



pósNUT
Pós-Graduação
em Nutrição

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Programa de Pós-Graduação em Nutrição

TALITTA RICARLLY LOPES DE ARRUDA LIMA

**Efeitos da atividade física voluntária materna sobre a bioenergética
mitocondrial, balanço oxidativo e metabolismo hepático da prole
submetida a uma dieta “ocidentalizada” pós-desmame**

Recife-PE

2021



Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Programa de Pós-Graduação em Nutrição

TALITTA RICARLLY LOPES DE ARRUDA LIMA

**Efeitos da atividade física voluntária materna sobre a bioenergética
mitocondrial, balanço oxidativo e metabolismo hepático da prole
submetida a uma dieta “ocidentalizada” pós-desmame**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, da Universidade Federal de Pernambuco, na área de concentração em Bases Experimentais, para obtenção do título de doutor.

Orientadora: Carol Virgínia Gois Leandro

Co-orientadora: Mariana Pinheiro Fernandes

Recife-PE

2021

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Lima, Talitta Ricarly Lopes de Arruda.
Efeitos da atividade física voluntária materna sobre a bioenergética mitocondrial, balanço oxidativo e metabolismo hepático da prole submetida a uma dieta ocidentalizada pós-desmame / Talitta Ricarly Lopes de Arruda Lima. - Recife, 2021.
113f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação Nutrição, 2021.
Orientação: Carol Virgínia Gois Leandro.
Coorientação: Mariana Pinheiro Fernandes.
Inclui referências e anexos.

1. Mitocondria; 2. Bioenergética; 3. Metabolismo. I. Leandro, Carol Virgínia Gois. II. Fernandes, Mariana Pinheiro. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

TALITTA RICARLLY LOPES DE ARRUDA LIMA

**Efeitos da atividade física voluntária materna sobre a bioenergética
mitocondrial, balanço oxidativo e metabolismo hepático da prole
submetida a uma dieta “ocidentalizada” pós-desmame**

Aprovada em: 31 / 08 / 2021.

Banca Examinadora

Profª. Drª Carol Virgínia Góis Leandro

Núcleo de Nutrição – Centro Acadêmico de Vitória/UFPE

Profª. Drª Elizabeth do Nascimento

Departamento de Nutrição - UFPE

Profª. Drª Wylla Tatiana Ferreira e Silva

Núcleo de Nutrição – Centro Acadêmico de Vitória/UFPE

Profª. Drª. Claudia Jacques Lagranha (Examinador Externo)

Núcleo de Educação Física e Ciência do Esporte - Centro Acadêmico de
Vitória/UFPE

Prof. Dr. Diorginis José Soares Ferreira (Examinador Externo)

Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF

RESUMO

Estudos prévios demonstram que a prática da atividade física materna (AFM) induz adaptações fenotípicas com repercussões no crescimento e desenvolvimento da prole. Por outro lado, o consumo de uma dieta ocidentalizada, em fases iniciais da vida está associado ao acúmulo de tecido adiposo, disfunção hepática e estresse metabólico. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da atividade física voluntária materna (AFVM) sobre a bioenergética mitocondrial, balanço oxidativo e metabolismo hepático da prole exposta a uma dieta ocidentalizada pós-desmame. Ratas da linhagem *Wistar* ($n=24$) foram colocadas em gaiolas de atividade física voluntária por um período de 30 dias para adaptação, durante toda a gestação e até o 14º dia de vida da prole onde o ciclo foi travado. As gaiolas são equipadas com ciclo ergômetro que mede grandezas físicas como: distância percorrida (Km/dia), tempo percorrido (min/dia) e estimativa do gasto calórico diário (km.s⁻¹.dia⁻¹). O período de adaptação serviu para classificar as mães em níveis de atividade física diária em: Inativa ($n=8$), Ativa ($n=8$) e Muito Ativa ($n=8$). Ao 21º dia de vida, a prole foi dividida de acordo com a dieta experimental em: dieta ocidentalizada (composição final em calorias de 20,18% de proteínas, 31,99% de lipídios e 47,82% de carboidratos) e grupo controle que recebeu dieta Labina® (composição final em calorias de 28,3% de proteínas, 10% de lipídios e 60,76% de carboidratos). Para as análises experimentais foi coletado tanto o tecido hepático das mães, no dia do desmame dos filhotes, bem como o fígado da prole aos 70 dias de vida. Foram avaliados parâmetros de bioenergética mitocondrial (respiração mitocondrial, inchamento, avaliação da transição de permeabilidade mitocondrial e produção de espécies reativas), biomarcadores de estresse oxidativo (níveis de malondealdeído-MDA, carbonilas e sulfidrilas-SH), atividade de enzimas antioxidantes (Superóxido dismutase-SOD, catalase-CAT e glutationa-S-transferase-GST), além da avaliação do sistema antioxidante não enzimático (níveis de glutationa reduzida-GSH, oxidada-GSSG e estado REDOX celular (GSH/GSSG)). Também foram avaliados o consumo alimentar, peso dos animais, do fígado, do tecido adiposo e a atividade de enzimas chave no metabolismo de carboidratos (fosfofrutoquinase 1-PFK1 e glicose-6-fosfato desidrogenase-G6PDH), lipídios (β -hidroxiacil-CoA desidrogenase- β -HAD e ácido graxo sintase-FAS) e do ciclo de Krebs (citrato sintase-CS). Em relação aos efeitos maternos da atividade física voluntária foi observada uma modulação positiva em parâmetros mitocondriais, com aumento do consumo de oxigênio e diminuição do inchamento mitocondrial. Biomarcadores de estresse oxidativo, como MDA e carbonilas, tiveram diminuição de acordo com o nível de AFVM, bem como aumento dos níveis de SH. O sistema de defesa antioxidante enzimático apresentou aumento da atividade da SOD, CAT e GST. O sistema de defesa antioxidante não-enzimático apresentou aumento dos níveis de GSH e do estado REDOX celular no grupo de mães ativas. Já na prole, nosso estudo avaliou parâmetros relacionados ao peso corporal dos animais, que foram maiores nos grupos que receberam dieta ocidentalizada, observado o mesmo para o tecido hepático. Entre os dados de tecido adiposo (subcutâneo, abdominal e visceral), o tecido adiposo visceral apresentou maior variação entre os grupos experimentais com aumento no grupo que recebeu dieta ocidentalizada. O consumo alimentar da prole que recebeu dieta ocidentalizada foi menor quando comparado aos

