVANS et al. 1996).

Apesar de vários estudos mostrarem os efeitos deletérios da má nutrição tanto em humanos quanto em animais, pouco se sabe sobre os mecanismos bioquímicos e moleculares que envolvem a modulação da bioenergética mitocondrial hepática pela restrição proteica e sua correlação com a pré-disposição e/ou o aparecimento de doenças crônico-degenerativas.

No entanto, sabe-se que as proteínas desempenham um importante papel na composição estrutural de órgãos e tecidos, assim como na síntese de hormônios protéicos e enzimas, e, sua carência crônica ou ausência de outros substratos pode alterar o equilíbrio dinâmico do metabolismo. Também tem sido demonstrado que um organismo desnutrido sofre alterações quando submetido a uma diminuição da ingestão calórica ou de baixo valor biológico (TRINDADE et al., 1986; GOBATTO, 1993).

2.2 Restrição proteica e disfunção hepática

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

Algumas disfunções no fígado podem ser decorrentes de alterações no metabolismo como, doença hepática gordurosa não alcoólica, fibrose, cirrose e

esteatose hepática, sendo esta última relacionada com diferentes fatores de predisposição, tais como a obesidade, diabetes, dislipidemia, e nutrição parenteral (MATTEONI et al., 1999; FALCK-YTTER et al., 2001).

Alterações na estrutura do fígado também tem sido reportada, como em um estudo realizado por Burn et al., *apud* PRUI et al., 2013, onde o fígado de ratos que passaram por uma restrição protéica apresentou aumento no volume dos lóbulos comparados com os controles. Hipertrofia hepática pode ser desenvolvida por fatores severos que inclui estado oxidativo alterado, metabolismo de ácido graxo, morfologia nuclear e produção de energia e utilização (revisado de HALL et al. 2012, visto em PRUI et al., 2013).

Estudos relacionados com disfunção hepática têm mostrado que injúrias no fígado podem ser mediadas por estresse oxidativo (CHITTURI & FARRELL, 2001; MEHTA et al., 2002 *apud* OLIVEIRA et al., 2006).

2.3 Mitocôndrias

As mitocôndrias são organelas que estão presentes em praticamente todas as células eucarióticas e desempenham a importante função de converter a energia de óxido-redução em energia química na forma de adenosina trifosfato (ATP), utilizada nos eventos celulares.

Anatomicamente as mitocôndrias possuem duas membranas e uma matriz (Figura 1). A membrana externa é lisa, envolve completamente a organela e é permeável a pequenas moléculas e íons que circulam livremente através de canais transmembranas formados por uma família de proteínas integrais de membranas chamadas porinas. A membrana interna é praticamente impermeável e seletiva a maioria de moléculas e íons, incluindo prótons (H^+). Suas circunvoluções formam as cristas mitocondriais. Apenas moléculas que possuem transportadores específicos atravessam a membrana. Além disso, na membrana interna encontram-se complexos enzimáticos responsáveis pelo transporte de elétrons, translocases de ATP e ADP, ATP sintase e outros transportadores de membrana (UCP, canais de Ca^{2+} , canais de K^+). Na matriz mitocondrial há enzimas da β -oxidação de ácidos graxos, enzimas da oxidação de aminoácidos, o complexo piruvato desidrogenase,

enzimas do ciclo do ácido cítrico, DNA, ribossomos, ATP, ADP, Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , P_i e muitos intermediários metabólicos solúveis (NELSON E COX, 2000).

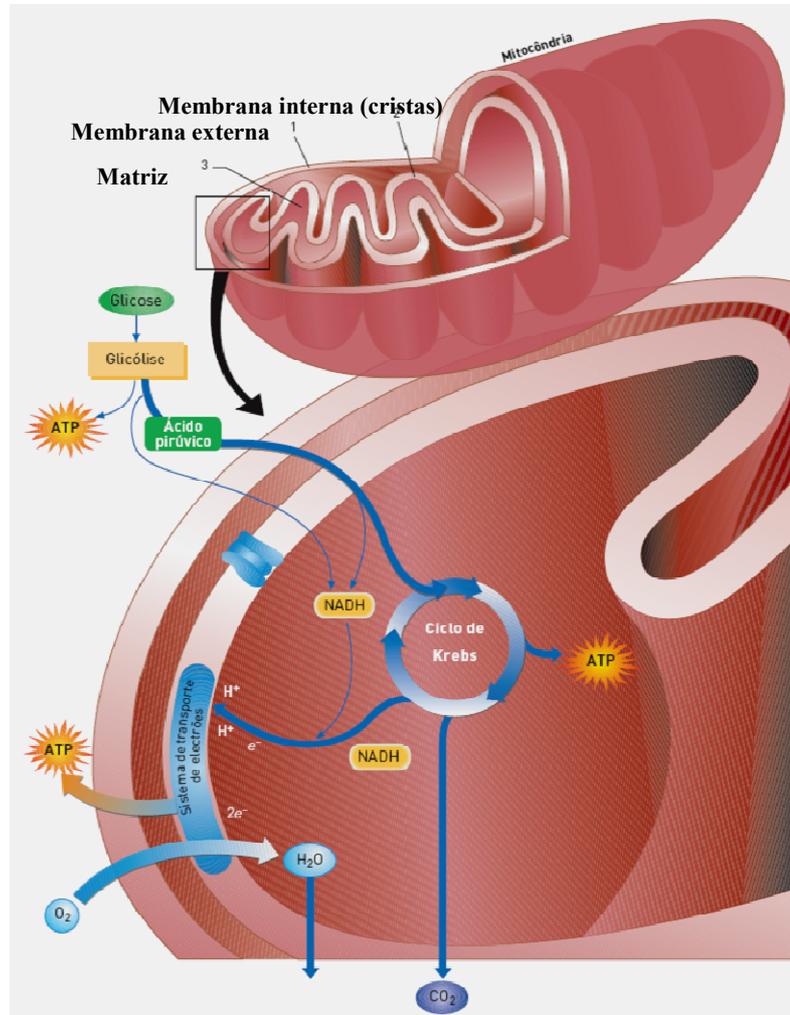


Figura 1. Anatomia bioquímica de uma mitocôndria (adaptado de NELSON e COX, 2000). As mitocôndrias variam de tamanho, formato, quantidade e localização, dependendo do tipo e função celular. As circunvoluções da membrana interna (cristas) proporcionam uma superfície muito grande. A membrana interna de uma única mitocôndria de fígado pode ter mais de 10.000 conjuntos de sistemas de transportes de elétrons (cadeias respiratórias) e moléculas de ATP sintase, distribuídas por toda a superfície da membrana.

2.4 Teoria quimiosmótica de Mitchell: transporte de elétrons e fosforilação oxidativa

O processo de transporte de elétrons ocorre por intermédio de uma série de transportadores denominados de cadeia transportadora de elétrons que agem

sequencialmente, sendo estes, em sua maioria, compostos por proteínas integrais de membranas que apresentam grupos prostéticos capazes de aceitar ou doar um ou dois elétrons. Em 1948, a descoberta feita por Eugene Kennedy e Albert Lehninger, de que as mitocôndrias são sítios catalíticos para síntese de ATP nos eucariotos, foi o marco que iniciou a fase moderna dos estudos da transdução de energia em sistemas biológicos (NELSON E COX, 2000).

O processo de fosforilação oxidativa inicia com a entrada de elétrons na cadeia respiratória, provenientes muitas vezes, da ação de desidrogenases que captam elétrons de vias catabólicas e os canalizam para aceptores universais de elétrons – nucleotídeos de nicotinamida (NAD^+ ou NADP^+) ou nucleotídeos de flavina (FMN ou FAD) (NELSON E COX, 2000).

Para ocorrer a fosforilação oxidativa (Figura 2), é fundamental que seja formado um potencial eletroquímico de prótons pela cadeia transportadora de elétrons, responsável pela redução do O_2 à H_2O . A cadeia transportadora de elétrons, ao converter a energia de óxido-redução em potencial elétrico de membrana mitocondrial, gera a força motriz para a fosforilação oxidativa. A energia proveniente desta força motriz é então utilizada pela ATP sintase para fosforilar ADP à ATP. Os elétrons ao passar pelos complexos da cadeia respiratória permitem um fluxo de H^+ desde a matriz até o espaço intermembranas, contra um gradiente de concentração. O componente elétrico ($\Delta\psi$) gerado atinge valores aproximados de 180 mV em estado de repouso, enquanto o componente químico (ΔpH) oscila entre 0 e 1 unidade de pH. Conseqüentemente, a favor do gradiente de concentração, os prótons de H^+ retornam à matriz através da F_0F_1 -ATP sintase, acoplado a fosforilação do ADP (MITCHELL, 1961).