grupos controle, dentro do mesmo nível de AFVM, com destaque para a densidade calórica proveniente dos lipídios na dieta, que foi maior nos animais que receberam dieta ocidentalizada comparado com os que receberam dieta controle. Na avaliação da atividade de enzimas chave que atuam no metabolismo de carboidratos foi observado aumento da atividade da PFK1, bem como da G6PDH, na prole alimentada com dieta ocidentalizada cujas mães praticaram AFVM. No que diz respeito ao metabolismo lipídico hepático foi observado um aumento na atividade da FAS no grupo inativo que recebeu dieta ocidentalizada e diminuição nos grupos que receberam esse tipo de dieta, mas provenientes de mães que realizaram AFVM. A oxidação de ácidos graxos apresentou aumento na atividade da β -Had em função da atividade física materna nos grupos que receberam dieta ocidentalizada. Em relação ao ciclo de Krebs houve aumento da atividade da CS na prole que recebeu dieta ocidentalizada proveniente de mães que praticaram maior intensidade de AFVM. Assim, nossos resultados sugerem que a atividade física voluntária materna é capaz de modular vários parâmetros da bioenergética mitocondrial, balanço oxidativo e metabolismo hepático das ratas, de forma que a exposição a uma dieta ocidentalizada desde o período pós desmame da prole resulte em menores efeitos deletérios ao metabolismo energético durante a vida adulta.

Palavras chave: Dieta hiperlipídica, estresse oxidativo, metabolismo hepático, mitocôndria.

ABSTRACT

Previous studies demonstrate that the practice of maternal physical activity (MPA) induces phenotypic adaptations with repercussions on the growth and development of the offspring. On the other hand, consumption of a westernized diet in early stages of life is associated with the accumulation of adipose tissue, liver dysfunction and metabolic stress. The present study aimed to evaluate the effect of maternal voluntary physical activity (MVPA) on the mitochondrial bioenergetics, oxidative balance and hepatic metabolism of offspring exposed to a westernized post-weaning diet. Female Wistar rats (n=24) were placed in voluntary physical activity cages for a period of 30 days for adaptation, throughout pregnancy and until the 14th day of life of the offspring, where the cycle was stopped. The cages are equipped with an ergometer cycle that measures physical quantities such as: distance traveled (Km/day), time traveled (min/day) and estimated caloric burned (km.s⁻¹.day⁻¹). The service adaptation period to classify as mothers in daily physical activity levels: Inactive (n=8), Active (n=8) and Very Active (n=8). On the 21st day of life, the offspring was divided according to the experimental diet into: westernized diet (final calorie composition of 20.18% protein, 31.99% lipids and 47.82% carbohydrates) and group control that feeding the Labina® diet (final calorie composition of 28.3% from protein, 10% from lipids and 60.76% from carbohydrates). For the experimental analyses, we collected both the liver tissue of the mothers, on the day of weaning of the pups, as well as, the liver of the offspring at 70 days of life. Parameters of the mitochondrial bioenergetics (mitochondrial respiration, swelling, mitochondrial permeability transition and production reactive species production), oxidative stress biomarkers (malondealdehyde-MDA, carbonyls and sulfhydryl-SH levels), antioxidant enzymes (Superoxide dismutase-SOD, catalase-CAT and glutathione-S-transferase-GST) were evaluated, in addition to the evaluation of the non-enzymatic antioxidant system (levels of reduced glutathione-GSH, oxidized-GSSG and cellular REDOX status (GSH/GSSG)). Food intake, animal weight, liver, adipose tissue and key enzymes activity of the carbohydrate metabolism (phosphofructokinase 1 - PFK1 and glucose-6-phosphate desirogenase-G6PDH), lipids (β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase- β -HAD and fatty acid synthase-FAS) and of the Krebs cycle (citrate synthase-CS) were also analyzed. Regarding the maternal effects of voluntary physical activity, a positive modulation in mitochondrial parameters was observed, with increased oxygen consumption and decreased mitochondrial swelling. Oxidative stress biomarkers, such as MDA and carbonyls, decreased according to the level of MVPA, as well as, increased levels of SH. The enzymatic antioxidant defense system showed an increase in the activity of SOD, CAT and GST. The non-enzymatic antioxidant defense system showed increase in GSH levels and cellular REDOX state in the group of active mothers. In the offspring, our study evaluated parameters related to the animals body weight, which were higher in the groups that received Westernized diet, and the same was observed for the liver tissue. Among the adipose tissue data (subcutaneous, abdominal and visceral), the visceral adipose tissue showed greater variation between the experimental groups, with an increase in the group fed with westernized diet. The food consumption of the offspring that received westernized diet was lower when compared to the control groups within the same level of MPA, with emphasis on the caloric density from the lipids in the

diet, which was higher in animals that received westernized diet compared to those fed with control diet. In evaluating the activity of key enzymes that act on the carbohydrates and lipids metabolism, it was observed increase in the PFK1, as well as G6PDH, in offspring fed with Westernized diet whose mothers practiced MVPA. With regard to hepatic lipid metabolism, FAS activity increase was observed in the inactive group that received Westernized diet and decreased on the groups that received this diet type of diet, whose mothers practiced voluntary physical activity. Fatty acid oxidation showed increase in β -Had activity due to maternal physical activity in the groups that received Westernized diet. Regarding the Krebs cycle, there was CS activity increase in offspring fed with Westernized diet whose mothers practiced higher VPA intensity. Thus, our results suggests that APVM is able to modulate several parameters of the mitochondrial bioenergetics, oxidative balance and hepatic metabolism from female rats, so that exposure to the Westernized diet since post-weaning period of offspring results in less harmful effects to the energy metabolism during adulthood.

Keywords: Hyperlipidic diet, oxidative stress, liver metabolism, mitochondria.

*Aos meus pais, Maria Inez Lopes de Arruda Lima e José Ricardo de Lima Neto, e ao meu
irmão Thalison Ricardo Lopes de Arruda Lima por caminhar comigo, por sonhar comigo,
por cuidar de mim e por amar nas longas ausências.
A minha avó, Inez Lopes de Arruda, a Dona Diva (In memoriam), mesmo não estando mais
presente em corpo, tenho a certeza do seu apoio e de suas orações.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom da vida e que iluminou meus caminhos durante todos esses anos.

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

Mariana Fernandes, minha orientadora que é meu exemplo de profissional e de pessoa. Meu maior agradecimento, primeiramente pela oportunidade, confiança e acolhimento desde a graduação. A senhora foi fundamental na minha formação. Agradeço imensamente por toda paciência, esforço e generosidade, desde o período de elaboração desse projeto, de outros projetos, das colaborações e atividades de laboratório. Lavarei sempre comigo como referência e inspiração. Que Deus lhe abençoe imensamente. Muito obrigada por tudo.

Carol Leandro, agradeço por estar sempre disposta a ajudar, pela paciência de sempre e por todo conhecimento passado. Desculpa pelos erros. A admiro muito pela forma que trata e conduz a ciência. Uma verdadeira inspiração a todos os seus alunos, e me sinto honrada por fazer parte de grupo de aluno da professora Carol Leandro.

Claudia Lagranha, obrigada pelos conhecimentos, conversas e puxões de orelha. Discutir ciência com a senhora é algo inexplicável e surpreendente sempre. Agradeço por todas as orientações (a eterna co-orientadora), as oportunidades de estágio à docência, das aulas até a monitoria de bioquímica do exercício (da loucura da segunda graduação). A senhora sempre foi e será

para mim também uma referência e uma inspiração da pesquisa à docência. Cláudia, meu muito obrigada.

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

Agradeço ao meus colegas/amigos de laboratório (minha segunda casa), que fizeram, e/ou que agora fazem parte do Laboratório de Bioquímica Geral, Molecular e do Exercício (Cássia Andrade, Cristiane Freitas, Luciana Nascimento, Reginaldo Correia, Gizele Santiago, Diorginis Ferreira, David Filipe, Rudá Feitoza, Deisiane Correia, Allifer Rosendo, Nilson Bernardo, Wellington Braz, Ramon Nascimento, Aline Isabel, Alessandra Barbosa, Yuri Uei, Priscilla Rosa, Anderson Pedroza, Vitória Interaminense, Aiany Simões, Maísa Menezes, Erica Lima, Diego Araújo, Tercya Araújo, Roger dos Santos, Shirley Sousa, Alex Emiliano), que me ajudaram direta ou indiretamente em meus experimentos. Agradeço pelos momentos divertidos, pelos momentos de concentração no laboratório, pela amizade que construímos, sendo esta que ultrapassa os limites do laboratório. E também pelos dias tristes, pelos dias de bronca, que nos fizeram aprender muito e crescer como seres humanos e profissionais. Tenho muito orgulho de fazer parte dessa equipe, aprendi e ainda vou aprender muito mais com todos vocês. Levarei um pouco de cada um sempre comigo. Desejo o melhor a todos, e a vocês meu eterno carinho e agradecimento.

Agradeço a Gerffeson Martins, por todo amor, carinho, amizade, companheirismo, cuidado e paciência. E mesmo diante de todo estresse, sempre está disposto a ajudar e sempre traz consigo uma palavra de conforto aos dias mais difíceis.

A todas as colaborações científicas que tive o prazer em participar e colaborar. A todos do Programa de Pós Graduação em Nutrição, que possibilitaram a realização do meu doutoramento. E aos muitos colegas que passaram por mim durante as disciplinas, muito obrigada por terem feito parte

desse momento da minha vida. Que seus caminhos sejam sempre abençoados por Deus. Sucesso a todos!

A todas as turmas, do Centro Acadêmico de Vitória e do Centro Universitário da Vitória de Santo Antão, que pude desenvolver experiências docente durante a pós-graduação. O aprendizado que pude adquirir e que venho tendo, contribuem/contribuíram diariamente para meu crescimento profissional e pessoal. Criatividade, paciência, equidade e responsabilidade com a educação são alguns dos componentes que prezo diariamente no meu trabalho e espero com a graça do senhor Deus continuar, pois a cada dia tenho a plena certeza que todas as escolhas foram certas, que cada esforço valeu e está valendo a pena, que os erros foram fundamentais. E que venham mais experiências.

As agências de fomento pelo financiamento deste projeto e bolsa de estudo.

E por fim, não poderia deixar de agradecer ao Centro Acadêmico de Vitória – UFPE, que por esses longos anos foi minha segunda casa. Aos professores e funcionários, que fizeram minha vida acadêmica e a experiência profissional ser incrível, essa é a palavra que expressa tudo que vivi. Minha eterna gratidão e um até breve.