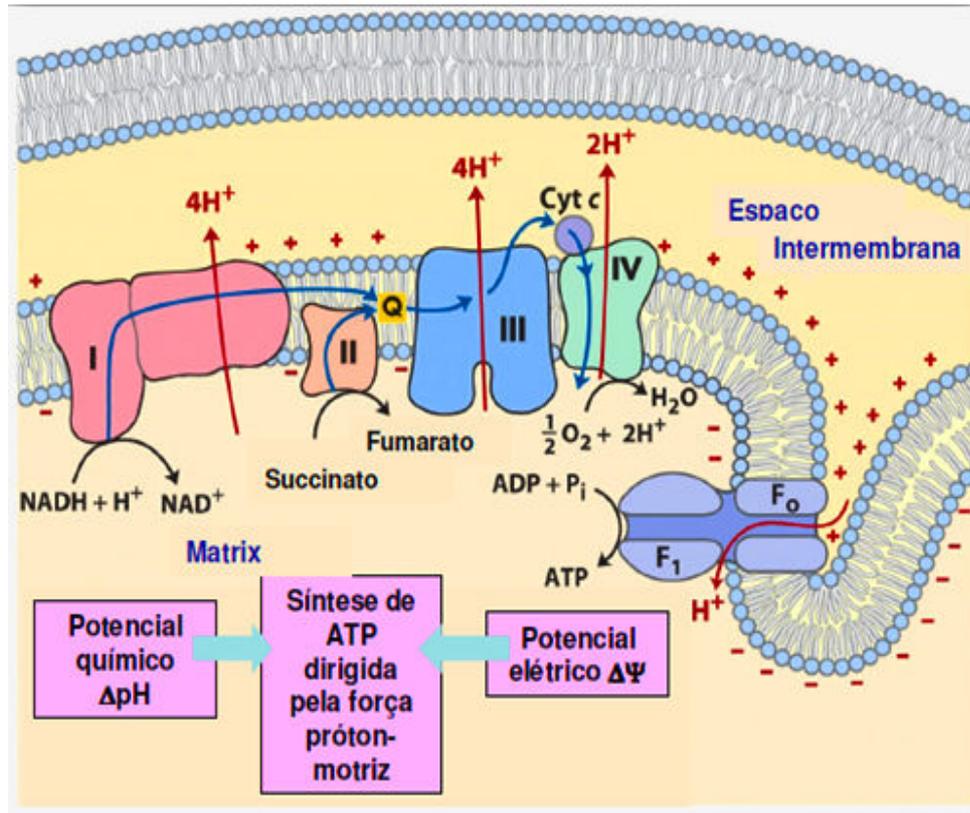


Figura 2: Cadeia respiratória mitocondrial e teoria quimiosmótica (adaptado de Nelson e Cox, 2000). Os números romanos indicam os quatro complexos respiratórios. Os elétrons do NADH + H⁺ e de outros substratos oxidáveis passam através de uma cadeia de transportadores arranjados assimetricamente na membrana. O fluxo de elétrons é acompanhado pela transferência de prótons através da membrana mitocondrial, produzindo tanto um gradiente químico (ΔpH) quanto elétrico (ΔΨ). A membrana mitocondrial interna é impermeável aos prótons, os quais podem reentrar na matriz através de canais específicos.

2.5 Espécies reativas de oxigênio (EROs), homeostase do cálcio e transição de permeabilidade mitocondrial

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

HAMANAKA e CHANDEL, 2010; TOCCHETTI *et al.*, 2011, visto em FIGUEIRA *et al.*, 2013).

Durante a transferência de elétrons, pelos complexos da cadeia transportadora, uma pequena porcentagem do oxigênio (1-2%) pode ser naturalmente convertido no radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (BOVERIS *et al.*, 1973). A partir do ânion superóxido outras espécies reativas são geradas na mitocôndria. Essas espécies, por sua vez, são reguladas por diferentes sistemas antioxidantes, enzimático e não enzimático. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por exemplo, é um produto secundário da dismutação catalizada pela enzima superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) (CADENAS *et al.*, 1977). Na presença de ferro (Fe^{2+}) o H_2O_2 é convertido no radical hidroxil (HO^{\cdot}), que possui o tempo de meia vida curto, mas é altamente reativo e é capaz de causar peroxidação lipídica, assim como danificar proteínas e DNA (visto em HALLIWELL, 2012).

Apesar de haver sistemas que regulam o estado redox na mitocôndria, alguns fatores como a presença de cálcio, podem contribuir para a geração de um desbalanço redox. O cálcio (Ca^{2+}) desempenha um importante papel como segundo mensageiro regulando diferentes processos biológicos como, crescimento e diferenciação, motilidade e contração, endocitose, exocitose e secreção, e regulação do metabolismo intermediário (Campbell *et al.*, 1983; Putney e Bird, 1993; Moreno *et al.*, 1994). Dentro da matriz mitocondrial, o aumento dos níveis de Ca^{2+} atua como importante ativador da piruvato desidrogenase, enzimas do ciclo do ácido cítrico e componentes da cadeia respiratória (revisado de Gunter *et al.*, 1994; Gunter *et al.*, 2000).

Já está bem estabelecido que o influxo de Ca^{2+} mitocondrial serve como mecanismo de sinalização para controle da fosforilação oxidativa e também da geração de EROs. Além disso, desregulação nos níveis de Ca^{2+} na célula leva a um aumento dos níveis de Ca^{2+} no ambiente mitocondrial, que pode conduzir à morte celular por desregulação de ATP e da homeostase redox (GLEICHMANN *et al.*, 2011; GLANCY *et al.*, 2012; HIDALGO *et al.*, 2008; KOWALTOWSKI, 2009; VASEVA *et al.*, 2012; Yanet *et al.*; 2008, visto em FIGUEIRA *et al.*, 2013).

A homeostase do cálcio, também está relacionada com a integridade da organela por induzir o fenômeno de transição de permeabilidade mitocondrial. A transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) é uma permeabilização não seletiva da membrana mitocondrial interna que ocorre em diversos processos fisiopatológicos

que pode preceder a morte celular por necrose ou por apoptose. Fortes evidências indicam que a TPM não é uma consequência da abertura de um poro pré-formado, mas sim dos danos oxidativos de proteínas de membrana mitocondrial (SKULACHEV, 1998; KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999). Sabe-se que a TPM ocorre quando grupos tiólicos de proteínas de membrana interna são oxidados, resultando em mudanças conformacionais que formam um poro não-seletivo (Figura 3).

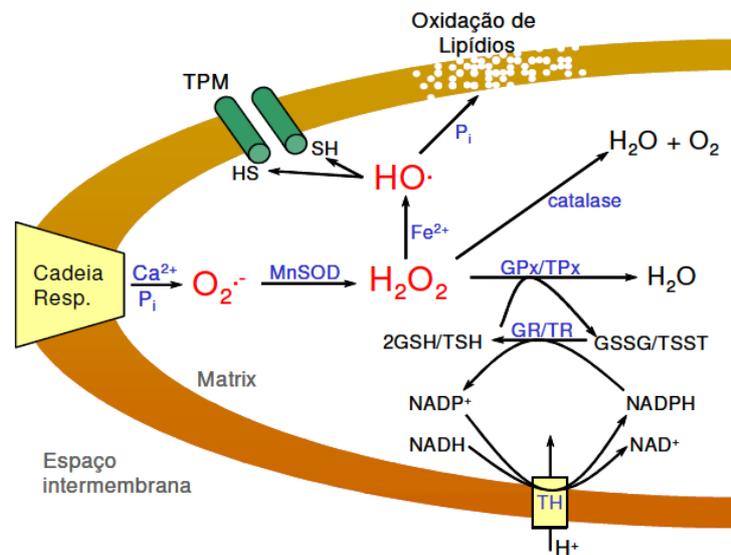


Figura 3: Modelo proposto para explicar a formação do poro de transição de permeabilidade induzido por Ca^{2+} e espécies reativas de oxigênio (EROs) na membrana mitocondrial interna(Kowaltowski et al., 2001). A cadeia respiratória, inserida na membrana mitocondrial interna, constantemente gera pequenas quantidades de radicais $\text{O}_2^{\cdot-}$. Estes radicais são normalmente removidos pela Mn-superóxido dismutase (MnSOD), que promove a geração de H_2O_2 . O H_2O_2 é então reduzido à H_2O pela glutatona peroxidase (GP), tioredoxina peroxidase (TP) ou catalase (em mitocôndria de coração). GSH, oxidado pela GP, e TSH, oxidado pela TP, são recuperados pelo sistema enzimático glutatona e tioredoxina redutases (GR e TR), que usam NADPH como doador de elétrons. NADH, que está presente em quantidades reguladas pela respiração, reduz então NADP^+ usando a NAD(P) transidrogenase (TH). Quando a geração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ aumenta na presença de Ca^{2+} e P_i , e/ou os mecanismos de remoção de H_2O_2 estão inativados, H_2O_2 acumula-se e na presença de Fe^{2+} , gera o radical OH^{\cdot} altamente reativo. OH^{\cdot} oxida grupos tiólicos (-SH) do complexo do poro de TPM, levando à formação e abertura do poro. Alternativamente, OH^{\cdot} pode promover permeabilização da membrana através da peroxidação lipídica, um processo fortemente estimulado por P_i .

Nos anos 70, Hunter e Haworth caracterizaram este fenômeno e assim foi sugerido ser o resultado da abertura de um poro de tamanho discreto, capaz de permitir a passagem de moléculas com aproximadamente 1,5 kDa, na membrana mitocondrial interna (HAWORTH E HUNTER, 1979). Geralmente a TPM é promovida pelo acúmulo de quantidades excessivas de íons Ca^{2+} e por uma variedade de compostos ou condições de estresse oxidativo (KOWALTOWSKI et al., 2001).

3 OBJETIVOS

Objetivo geral: Estudar a função e o metabolismo das mitocôndrias hepáticas de ratos como provável mecanismo molecular subjacente ao aparecimento de doenças metabólicas via programação nutricional perinatal.

Objetivos específicos:

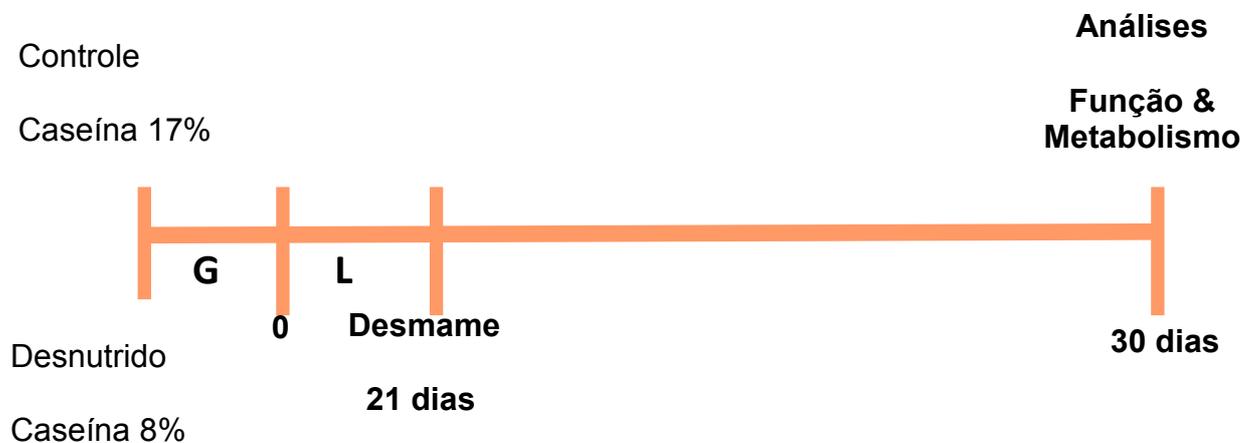
- Avaliar o efeito da desnutrição perinatal na capacidade oxidativa das mitocôndrias de fígado de ratos;
- Avaliar o efeito da desnutrição perinatal na indução do inchamento mitocondrial e da transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) em mitocôndrias de fígado de ratos;
- Avaliar o efeito da desnutrição perinatal na geração mitocondrial de espécies reativas em mitocôndrias de fígado de ratos;
- Avaliar o efeito da desnutrição perinatal no potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em mitocôndrias de fígado de ratos;
- Avaliar o efeito da desnutrição perinatal na capacidade de retenção de Ca^{2+} em mitocôndrias de fígado de ratos.

Hipótese

A desnutrição proteica perinatal causa alteração na função mitocondrial hepática de ratos jovens.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e Dieta: Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* provenientes da colônia do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em biotério de experimentação com temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$, ciclo claro-escuro de 12/12 horas. A manipulação e os cuidados com os animais seguiram as recomendações do COBEA e aprovação do Comitê de Ética em Estudos com Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (23076.044262/2010-88). As ratas prenhas foram divididas em dois grupos de acordo com a dieta fornecida: controle (C, caseína a 17%) e desnutridas (D, caseína a 8%) (Tabela 1). Na lactação, as ratas continuaram recebendo dieta experimental conforme o grupo experimental e após o desmame (21 dias de idade) os filhotes receberam dieta de biotério, Labina (74,5% de carboidratos, 23% de proteínas e 2,5% de lipídeos) (Tabela 2). As análises ocorreram quando os animais completaram 30 dias (esquema 1).



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

Tabela 1: Composição de dieta experimental isocalórica com diferentes teores de proteína, (g/100 de dieta).

Ingredientes	Dieta com baixo teor de proteína (8 %)	Dieta com teor normal de proteína 17%
Caseína (85%)	9,41 g	20 g

Mix Vitamínico	1g	1 g
Mix Mineral	3,5 g	3,5 g
Celulose	5 g	5 g
Bitartarato de		
Colina	0,25 g	0,25 g
DL-Metionina	0,3 g	0,3 g
Óleo de Soja	7 mL	7 mL
Amido de Milho	50,34g	39,74 g
Amido		
Dextrinizado	13,2 g	13,2 g
Sacarose	10 g	10 g
BHT (antioxidante de gordura)	0,0014 g	0,0014 g

Fonte: REEVES, 1993.

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

Ingredientes*	Quantidade (g)	Calorias (Kcal)
Proteína	23,0	92,0
Carboidrato	74,5	288,0
Gordura	2,5	22,5
Total	100,0	402,5

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

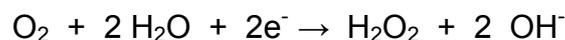
Isolamento das mitocôndrias hepáticas: As mitocôndrias foram isoladas de fígado de ratos, controles e submetidos a restrição proteica, utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial, segundo SCHNEIDER e HOGEBOM (1951). O fígado foi lavado em solução de sacarose 250 mM contendo tampão 10 mM de HEPES (pH 7,2) e 0,5 mM de EGTA, picado com tesoura e homogeneizado. O material foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado durante 10 minutos a 8000 rpm sendo a fase lipídica superior retirada. O

sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensa em 250 mM de sacarose, 5 mM de HEPES (pH 7,2) e 0,3 mM de EGTA, e novamente centrifugado como na condição anterior. A fração mitocondrial foi ressuspensa na mesma solução, porém isenta de EGTA.

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

Condições experimentais: Os experimentos foram realizados a 28 °C em meio de reação padrão contendo 125 mM de sacarose, 10 mM de HEPES (pH 7,2), 65 mM de cloreto de potássio, 2 mM de fosfato de potássio e 1 mM de cloreto de magnésio. Como substrato respiratório foi utilizado succinato para o complexo II (5 mM de succinato). Os experimentos foram feitos na presença e/ou ausência de 0,5 mM de EGTA.

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



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



A corrente gerada pela diferença dos eletrodos é relacionada estequiometricamente à concentração de O_2 na superfície do cátodo. Os impulsos elétricos são transmitidos ao oxígrafo, o qual é conectado a um computador onde é feita a leitura.

Medida de inchamento mitocondrial e transição de permeabilidade

mitocondrial: As suspensões mitocondriais são turvas e espalham a luz incidente. A luz espalhada é uma função da diferença entre o índice de refração da matriz e do meio, e, qualquer processo que diminua esta diferença irá diminuir a luz espalhada e aumentar a transmitância (Figura 4) (NICHOLLS e ÅKERMAN, 1982). Assim, um aumento no volume da matriz mitocondrial, associado com a entrada de solutos permeáveis, resulta numa aproximação entre o índice de refração da matriz e do meio de reação com a consequente diminuição da luz espalhada. O acompanhamento espectrofotométrico da redução da absorbância a 520 nm foi feito em um espectrofotômetro utilizando mitocôndrias isoladas (0,5 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 será feita através do uso de um inibidore clássico do poro de transição de permeabilidade (ciclosporina A).

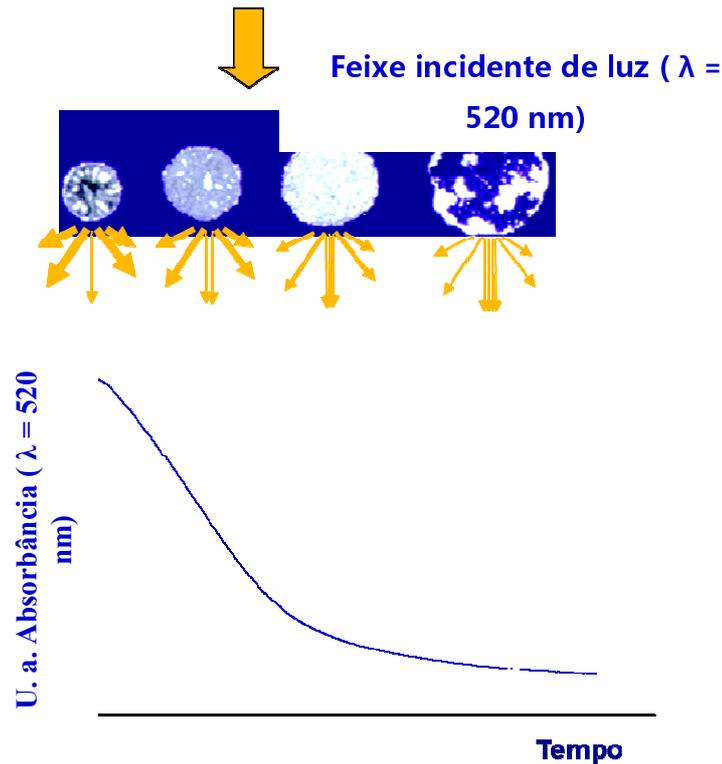


Figura 4: Inchamento mitocondrial. As setas indicam o feixe de luz que reflete ao incidir sob mitocôndrias integras e que podem ser menos espalhadas em situações de inchamento mitocondrial, por exemplo. O gráfico representa a absorvância a 520 nm em função do tempo.