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

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
CAT	Catalase
Ca ²⁺	Íon Cálcio
CCCP	Cianeto de carbonila m-clorofenil hidrazona
CsA	Ciclosporina A
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazine
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
DTNB	5,5'-dithiobiis (2 nitrobenzoic acid)
EGTA	Etileno glico-bis(b-aminoetil éter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético
EROs	Especies reativas de oxigênio
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotideo no estado reduzido
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa-S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ DCF-DA	Diacetato de diclorodihidrofluoresceína
HEPES	(Ácido N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanossulfônico])
K ⁺	Potássio

MDA	Malondialdeído
MOPS	3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo no estado reduzido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato no estado reduzido
nDNA	DNA nuclear
mM	Milimolar
mtDNA	DNA mitocondrial
O ₂ • ⁻	Ânion superóxido
PFK	Fosfofrutoquinase
pH	Potencial Hidrogeniônico
P _i	Fosfato inorgânico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PTP	Poro de transição de permeabilidade
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias Reativa ao ácido Tiobarbitúrico
TPM	Transição de permeabilidade mitocondrial
Δψ	Potencial elétrico
Δψ _m	Potencial elétrico de membrana mitocondrial

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos grupos experimentais de acordo com a atividade física diária (distância percorrida, gasto calórico e tempo de atividade) no cicloergômetro.....	48
Tabela 2: Composição da dieta de acordo com o total energético.....	48
Tabela 3. Peso do tecido hepático, tecido adiposo visceral e abdominal de ratas fêmeas que praticaram atividade física voluntária.....	61
Tabela 4. Avaliação do peso do tecido hepático e peso corporal dos filhotes.	70
Tabela 5. Avaliação do peso dos tecido adiposo subcutâneo, abdominal e visceral da prole.....	71
Tabela 6. Consumo de dieta da prole em gramas por semana.....	72
Tabela 7: Consumo de dieta em gramas e Kcal respectiva por macronutrientes.....	73

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Efeitos da dieta ocidentalizada sobre o metabolismo hepático	24
Figura 2 – Vias metabólicas da glicose e vias lipogênicas	26
Figura 3 - Estrutura mitocondrial	29
Figura 4 – Mitocôndria e suas principais funções.....	30
Figura 5 - Cadeia transportadora de elétrons e produção mitocondrial de ATP	31
Figura 6 - Sítios mitocondriais de produção de espécies reativas de oxigênio.	33
Figura 7 - Mecanismos de formação de espécies reativas e sistemas antioxidantes.	34
Figura 8. Sistema uniporter de cálcio mitocondrial	36
Figura 9 - Caminhos para captação de cálcio na mitocôndria	37
Figura 10 - Modelo ilustrativo para mostrar a participação do cálcio no estresse oxidativo e processos de morte celular.....	38
Figura 11. Modelo de atividade física voluntária materna em ratos Wistar.....	41
Figura 12. Dimensões da gaiola de atividade física voluntária	46
Figura13: Modelo experimental	48
Figura 14. Medida do consumo de oxigênio mitocondrial.....	51
Figura 15: Inchamento mitocondrial.....	52

Figura 16. Distância percorrida	58
Figura 17. Tempo de atividade física	59
Figura 18. Gasto calórico diário	59
Figura 19. Ganho de peso corporal das mães durante o período de adaptação, gestação e lactação	60
Figura 20. Capacidade respiratória mitocondrial	62
Figura 21. Inchamento mitocondrial	63
Figura 22. Biomarcadores de estresse oxidativo.....	65
Figura 23. Atividade do sistema antioxidante enzimático	66
Figura 24. Sistema antioxidante não enzimático.....	67
Figura 25. Atividade de Enzimas metabólicas no tecido hepático	69
Figura 26. Consumo de dieta na prole após o desmame.	71
Figura 27. Capacidade respiratória mitocondrial	75
Figura 28 Inchamento mitocondrial	76
Figura 29. Produção de espécies reativas (ER)	77
Figura 30. Biomarcadores de estresse oxidativo	78
Figura 31. Sistemas antioxidantes enzimáticos	79
Figura 32. Sistemas antioxidantes não enzimáticos	80
Figura 33. Atividade de enzimas metabólicas no tecido hepático da prole.....	83

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Dieta ocidentalizada e alterações metabólicas	23
2.2 Fígado: principais funções, plasticidade e metabolismo	25
2.3 Mitocôndrias: estrutura, funções metabólicas e bioenergética	29
2.4 Espécies reativas de oxigênio, sistemas antioxidantes e estresse oxidativo	32
2.5 Transição de permeabilidade mitocondrial e associação com doenças crônicas	36
2.6 Atividade física voluntária materna e seus efeitos a respostas ambientais	40
3 HIPÓTESE	44
4 OBJETIVOS	45
4.1 Objetivo Geral	45
4.2 Objetivos Específicos	45
4.2.1 Avaliar nas mães:	45
4.2.2 Na prole:	45
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
5.1 Animais	47
5.2 Protocolo de atividade física voluntária e dieta experimental	47
5.3 Coleta do tecido hepático para análises bioquímicas	50
5.4 Preparo do homogeneizado do tecido hepático para utilização nas técnicas bioquímicas	50
5.5 Isolamento das mitocôndrias hepáticas	50
5.6 Dosagem de proteína	50
5.7 Condições experimentais	51
5.8 Medida do consumo de oxigênio mitocondrial	51
5.9 Avaliação do inchamento e transição de permeabilidade mitocondrial (TPM)	52
5.10 Avaliação da produção de espécies reativas	53
5.11 Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica pela metodologia da substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	54
5.12 Medida dos níveis de oxidação de proteínas (Carbonilas)	54
5.13 Avaliação da atividade enzimática da Superóxido dismutase (SOD)	55
5.14 Avaliação da atividade enzimática da Catalase	55
5.15 Avaliação da atividade enzimática Glutationa Peroxidase (GPx) ...	55
5.16 Avaliação da atividade enzimática da Glutationa-S-Transferase ...	56