Estimativa do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$): A estimativa do potencial elétrico de membrana mitocondrial foi avaliada através do indicador safranina O (5 μM), que apresenta um deslocamento no espectro visível associado a sua ligação à membrana de mitocôndrias energizadas. Esta adsorção foi seguida de alteração de espectro de absorvância da safranina na faixa de 500 a 600 nm. Nestas condições as diferenças de absorvância nos comprimentos 511-533 são diretamente proporcionais à amplitude do potencial até valores de aproximadamente 170 mV (ÅKERMAN & WIKSTRÖM, 1976; VERCESI et al, 1991). As mudanças na fluorescência da safranina foram monitoradas em um espectrofluorímetro Shimatsu (RF5031), nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 495 e 586 nm, respectivamente, com largura de fenda de 2,5 nm.

Medida da geração mitocondrial de espécies reativas (ERs): A produção de Espécies Reativas (ERs) pelas mitocôndrias isoladas foi determinada

fluorimetricamente através da oxidação do H₂DCF-DA (diacetato de diclorodihidrofluoresceína, 5µM) (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA). A fluorescência foi monitorada ao longo do tempo em um espectrofluorímetro usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 525 nm, respectivamente, com largura da fenda de 5 nm (LEBEL *et al*, 1992; GARCIA-RUIZ *et al*, 1997).

Avaliação da capacidade de retenção de cálcio: A captação de cálcio pelas mitocôndrias isoladas (0,5 mg/ml) foi determinada fluorimetricamente através da adição de 0,1 µM Calcium Green-5N hexapotassium salt (Molecular Probes) usando um espectrofluorímetro Shimatsu RF5031 com temperatura controlada (28° C) num comprimento de onda de excitação e emissão de 506 e 531 nm, respectivamente, e largura da fenda de 5 nm (MURPHY *et al*, 1996).

Análise estatística: Os resultados foram expressos como média ± EPM (erro padrão da média). A análise estatística foi realizada através do teste “t” de Student não pareado. O nível de significância foi considerado quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da desnutrição perinatal no consumo de oxigênio de mitocôndrias hepáticas

Para compreendermos o efeito da desnutrição perinatal na velocidade de consumo de oxigênio de mitocôndrias hepáticas, utilizamos um equipamento, chamado oxígrafo, que é capaz de quantificar o consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas através de um eletrodo sensível à variação da concentração de oxigênio do meio. A figura 5 mostra o consumo de oxigênio de mitocôndrias hepáticas de animais controles (Figura 5A) e de animais desnutridos (Figura 5B) na presença de ADP (estado 3), oligomicina (estado 4) e do protonóforo carbonil cianeto p-(Trifluorometoxi) hidrazona (CCCP). Nossos resultados revelaram que a velocidade de fosforilação, conhecida como estado 3 apresentou uma diminuição significativa de aproximadamente 27,53% nas mitocôndrias dos animais desnutridos em comparação com o grupo controle (Controle: $56,04 \pm 4,15$ nmolO₂/mg/min vs Desnutrido: $40,61 \pm 5,83$ nmolO₂/mg/min, $p < 0,05$) (Figura 6). A avaliação do estado de repouso, que é aquele estado onde a mitocôndria já fosforilou todo ADP que foi adicionado exogenamente, na presença de oligomicina, apresentou um aumento não significativo de 22,97% em relação ao grupo desnutrido (Controle: $9,49 \pm 1,09$ nmolO₂/min/mg de proteína vs Desnutrido: $11,67 \pm 1,31$ nmolO₂/min/mg de proteína, $p > 0,05$) (Figura 6). Também verificamos uma diminuição não significativa de 22,21% na velocidade de respiração dos animais desnutridos na presença de CCCP (Controle: $65,31 \pm 11,07$ nmolO₂/min/mg de proteína vs Desnutrido: $50,8 \pm 8,74$ nmolO₂/min/mg de proteína, $p > 0,05$) (Figura 6). O controle respiratório (estado 3/estado 4) apresentou um aumento significativo de 39,44% (Figura 7) no grupo desnutrido em relação ao controle (Controle: $6,06 \pm 1,29$ nmolO₂/min/mg de proteína vs Desnutrido: $3,67 \pm 1,47$ nmolO₂/min/mg de proteína, $p < 0,05$). Nossos dados mostraram que as mitocôndrias hepáticas de animais desnutridos, com 30 dias de vida, apresentam uma disfunção na capacidade funcional da organela, uma vez que o consumo de oxigênio na velocidade de fosforilação (estado 3) está diminuído. No entanto, nós observamos anteriormente que, em animais de 100 dias de vida, houve um aumento na velocidade de consumo de oxigênio das mitocôndrias dos animais desnutridos (dados ainda não publicados) em relação aos animais controles.

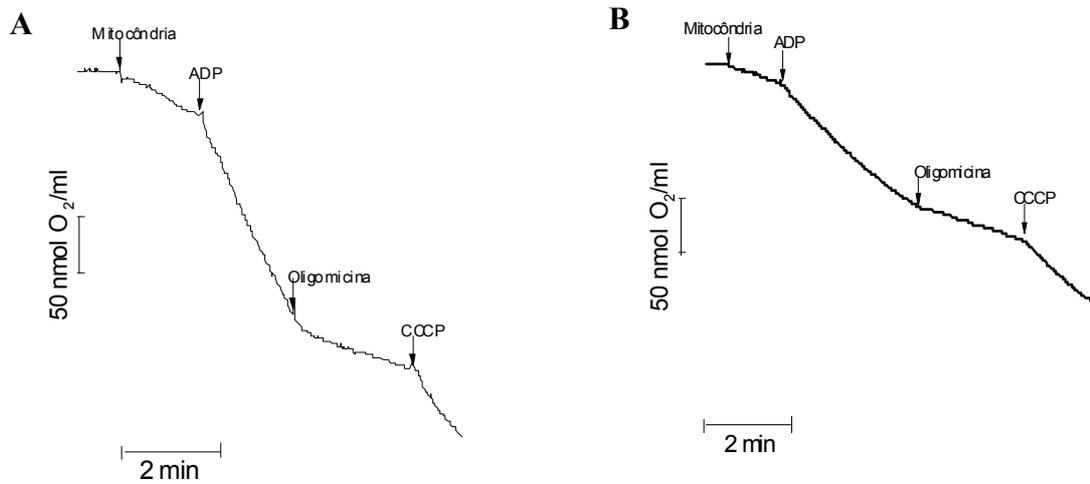


Figura 5. Avaliação do consumo de oxigênio de mitocôndrias hepáticas.A)

Traçado representativo do consumo de oxigênio de mitocôndrias de animais controle e B) de animais desnutridos. O meio de reação contém: 125 mM de sacarose, 10 mM de HEPES (pH 7,2), 65 mM de cloreto de potássio, 2 mM de fosfato de potássio, 1 mM de cloreto de magnésio, 200 μ M de EGTA e 5mM de succinato. As setas nos traçados indicam: mitocôndria (0,5 mg/mL), ADP (200 μ M), oligomicina (1 μ g/mL) e CCCP (1 μ M). Traçados representativos de cinco dias de experimentos.

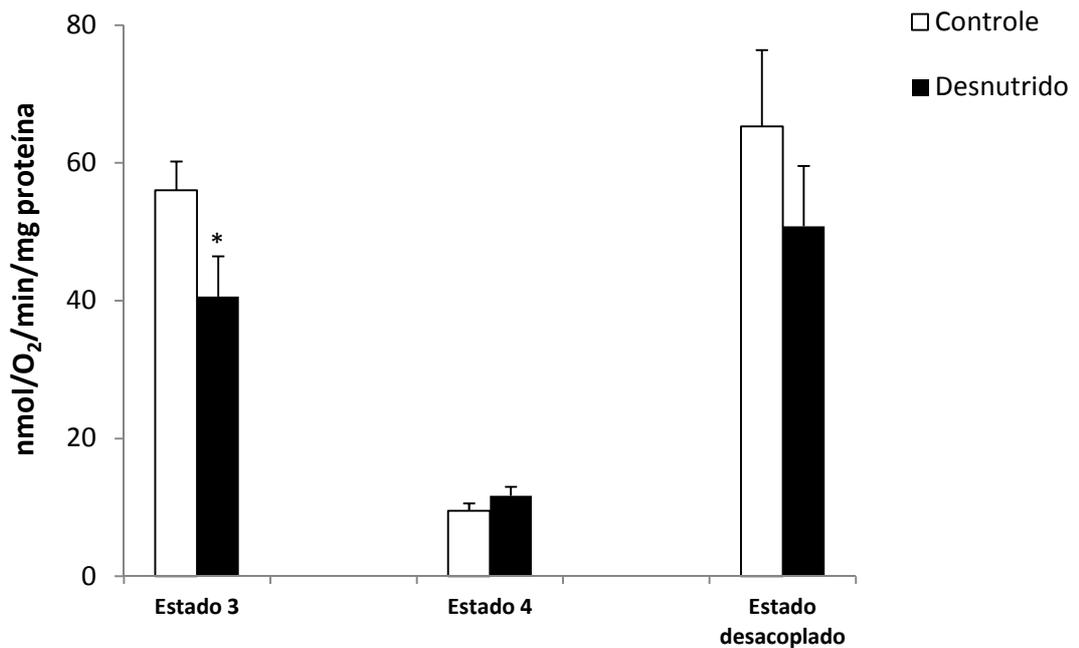


Figura 6. Parâmetros respiratórios de mitocôndrias hepáticas. Nesse experimento foi utilizado 0,5 mg/ml de mitocôndrias de fígado de rato. O meio de reação contém: 125 mM de sacarose, 10 mM de HEPES (pH 7,2), 65 mM de cloreto de potássio, 2 mM de fosfato de potássio, 1 mM de cloreto de magnésio, 200 μ M de EGTA e 5mM de succinato. Os resultados expressos equivalem a uma média \pm EPM de cinco dias de experimentos para o grupo controle e o grupo desnutrido. * $p < 0,05$.

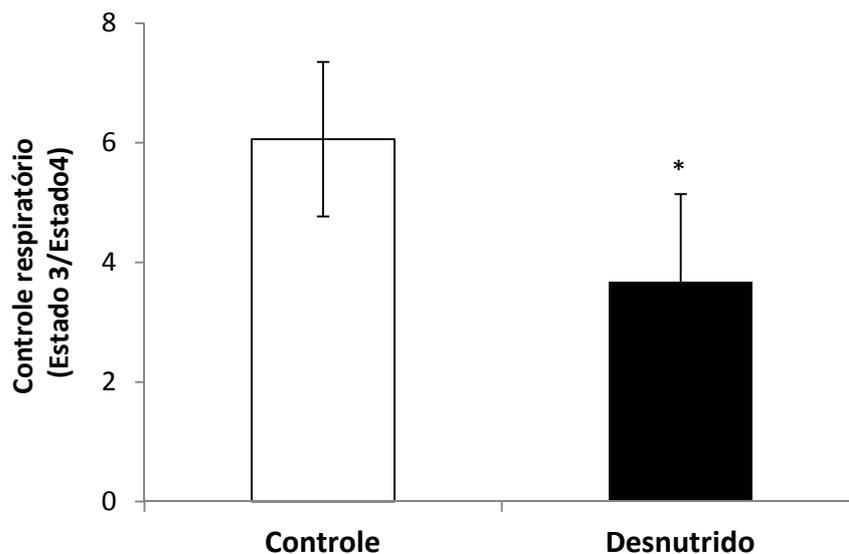


Figura 7. Efeito da desnutrição perinatal no controle respiratório de mitocôndrias hepáticas. O meio de reação consistiu de 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM K_2PO_4 , 200 μ M EGTA e 5 mM succinato em um volume total de 1 ml. Os resultados expressos equivalem a uma média \pm EPM de cinco dias de experimentos independentes, * $p < 0,05$.

Efeito da restrição proteica perinatal na indução de inchamento mitocondrial

As mitocôndrias possuem várias cristas na sua matriz decorrentes de um dobramento da membrana mitocondrial interna. O desdobramento dessa membrana acarreta um aumento do volume da organela. Em algumas situações fisiológicas, as mitocôndrias podem aumentar de volume sem alterar sua função, no entanto, em muitos processos patológicos um aumento do volume mitocondrial pode ser decorrente de um rompimento ou permeabilização da membrana mitocondrial

interna, fenômeno conhecido como transição de permeabilidade mitocondrial, o que leva a uma perda irreversível da funcionalidade da organela e prejuízo no metabolismo energético oxidativo (INADA,etal., 2008). Nos casos de inchamento da mitocôndria, decorrente da transição de permeabilidade mitocondrial, esse efeito normalmente é potencializado na presença do íon Ca^{2+} .

Nos nossos experimentos, observamos que o grupo desnutrido apresentou maior inchamento das mitocôndrias (que pode ser verificado por uma maior queda da absorbância), na presença de Ca^{2+} ($10\mu\text{M}$) quando comparado com as mitocôndrias dos animais controles, porém essa situação foi completamente revertida na presença de Ciclosporina A (CsA), um inibidor do poro de transição (Controle + Ca^{2+} : $1,03 \pm 0,08$ vs Desnutrido + Ca^{2+} : $0,52 \pm 0,08$, $*p < 0,05$ e Controle + CsA: $1,15 \pm 0,06$ vs Desnutrido + CsA: $1,23 \pm 0,05$), absorbância aos 5 minutos) (Figura 8). Esses resultados sugerem que as mitocôndrias dos animais de 30 dias de idade que sofreram desnutrição perinatal são menos resistentes ao íon Ca^{2+} e/ou possuem menor capacidade de tamponamento desse íon. Quando esse aumento de Ca^{2+} intramitocondrial supera a capacidade de tamponamento da mitocôndria isso pode levar à inibição da fosforilação oxidativa, uma vez que o complexo Ca-ADP formado compete com Mg-ADP na ligação no sítio ativo da F_0F_1 -ATP sintase (VERCESI et al., 1990) e aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (KOWALTOWSKI et al., 2001).

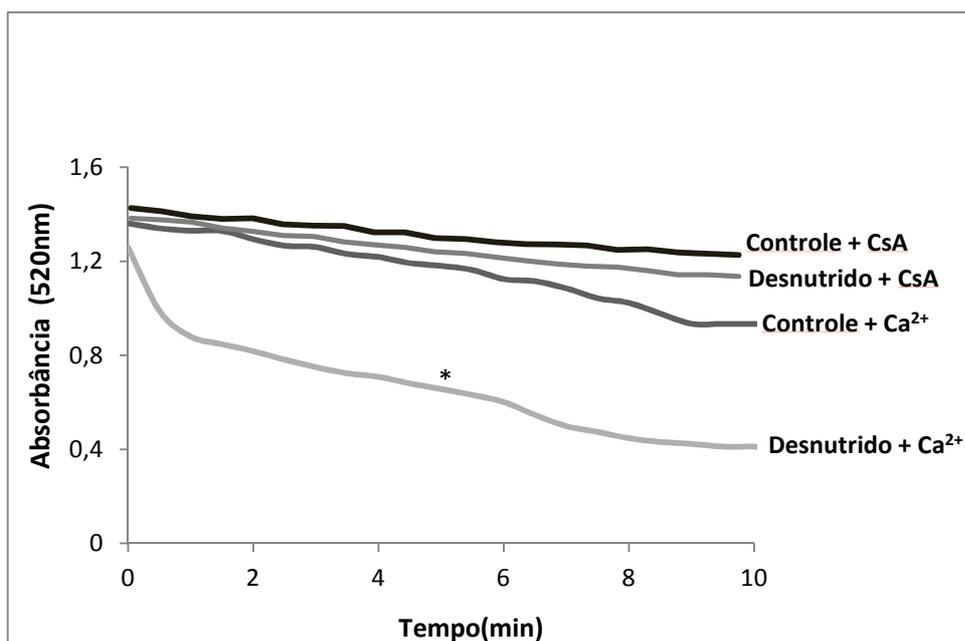


Figura 8. Efeito da desnutrição perinatal no inchamento de mitocôndrias hepáticas na presença de cálcio. O meio de reação contém: 125 mM de sacarose, 10 mM de HEPES (pH 7,2), 65 mM de cloreto de potássio, 2 mM de fosfato de potássio, 1 mM de cloreto de magnésio, 10 μM de Ca^{2+} e 5 mM de succinato com e sem 1 μM ciclosporina A (CsA). Os resultados expressos equivalem a uma média \pm EPM de cinco dias de experimentos para o grupo controle e o grupo desnutrido. * $p < 0,05$, considerando os valores de absorbância aos cinco minutos em comparação com o grupo controle.

Efeitos da desnutrição proteica perinatal na estimativa do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em mitocôndrias de fígado de ratos

A energia necessária para o processo de fosforilação oxidativa provém do potencial eletroquímico de prótons gerado pela cadeia de transporte de elétrons que reduz o O_2 à H_2O . Esta energia é utilizada pela ATP sintase para fosforilar o ADP à ATP (MITCHELL, 1961). Para analisarmos se a restrição proteica tem efeito direto na integridade mitocondrial, avaliamos o potencial elétrico de membrana mitocondrial dos animais controle e desnutrido (Figura 9). Nossos resultados mostram que, em animais de 30 dias de vida, a restrição proteica causa uma menor capacidade das mitocôndrias em manter seu potencial elétrico de membrana em animais desnutridos comparados com os controles (Controle: $6,235 \pm 1,366$ min vs Desnutrido: $2,177 \pm 0,6868$ min, $p = 0,013$) (Figura 9). No entanto, nosso grupo observou anteriormente que, em animais de 100 dias de vida, houve um aumento nesta capacidade de manutenção do potencial elétrico de membrana nos animais desnutridos (dados ainda não publicados). Alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial interna induzidas por Ca^{2+} podem ocorrer em consequência da ação de EROs geradas na mitocôndria (VERCESI et al., 1993; VERCESI e HOFFMANN, 1993). Essas organelas são particularmente propensas à lesão oxidativa por EROs geradas continuamente pela cadeia respiratória mitocondrial (BOVERIS e CHANCE, 1973; TURRENS, 1997; KOWALTOWSKI et al., 1999). Muitos estudos associam a disfunção mitocondrial causada por EROs à morte celular tanto por necrose quanto por apoptose (ZAMZAMI et al., 1997; ZHANG et al., 1997; ZECCHIN et al., 2007).