5.17 Dosagens dos níveis de glutationa reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)	56
5.18 Avaliação do conteúdo de Sulfidrilas-SH	56
5.19 Determinação da atividade da fosfofrutoquinase 1 (PFK1)	57
5.20 Determinação da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase ...	57
5.21 Determinação da atividade da β-hidroxyacil-CoA desidrogenase (β-HAD).....	57
5.22 Avaliação da atividade da citrato sintase	58
5.23 Análise estatística.....	58
6 RESULTADOS	59
6.1 Avaliação das mães.....	59
6.1.1 Classificação das mães.....	59
6.1.2 Ganho de peso corporal.....	61
6.1.3 Peso do tecido hepático e tecido adiposo (subcutâneo e visceral) no período que os filhotes foram desmamados	61
6.1.4 Avaliação da capacidade funcional da cadeia respiratória.....	62
6.1.5 Avaliação do inchamento mitocondrial e da transição de permeabilidade mitocondrial	64
6.1.6 Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo	65
6.1.7 Avaliação do sistema de defesa antioxidante enzimático	66
6.1.8 Avaliação do sistema de defesa antioxidante não enzimático	67
6.1.9 Avaliação da atividade de enzimas metabólicas.....	68
6.2 Avaliação na prole	71
6.2.1 Avaliação do peso do animal e peso do tecido hepático da prole	71
6.2.2 Peso do tecido adiposo (subcutâneo, abdominal e visceral)	71
6.2.3 Avaliação do consumo alimentar da prole	72
6.2.4 Avaliação da capacidade funcional da cadeia respiratória.....	75
6.2.5 Avaliação do inchamento mitocondrial e da transição de permeabilidade mitocondrial	76
6.2.6 Avaliação da produção de espécies reativas	77
6.2.7 Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo	78
6.2.8 Avaliação do sistema de defesa antioxidante enzimático	79
6.2.9 Avaliação do sistema de defesa antioxidante não enzimático	80
6.2.10 Avaliação de enzimas metabólicas da prole	82
7. DISCUSSÃO	85
7.1. Efeitos nas mães	85
7.2. Efeitos na prole.....	89
CONCLUSÕES	95

REFERÊNCIAS.....	96
ANEXO.....	110
ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA.....	110
ANEXO B – Publicações.....	111
Anexo B I – Publicação na temática da tese.....	111
Anexo B II – Publicação na temática da tese.....	112
Anexo B III – Publicação de artigo com colaboração.....	113
Anexo B IV – Publicação de Capítulo de livro.....	114

1 INTRODUÇÃO

A prevalência da obesidade vem aumentando no decorrer dos anos e tomando proporções de âmbito global. No ano de 2014, 41 milhões de crianças se encontravam com sobrepeso ou obesidade, devido às mudanças no padrão alimentar e baixos níveis de atividade física (WHO, 2016). Na África, o número de crianças com excesso de peso dobrou quando comparado aos anos de 1990 e 2014 (passando de 5,4 milhões para 10,3 milhões), verificando números alarmantes de crianças com sobrepeso e obesidade em países com uma baixa renda comparado aos países de renda alta (WHO, 2016).

No Brasil, observa-se uma transição nutricional e a inversão de padrões dietéticos, ocorrendo uma alta prevalência do consumo de alimentos com maior palatabilidade, ricos em gorduras e açúcares (SOUZA ADE *et al.*, 2016). Estes fatores parecem concorrer para o aumento da prevalência do sobrepeso e obesidade entre jovens. Estudos e pesquisas brasileiras revelam que a taxa de sobrepeso e obesidade aumentou cerca de 239% no Brasil, numa faixa temporal de aproximadamente 20 anos, e que mais de 15% da população brasileira entre 6 e 18 anos de idade estão com sobrepeso. Também foi observado em adultos acima dos 18 anos, excesso de peso numa frequência de 55,4%, com valor ligeiramente maior em homens (57%) do que em mulheres (53,9%) e taxa de obesidade com percentuais de 20,3% semelhantes para homens e mulheres (BRASIL, 2020).

O consumo inadequado de nutrientes, nomeadamente de lipídios e açúcares, pode causar um aumento no estresse oxidativo em tecidos-chave do metabolismo, como o fígado (BROCARDO *et al.*, 2012). Embora o organismo possa contar com defesas antioxidantes endógenas que incluem diversas enzimas e seus cofatores, o consumo de dieta hiperlipídica parece predispor ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, disfunção mitocondrial e inibição de genes antioxidantes no fígado (Singh *et al.*, 2016). Estudos têm verificado que a exposição a uma dieta com alto teor lipídico provoca um desequilíbrio nos sistemas antioxidantes de ratos tanto no período pós-desmame quanto na vida adulta (120 dias). Foi também observado aumento na

peroxidação lipídica e no conteúdo proteico, diminuição da atividade de enzimas do sistema antioxidante como a glutatona peroxidase e a glutatona-S-transferase, além de diminuição dos níveis de glutatona reduzida no tecido hepático de ratos adultos (NOEMAN, HAMOODABAALASH, 2011; MAZZOLI *et al.*, 2019).

O ambiente perinatal tem sido considerado crítico para o crescimento e desenvolvimento de órgãos e tecidos. Fatores genéticos e ambientais parecem afetar diretamente esses parâmetros. Alterações epigenéticas parecem explicar alguns mecanismos moleculares que podem resultar das alterações ambientais decorrentes de insultos que antecedem o período gestacional e as repercussões no fenótipo. Por exemplo, dietas hipocalóricas ou hipoprotéicas consumidas pelas mães podem alterar a trajetória de crescimento de sua prole ocasionando atraso nos reflexos neuromotores, distúrbios no comportamento alimentar e alto consumo de dietas palatáveis (ALHEIROS-LIRA *et al.*, 2015).

Por outro lado, a atividade física materna tem sido associada a efeitos positivos tanto para a mãe quanto para os filhotes (LEANDRO *et al.*, 2012; SANTANA MUNIZ *et al.*, 2014). A atividade física materna parece induzir o aumento da expressão de genes envolvidos na biogênese mitocondrial como o PGC-1 α e o SIRT3, e também como um promotor de inúmeros processos relacionados à regulação da dinâmica mitocondrial pelo marcador OPA1, em ratos submetidos a atividade física voluntária por 12 semanas (SANTOS-ALVES *et al.*, 2015). A atividade física materna, antes e durante a gestação/lactação, melhora parâmetros metabólicos a longo prazo na prole, incluindo melhor captação de glicose no músculo esquelético e tecido adiposo (CARTER *et al.*, 2012). Outros estudos demonstram que a atividade física voluntária melhora a função hepática, que inclui aumento do teor de citocromo c, aumento da atividade de enzimas da oxidação de ácidos graxos e enzimas mitocondriais minimizando a progressão de esteatose hepática (RECTOR *et al.*, 2008; THYFAULT *et al.*, 2009).

Nessa temática, estudos sobre os efeitos da atividade física voluntária materna são necessários a fim de se entender os mecanismos metabólicos que ocorrem no organismo quando submetido a um ambiente materno favorável;

como também compreender a influência dessas modificações quando a prole dessas mães for submetida a um ambiente obesogênico durante seu desenvolvimento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dieta ocidentalizada e alterações metabólicas

O crescente consumo de dietas ricas em gorduras e açúcares é o principal fator que contribui para o aumento do peso corporal e está diretamente relacionado a uma maior prevalência de doenças crônicas não transmissíveis, tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos (FUNGÍ, 2016). No Brasil, o fenômeno de transição epidemiológica levou a uma redução das taxas de desnutrição, e foi observado com o passar dos anos, aumento das taxas do ganho de peso considerando todas as faixas etárias independentemente do gênero (CASTRO *et al.*, 2019; VIGITEL, 2019).

Estudos de caráter epidemiológicos no Brasil vem apontando dados alarmantes a respeito da prevalência do sobrepeso e obesidade na população. Dados recentes do Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônica (VIGITEL) (BRASIL, 2020), do Estudo de Riscos Cardiovasculares em Adolescentes (ERICA) (BLOCH *et al.*, 2016) revelam que em 20 anos, a taxa de sobrepeso e obesidade aumentou cerca de 239% no Brasil. Mostrando uma prevalência de 15% da população brasileira com idades entre 6 e 18 anos com sobrepeso e adultos com idade a partir dos 18 anos, com excesso de peso numa prevalência de 55,4% e taxa de obesidade com percentuais de 20,3% semelhantes para homens e mulheres (BRASIL, 2020).

De acordo com a pesquisa de maior levantamento nutricional no Brasil, a Pesquisa de Orçamento Familiar (POF 2002/2003 e 2008/2009), mudanças relacionadas a nutrição foram muito importantes para explicar o aumento das taxas de sobrepeso e obesidade na população. Dessa forma, é visível o aumento do consumo das chamadas dietas ocidentalizadas (*Western diets*), que se caracterizam por conter quantidades excessivas de gorduras saturadas e açúcares simples. No entanto, esse aumento encontra-se dentro das faixas de ingestão de gordura recomendada (gordura saturada até 30%), equivalente a 10% do valor energético total (VET) diário, segundo recomendações da

Recommended Dietary Allowances - RDA (1989) (POF 2002/2003; 2008/2009; LEVY *et al.*, 2005).

As dietas e o estilo de vida com o passar da história da humanidade são bem descritas na literatura como agentes causadores de modulações metabólicas, que podem acarretar, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), resistência à insulina, estresse oxidativo, entre outras consequências fisiológicas (SAMUEL, 2012; KOPP, 2019). Inclusive já existem estudos mostrando que dietas ocidentalizadas podem induzir distúrbios psiquiátricos, com mudanças severas de humor e cognição, quadros de hiperatividade e impulsividade, assemelhando bastante a episódios relacionados a síndromes do espectro autista (STREKALOVA *et al.*, 2015; VENIAMINOVA *et al.*, 2017).

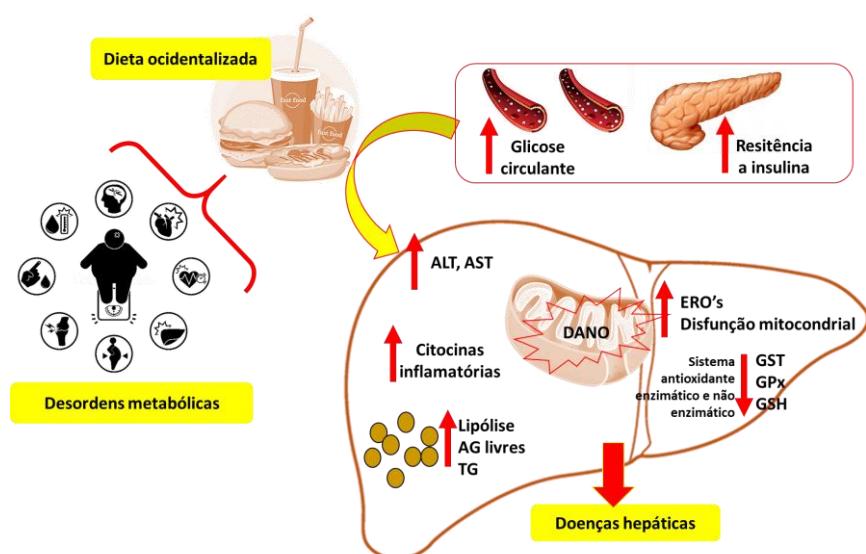
Mudanças de hábitos dietéticos maternos e também na prole tem sido estudados em modelos animais. Um estudo com dieta baseada nas recomendações da pesquisa de orçamento familiar (POF), ofertada durante a gestação e lactação afetou de forma negativa no processo de crescimento e desenvolvimento da prole (CARVALHO *et al.*, 2013). Um outro estudo também avaliou os efeitos da oferta de uma dieta ocidentalizada (Kcal% = lipídios 31%, 20% proteínas e 49% carboidratos) seguindo estudos prévios de Ferro Cavalcanti *et al.*, (2013), durante a gestação e lactação, e observou alterações na ingestão alimentar e aumento no perfil para risco metabólico na idade adulta (FERRO-CAVALCANTI, 2014).

Achados na literatura vem cada vez mais abordando os efeitos de dietas ocidentalizadas com disfunções metabólicas. Simkiss observou que a quantidade de lipídios da dieta pode afetar a composição de membrana biológica e funções envolvidas nos processos de sobrevivência e morte celular (SIMKISS, 1998). A oferta de dietas com 30% de gordura causou modificações nas funções e características da membrana mitocondrial do fígado de ratos adultos da linhagem *Wistar* (AOUN *et al.*, 2011). Em camundongos, Veniaminova *et al.* (2020) observou que a oferta de uma dieta ocidentalizada (41% de lipídios, 40% de carboidratos e 17% de proteínas), causou uma diminuição na tolerância a glicose e a insulina e aumento de marcadores de

lesão hepática (AST e ALT), mostrando uma predisposição a doenças hepáticas e síndrome metabólica (VENIAMINOVA, et al., 2020) (Figura 1).