Nossos dados mostraram que as mitocôndrias hepáticas de animais desnutridos com 30 dias de vida apresentam uma alteração na integridade da membrana mitocondrial, devido ao potencial elétrico ser mantido por menos tempo que em animais controles o que pode levar a disfunção irreversível da organela.

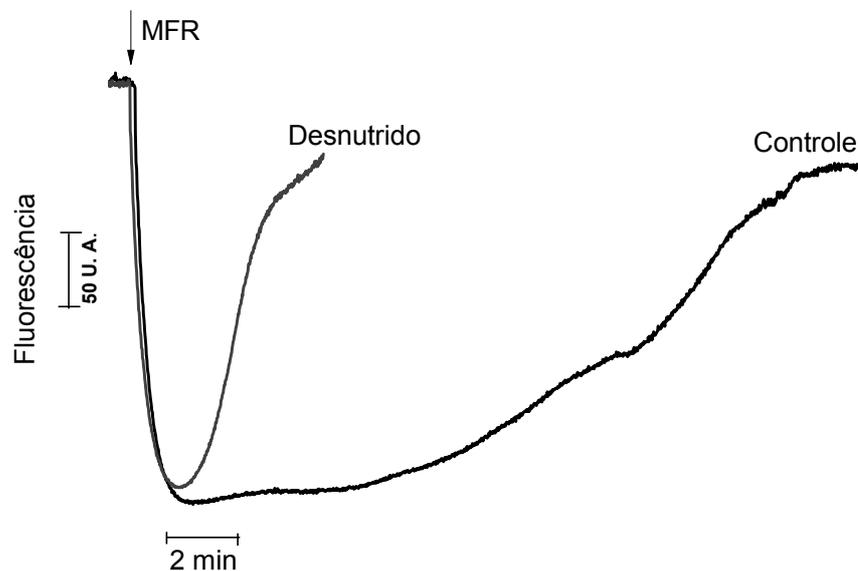


Figura 9. Avaliação da estimativa do potencial elétrico de membrana mitocondrial de fígado de ratos ($\Delta\Psi_m$). Tempo médio de retenção do ($\Delta\Psi_m$) (min) de animais do grupo Desnutrido: $2,117 \text{ min} \pm 0,6868^*$ vs Controle: $6,235 \text{ min} \pm 0,1,366$. O meio de reação contém: 125 mM de sacarose, 10 mM de HEPES (pH 7,2), 65 mM de cloreto de potássio, 2 mM de fosfato de potássio, 1 mM de cloreto de magnésio, 5mM de succinato e $15 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} . A seta no traçado indica mitocôndria de fígado de rato (MFR) (0,5 mg/mL). Os resultados expressos equivalem a uma média \pm EPM de três dias de experimentos para o grupo controle e o grupo desnutrido, $*p < 0,05$.

Efeitos da desnutrição proteica perinatal na geração de espécies reativas em mitocôndrias de fígado de ratos

O estresse oxidativo ocorre nas células devido ao favorecimento da produção de espécies reativas de oxigênio, tais como: ânion superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio e tem sido verificado em processos fisiológicos e patológicos nos humanos incluindo a lesão isquêmica, inflamação crônica, doenças neurodegenerativas, diabetes do tipo II e aterosclerose. EROs são conhecidas como mediadores importantes na célula, pois dependendo da sua produção pode causar dano oxidativo, mas sob condições fisiológicas, ativam várias moléculas celulares de sinalização (LING et al., 2011).

Em animais de trinta dias de vida, as mitocôndrias hepáticas do grupo desnutrido produzem mais espécies reativas (Controle: $3610,36 \pm 39,28$ UF vs Desnutrido: $10645,65 \pm 138,8$ UF, $p < 0,05$) sensíveis a EGTA (quelante de cálcio) do que as mitocôndrias de animais controles (Figura 10). Aumento nas concentrações de Ca^{2+} também afeta a liberação de EROs mitocondriais e o aumento desse cátion diminui transitoriamente o potencial elétrico transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (KOMARY et al., 2008). Este efeito pode justificar a diminuição da capacidade das mitocôndrias de animais desnutridos, aos 30 dias de vida, em manter seu potencial elétrico de membrana, situação que pode ser explicada pelo excesso de espécies reativas estimulado pelo Ca^{2+} .

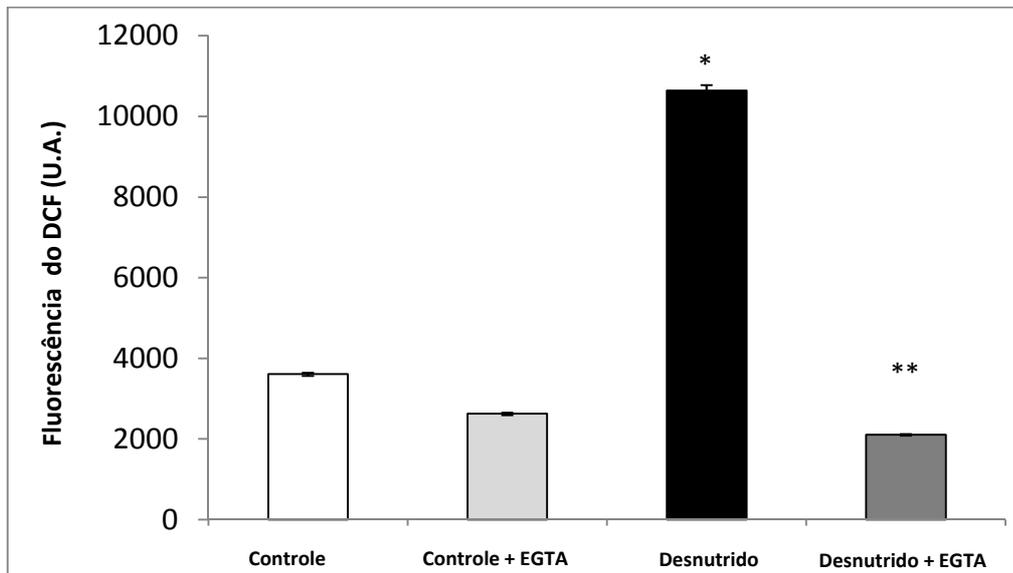


Figura 10. Efeito da desnutrição perinatal na geração de espécies reativas em mitocôndrias de fígado de rato. Mitocôndria de fígado de rato (MFR, 0,5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação contendo $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$ ou $500 \mu\text{M EGTA}$. O meio de reação consistiu de 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl_2 , 2 mM K_2PO_4 , $5 \mu\text{M H}_2\text{DCF-DA}$ e 5mM succinato. Os resultados expressos equivalem a uma média \pm EPM de cinco dias de experimentos para o grupo controle e o grupo desnutrido. Análise estatística: * $p < 0.05$ comparado com o controle, ** $p < 0.05$ comparado com o desnutrido.

Efeitos da desnutrição proteica perinatal na capacidade de retenção de cálcio em mitocôndrias de fígado de ratos

O Ca^{2+} pode ser acumulado em grandes quantidades na mitocôndria quando há falhas nos sistemas de transporte desse íon, ou quando a membrana mitocondrial interna perde sua impermeabilidade.

Nossos resultados demonstram que as mitocôndrias de animais do grupo desnutrido aos 30 dias de vida, possuem capacidade de retenção desse íon por menos tempo, em relação aos animais do grupo controle (Figura 11) (Controle: 10.7 ± 0.85 min vs. Desnutrido: 5.81 ± 0.72 min), $p < 0,05$. Quando na presença do inibidor clássico do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, a ciclosporina A (CsA), os dados mostram que não houve alteração significativa na retenção de cálcio entre os grupos (Controle+CsA: 15.0 ± 1.06 min vs. Desnutrido+CsA 14.3 ± 0.73 min). Isso mostra que a restrição protéica perinatal ocasiona maior acúmulo de cálcio nestas mitocôndrias, indicando que este fator é responsável pela formação de poro de transição de permeabilidade mitocondrial, uma vez que a rápida liberação de cálcio pelas mitocôndrias de animais desnutridos foi completamente inibida na presença de CsA.

A estrutura de ácidos nucléicos e algumas proteínas podem ser danificadas por altas concentrações de Ca^{2+} , entretanto níveis intermediários podem interferir no controle de quinases específicas e ativar proteases sensíveis a Ca^{2+} ou fosfolipases levando à morte celular. Falhas nos sistemas envolvidos na “proteção” citosólica contra altos níveis de Ca^{2+} é frequentemente associada a danos celulares irreversíveis (Gunter e Pfeiffer, 1990).

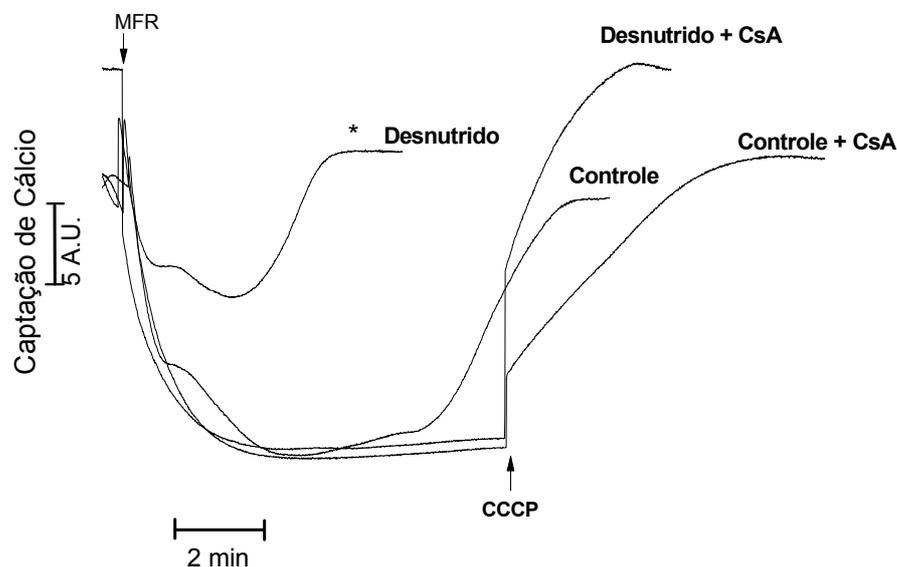


Figura 11. Capacidade de retenção de Ca^{2+} em mitocôndrias de fígado de ratos. Mitocôndrias de fígado de rato (MFR, 0.5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação contendo $15\mu\text{M Ca}^{2+}$ ou $15\mu\text{M Ca}^{2+} + 1\mu\text{M CsA}$. O meio de reação continha $0,1\mu\text{M}$ de Calcium Green-5N hexapotássio. As setas indicam MFR e $1\mu\text{M CCCP}$ adicionados no experimento. Os resultados equivalem a três dias independentes de experimentos. U. A., unidade arbitrária de fluorescência. $*p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

6 CONCLUSÃO

O período crítico do desenvolvimento é uma fase altamente influenciada pelo ambiente. Nossos dados permitem concluir que a restrição proteica nesta fase, é um fator que contribui para gerar alterações na bioenergética mitocondrial hepática, de forma que causa disfunção na organela, devido à transição de permeabilidade mitocondrial observada em animais jovens. Essas consequências por sua vez, pode também levar à modulação do metabolismo energético hepático. Nesta perspectiva, se faz necessário pensar em estratégias preventivas adequadas desde a infância, a fim de se evitar o desenvolvimento de doenças metabólicas relacionadas com o estilo de vida moderno.

Apoio Financeiro

O presente trabalho teve suporte financeiro da **FACEPE** (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) e **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, J. K. **Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?** Nat. Med. 10:S18–25; 2004.

BALLINGER, S. W. **Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease.** Free Radic.Biol. Med. 38:1278–1295; 2005.

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

BARKER D. J., OSMOND C. **Diet and coronary heart disease in England and Wales during and after the Second World War.** J Epidemiol Comm Health. 40(1):37-44, 1986.

BARKER D. J, OSMOND C., GOLDING J., KUH D., WADSWORTH M. E. **Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease.** BMJ.; 298(6673):564-7, 1989.

BOVERIS, A.and CHANCE, B. Biochem. J. **The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effects of hyperbaric oxygen.** 134:707-716. 1973.

BONOMO, I. T., LISBOA, P. C., *et al.* **Prolactin inhibition at the end of lactation programs for a central hypothyroidism in adult rat.** J Endocrinol, v.198, n.2, p.331-7. 2008.

BRADFORD et al. **Anal Biochem.**72:248-254, 1976.

BOVERIS A., CHANCE B. **The mitochondrial generation of hydrogen peroxide.General properties and effect of hyperbaric oxygen.**Biochem J.134(3):707-16, 1973.

CAMPBELL A. K. **Intracellular calcium. Its Universal role as regulator.** New York: John Wiley & Sons Limited; 1983.

CADENAS, E.; DAVIES, K. J. **Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging.** Free Radic. Biol. Med. 29:222–230; 2000.

Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C. I. and Stoppani, A. O. M. **Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria.** (Arch. Biochem. Biophys. 180:248-257. 1977.

COLLINS J.E., LEONARD J. V., TEAL D., et al. **Hyperinsulinaemia and hypoglycaemia in small for dates babies.** Arch Dis Child; 65: 1118-20, 1990.

COTTRELL E.C., OZANNE, S.E. **Early life programming of obesity and metabolic disease.** Physiol Behav. 94(1):17-28, 2008.

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

FALCK-YTTER, Y., YOUNOSSI Z. M., MARCHESINI, G. et al. **Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes.** *Seminars in Liver Disease*, 21: 17-26. 2001.

FIGUEIRA, T. R., BARROS, M. H., CAMARGO, A. A., CASTILHO, R. F., FERREIRA, J. C. B., KOWALTOWSKI, A. J., SLUSE, F. E., SOUZA-PINTO, N. C., VERCESI, A. E. **Mitochondria as a Source of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: From Molecular Mechanisms to Human Health.** *Antioxidants & Redox Signaling* 18:10.1089. 2013.

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

FOSBROOK A. S., WHARTON B. A. **Plasma lipids in umbilical cord blood from infants of normal and low birthweight.** *Biol Neonate*; 22: 330-8, 1973.

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

GLANCY, B. and BALABAN, R.S. **Role of mitochondrial Ca^{2+} in the regulation of cellular energetics.** *Biochemistry* 51: 2959–2973, 2012.

GLEICHMANN, M. and MATTSON, M. P. **Neuronal calcium homeostasis and dysregulation.** *Antioxid Redox Signal* 14: 1261–1273, 2011.

GOBATTO, C. A; **Alterações metabólicas do treinamento físico em ratos previamente desnutridos e recuperados.** Campinas: UNICAMP, 1993.

GUNTER, T. E.; BUNTINAS, L.; SPARAGNA, G.; ELISEEV, R.; GUNTER, K. **Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions.** *Cell Calcium* 28:285–296; 2000.

GUNTER, T. E.; GUNTER, K. K.; SHEU, S. S.; GAVIN, C. E. **Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance.** *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 267:C313–339; 1994.

GUNTER TE, PFEIFFER DR. **Mechanisms by which mitochondria transport calcium.** *Am J Physiol.*; 258(5 Pt 1):C755-86, 1990.

GUPTA M, SINGAL PK. **Higher antioxidative capacity during a chronic stable heart hypertrophy.** *Circ Res*; 64:398-406, 1989.

HALES C. N., BARKER D. J., CLARK P. M., COX L. J., FALL C., OSMOND C., *et al.* **Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64.** *BMJ.*; 303(6809):1019-22, 1991.

HALLIWELL, B. **Free radicals and antioxidants: updating a personal view.** Nutrition Reviews; Vol. 70(5):257–265, 2012.

HAMANAKA, R. B. and CHANDEL, N. S. **Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes.** Trends Biochem Sci 35: 505–513, 2010.

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

HERRLINGER, C & KLOTZ, U. **Drug metabolism and drug interactions in the elderly.** Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 15: 897–918, 2001.

HIDALGO, C. and DONOSO, P. **Crosstalk between calcium and redox signaling: from molecular mechanisms to health implications.** Antioxid Redox Signal 10: 1275–1312, 2008.

INADA, N. M., ZECCHIN K. G., ALBERICI L. C., DEGASPERI G. R., OLIVEIRA H. C. F. **Mitochondrial oxidative stress and permeability transition: Tumor cell death, immune response and dyslipidemias.** Free Radical Pahtophysiology. 207-22, 2008.

JENKINS R. R., FRIENDLAND R., HOWALD H. **The relationship of oxygen uptake of superoxide dismutase and catalase activity in human skeletal muscle.** Int J Sport Med; 5:11-4, 1984.

KAPLAN, R.R., PEDERSEN, P.L. **Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria.** J Biochem, 212:279-88, 1983.

KINIRONS, M.T. & O'MAHONY, M.S.. **Drug metabolism and ageing.** Br. J. Clin. Pharmacol. 57: 540–544, 2004.

KOMARY, Z.; TRETTER, L.; ADAM-VIZI, V. **H₂O₂ generation is decreased by calcium inisolated brain mitochondria.** Biochim. Biophys. Acta 1777:800–807; 2008.

KOWALTOWSKI, A. J., VERCESI A. E. **Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress.** Free RadicBiol Med.26(3-4):463-71, 1999.

KOWALTOWSKI, A. J., DE SOUZA-PINTO, N. C., CASTILHO, R. F., VERCESI, A. E. **Mitochondria and reactive oxygen species.** Free RadicBiol Med.47(4):333-43, 2009.

KOWALTOWSKI A. J., CASTILHO R. F., VERCESI A. E. **Mitochondrial permeability transition and oxidative stress.** FEBS Letters 495 p. 12-15, 2001.

KRUTMANN, J., SCHROEDER, P. **Role of Mitochondria in Photoaging of Human Skin: The Defective Powerhouse Model.** J InvestigDermatolSymp Proc. 2009.