Um estudo com camundongos adultos (C57BL/6) explorou os mecanismos da esteatose hepática não-alcoólica induzida por dieta rica em gordura durante 20 semanas, com foco em processos de sinalização do TACE/TNF- α (enzima conversora do fator de necrose tumoral α) e observou que a dieta com alto teor de lipídios está relacionada ao aumento de distúrbios metabólicos que promovem aumento de citocinas pró-inflamatórias e acabam induzindo o acúmulo de lipídios no tecido hepático (MINXUAN et al., 2019).

Figura 1. Efeitos de dieta ocidentalizada sobre o metabolismo e balanço oxidativo hepático



FONTE: LIMA, 2021.

As abreviaturas da figura correspondem: ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; ERO's: espécies reativas de oxigênio; GST: glutationa-s-tranferase; GPx: glutationa peroxidase; GSH: glutationa reduzida; TG: triglycerídeos.

2.2 Fígado: principais funções, plasticidade e metabolismo

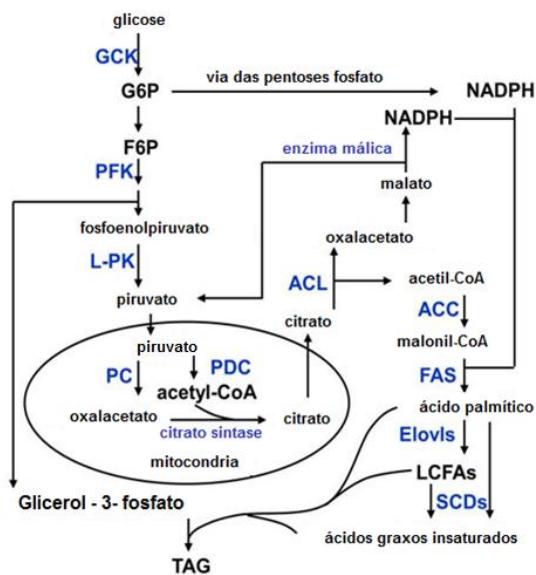
O fígado é um importante órgão que atua no desempenho de vários processos fisiológicos, que incluem desintoxicação, síntese de proteínas,

equilíbrio da homeostase de glicose e metabolização de vários nutrientes (GODFREY, INSKIPHANSON, 2011; GEBHARDT e MATZ-SOJA, 2014). Além disso, esse órgão apresenta uma grande capacidade de se regenerar a partir de diferentes graus de lesões. A maioria das funções metabólicas e de síntese são realizadas pelos hepatócitos, que representam cerca de 60% das células total do fígado e 80% do volume do órgão (MIYAJIMA, TANAKAITOH, 2014).

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

Através do processamento e distribuição no metabolismo, o fígado oferece combustíveis e precursores para outros tecidos em concentrações apropriadas de nutrientes, via corrente sanguínea (RUI, 2014). Para isso, esse órgão possui uma flexibilidade metabólica excepcional, responsável por funções secretoras (bile, eletrólitos, fosfolipídios e colesterol) e excretoras (hormônios esteroides, bilirrubina, cálcio, drogas metabólicas), como também atua no processamento de carboidratos através da glicólise (Figura 2), glicogênese, glicogenólise, gliconeogênese, também atua no metabolismo proteico, síntese de uréia e metabolismo lipídico pelos processos de lipogênese (Figura 2), oxidação de ácidos graxos, síntese de lipoproteínas, colesterol e fosfolipídios (MITRA, 2009; KONIG, 2012; RUI, 2014; HAN, 2016).

Figura 2 – Vias metabólicas da glicose e vias lipogênicas



As abreviaturas da figura correspondem NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (estado reduzido); FAS (ácido graxo sintase); ACC (acetil CoA carboxilase); G6P (glicose-6-fosfato desidrogenase; PFK (fosfofrutoquinase); ACL (ATP citrato liase); GCK(glicoquinase); L-PK (piruvato quinase isoforma L); PDC (complexo piruvato desidrogenase); PC (piruvato carboxilase). Faltou inserir o significado de Elovl, LCFAs e SCDs.

Fonte: Adaptada de HAN, 2016.

Na via glicolítica destacamos o papel da fosfofrutoquinase 1 (PFK), como uma das enzimas chaves que regula essa via metabólica e que catalisa a reação de transferência de uma molécula de fosfato, para formação de frutose-1,6-bifosfato, sendo parte da fase preparatória da glicose gerando custo metabólico (NELSON e COX, 2014; SAWAYA, 2018). Outra via relacionada ao metabolismo da glicose que merece destaque é a via das pentoses fosfato, controlada pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, enzima que catalisa a primeira etapa da via das pentoses, conhecida por ser uma via de fornecimento de substratos como NADPH e pentose fosfato. O NADPH podendo ser utilizado para biossíntese de ácidos graxos, como também participa do ciclo das glutationas (GSH e GSSG), já as pentoses fosfato participam da síntese de ácidos nucléicos (NELSON e COX, 2014).

Em relação ao metabolismo lipídico, a β -oxidação é uma via metabólica que irá consistir na oxidação de ácidos graxos para conversão em Acetil-CoA. Durante o processo de β -oxidação são liberados íons H⁺ e elétrons, reduzindo flavoproteínas NAD⁺ e FAD em NADH⁺ + H⁺ e FADH₂, para utilização pela cadeia respiratória. Sendo a enzima β -Hidroxiacil-Coa desidrogenase a terceira enzima regulatória da β -oxidação de ácidos graxos, ela desidrogena o L- β -hidroxiacil-CoA e forma o β -cetoacil-CoA, com liberação de NADH + H⁺ (STRYER, 2004; NELSON e COX, 2014). Estudo clínico associa disfunções hepáticas e musculares, bem como alteração de composição corporal a deficiências dessa enzima (HAGLIND *et al.*, 2013).