LANGLEY-EVANS, S.C., WELHAM, S.J., SHERMAN, R.C. & JACKSON, A.A.. **Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension.** Clin Sci (Lond) 91, 607–615, 1996.

LECOUTEUR, D.G. COGGER, V. C., MARKUS, A. M. **Pseudocapillarization and associated energy limitation in the aged rat liver.** Hepatology 33: 537–543, 2001.

LEANDRO, C. G., AMORIM, M.F.,HIRABARA, S.M., CURI, R., DE CASTRO, R.M. **Pode a atividade física materna modular a programação fetal induzida pela nutrição?**Rev. Nutr. 22(4): 559-569, 2009.

LEVIN B. E. **Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis.** Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 361, 1107–1121, 2006.

LING L.U., TAN K.B., LIU H., CHIU G.N. **The role of reactive oxygen species and autophagy in safinol induced cell death.** *Cell Death Dis.* Mar 10; 2; 129, 2011.

LUCAS, A. **Programming not metabolic imprinting.** *Am J Clin Nutr.* v.71, n.2, p.602, 2000.

LOPES DE SOUZA, S., R. OROZCO-SOLIS, *et al.* **Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake.** *Eur J Neurosci.* v.27, n.6, p.1400-8. 2008.

MATTEONI, C. A., YOUNOSSI, Z. M., GRAMLICH, T. *et al.* **Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity.** *Gastroenterology*, 116: 1413-1419. 1999.

MEHTA, K., VAN THIEL, D. H., SHAH, N. *et al.* **Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants.** *Nutrition Reviews*, 60: 289-293.2002.

MENDES-DA-SILVA, C., DE SOUZA, S. L., *et al.* **Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats.** *Arq Neuropsiquiatr*, v.60, n.4, p.928-31. 2002.

MEZEY, E. **Liver disease and protein needs.** *Ann. Rev. Nutr.* 2:21-50, 1982.

MINAI, L., MARTINOVIC, J., CHRETIEN, D., DUMEZ, F., RAZAVI, F., MUNNICH, A., RÖTIG, A. **Mitochondrial respiratory chain complex assembly and function during human fetal development.** *Molecular Genetics and Metabolism*, p.120–126. 2008.

MITCHELL, P. **Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism.** *Nature*, 191:144-8, 1961.

MORENO S. N., SILVA J, VERCESI AE, DOCAMPO R. **Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosomacruzi* is required for cell invasion.** J Exp Med:180(4):1535-40, 1994.

MORTENSEN, A. **maternal low protein diet has pronounced effects on mitochondrial gene expression in offspring liver and skeletal muscle; protective effect of taurine.** Journal of Biomedical Science 17(Suppl 1):S38, 2010.

NELSON D. L., COX M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry.** 3. ed. Worth Publishers; NewYork, USA, 2000.

NICHOLLS, D.G., ÅKERMAN, K.E.O. **Mitochondrial calcium transport.** Biochim Biophys Acta. 683:57-88, 1982.

OLIVEIRA, C.P.M.S.; COELHO, A.M.M.; BARBEIRO, H.V. ; LIMA, V.M.R.; SORIANO, F.;RIBEIRO, C.; MOLAN, N.A.T. ; ALVES, V.A.F.; SOUZA, H.P.; MACHADO, M.C.C.; CARRILHO, F.J.**Liver mitochondrial dysfunction andoxidative stress in the pathogenesis ofexperimental nonalcoholic fatty liverdisease.** Braz J Med Biol Res. 39(2). 2006.

OZANNE, S. E. **Metabolic programming in animals.** Br Med Bull, v.60, p.143-52. 2001.

PARK, K.S., KIM, S.K. *et al.* **Fetal and Early Postnatal Protein Malnutrition Cause Long-Term Changes in Rat Liver and Muscle Mitochondria.** The Journal of Nutrition, 3085-3090, 2003.

GLUCKMAN, P. D., *et al.*: **Developmental origins of health and disease: reducing the burden of chronic disease in the next generation.** Genome Medicine , 2:14, 2010.

PRUIS, M. G. M., EWIJK, P. A. VAN, SCHRAUWEN-HINDERLING, V. B., PLÖSCH, T. **Lipotoxicity and the role of maternal nutrition.** Acta Physiol, 10.1111, 2013.

PUTNEY, J. W, JR., BIRD GS. The signal for capacitative calcium entry. Cell.75(2):199-201, 1993.

RANTANEN, A., LARSON. N.G. **Regulation of mitochondrial DNA copy number during spermatogenesis.** Humam Reproduction, 15 (2): 86-91, 2000.

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

RIZZUTO, R., PINTON, P., CARRINGTON,W., FAY, F. S., FOGARTY, K. E., LIFSHITZ, L. M., TUFT,R. A., POZZAN, T. **Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses.** Science 280:1763–1766; 1998.

SAWAYA, A. L., G. DALLAL, *et al.* **Obesity and malnutrition in a Shantytown population in the city of Sao Paulo, Brazil.** Obes Res, v.3 Suppl 2, p.107s-115s. 1995.

SAWAYA, A. L., MARTINS, P. *et al.* **The link between childhood undernutrition and risk of chronic diseases in adulthood: a case study of Brazil.** Nutr Rev, v.61, n.5 Pt 1, p.168-75. 2003.

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

SELAKE, M.A. **Impaired oxidative phosphorylation in skeletal muscle of intrauterine growth-retarded rats.** Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 285, E130-E137, 2003.

SELZNER, M., N. SELZNER, W., JOCHUM. **Increased ischemic injury in old mouse liver: an ATP-dependent mechanism.** *LiverTranspl.* 13: 382–390, 2007.

SKULACHEV V. P. **Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades.** *FEBS Lett.* Feb 27;423(3), p. 275-80, 1998.

STARKOV, A. A.; POLSTER, B. M.; FISKUM, G. **Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax.** *J. Neurochem.* 83:220–228; 2002.

TOYOSHIMA, Y., TOKITA, R., OHNE, Y., HAKUNO, F., NOGUCHI, T., MINAMI, S., KATO, H., TAKAHASHI, S. **Dietary protein deprivation upregulates insulin signaling and inhibits gluconeogenesis in rat liver.** *Journal of Molecular Endocrinology* 45, 329–340, 2010.

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

TOCCHETTI, C. G., STANLEY, B. A., MURRAY, C. I., SIVAKUMARAN, V., DONZELLI, S., MANCARDI, D., PAGLIARO, P., GAO, W. D., VAN EYK, J., KASS, D. A., WINK, D. A. and PAOLOCCI, N. **Playing with cardiac “redox switches”: the “HNO way” to modulate cardiac function.** *Antioxid Redox Signal* 14: 1687–1698, 2011.

TURRENS JF. **Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain.** *Biosci Rep.*:17(1):3-8, 1997.

VASEVA, A. V., MARCHENKO, N. D., JI, K., TSIRKA, S.E., HOLZMANN, S., MOLL, U. M. **p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis.** *Cell* 149: 1536–1548, 2012.

VERCESI, A. E., BERNARDES, C. F., HOFFMANN, M. E., GADELHA, F. R., DOCAMPO, R. **Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of Trypanosoma cruzi in situ.** J Biol Chem. 266(22):14431-4, 1991.

VERCESI, A. E., HERMES-LIMA, M., MEYER-FERNANDES, JR., VIEIRA, A. **Calcium inhibition of the ATP in equilibrium with [32P]Pi exchange and of net ATP synthesis catalyzed by bovine sub mitochondrial particles.** BiochimBiophysActa.,1020(1):101-6, 1990.

VERCESI, A. E., HOFFMANN, M. E. **Generation of reactive oxygen metabolites and oxidative damage in mitochondria: the role of calcium.** Methods in Toxicology "Mitochondrial Dysfunction". In: Jones DP, Lash LH, editors. New York: Academic Press; 2, chapter21, 1993.

WALLACE, D. C., BROWN, M. D., LOTT, M. T. **Mitochondrial Genetics.** In: RIMOIN DL, CORMOR J. M, PYBRIZ R.E. Emery and Rimoin's Practice of Medical Genetics. Vol I. 3a ed. Churchill Livingstone. New York, pp: 277-299, 1997.

YAN, Y., LIU, J., WEI, C., LI, K., XIE, W., WANG, Y., CHENG, H. **Bidirectional regulation of Ca²⁺ sparks by mitochondria derived reactive oxygen species in cardiac myocytes.** Cardiovasc Res 77: 432–441, 2008.

ZAMZAMI, N., HIRSCH, T., DALLAPORTA, B., PETIT, P. X., KROEMER, G. **Mitochondrial implication inaccidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis.** J Bioenerg Biomembr.;29(2):185-93, 1997.

ZHANG, P., LIU, B., KANG, S. W., SEO, M. S., RHEE, S. G., OBEID, L. M. **Thioredoxin peroxidase is anovel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2.** J Biol Chem.;272(49):30615-8, 1997.

ZHENG, S., LI, C., NG, T. B., WANG, H. X. **A lectin with mitogenic activity from the edible wildmushroom *Boletus edulis*** *Process Biochemistry*.;42(12):1620-24, 2007.