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

Os processos de síntese endógena de ácidos graxos, são catalisados pela ação de uma enzima anabólica, a ácido graxo sintase (FAS). Essa enzima atua através de precursores como acetil-CoA, malonil-CoA e NADPH (NELSON e COX, 2014). A atividade da enzima pode afetar a oxidação de ácidos graxos através do PPAR α , um mediador importante de resposta de jejum no fígado (JENSEN-URSTAD, 2012), pois sintetiza lipídios armazenados em gotículas ou secretados em VLDL no estado alimentado. A avaliação da FAS é muito importante em estudos que utilizam modelos experimentais com manipulações dietéticas, como dietas hiperlipídicas, e avaliam suas repercussões no metabolismo energético hepático.

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

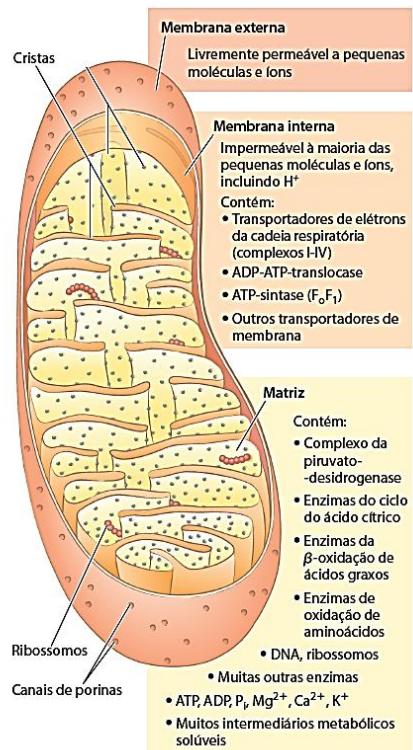
incluindo, doenças hepáticas gordurosa não alcoólica e diabetes tipo 2, por exemplo (RUI, 2014).

A literatura tem mostrado que as mitocôndrias hepáticas desempenham papéis importantes no metabolismo energético e em situações de desordens metabólicas, como esteatose e doenças hepáticas gordurosa não-alcoólica (GALLOWAY *et al.*, 2014; KORS *et al.*, 2018), são observadas modificações na morfologia mitocondrial que podem prejudicar a bioenergética hepática (GALLOWAY *et al.*, 2014; PUTTI *et al.*, 2015; MINXUAN *et al.*, 2019).

2.3 Mitocôndrias: estrutura, funções metabólicas e bioenergética

As mitocôndrias são organelas essenciais para a célula, sendo responsáveis pela produção da energia celular, através da forma de adenosina trifosfato (ATP) pelo processo de fosforilação oxidativa, sinalização celular, apoptose e crescimento celular (HATEFI, 1985; TAANMAN, 1999; LEVERVE, 2007; MEJIA e HATCH, 2016). Possuem membrana dupla que permitem um arranjo seletivo de proteínas, nucleotídeos e coenzimas. A membrana externa que encontra-se em contato com o citosol e a membrana interna contém invaginações que se projetam para dentro e definem a matriz da organela, essa membrana interna possui uma alta impermeabilidade que é controlada por transportadores específicos e canais altamente regulados (KALUDERCIC e GIORGIO, 2016) (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura mitocondrial



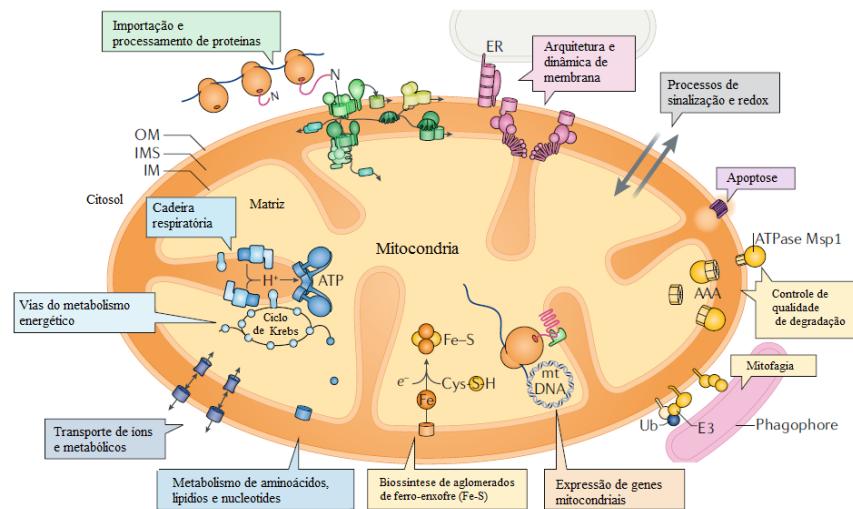
Fonte: Adaptada de Nelson e Cox, 2011.

Conhecidas há mais de séculos, por serem organelas dinâmicas, as mitocôndrias se tornaram um importante tema de pesquisa dentro da biologia experimental (ERNSTER e SCHATZ, 1981; YIN e CADENAS, 2015). De acordo com a hipótese endossimbiótica, as mitocôndrias surgiram pela imersão de eubactérias aeróbicas, coincidindo com a origem das células eucarióticas (MARGULIS, 1970; MARGULIS *et al.*, 1970; GRAY, BURGERLANG, 1999). Como um forte objeto de estudo, a complexidade dessa organela pode ser resumida como uma rede que intersecta e integra sinais e vias intracelulares que tem uma importância crítica na homeostase celular, incluindo participação na β-oxidação de ácidos graxos, participação no ciclo do ácido cítrico e do ciclo da ureia, além do controle intracelular de Ca²⁺, regulação de sinalização de

morte celular, entre outras atividades (Figura 4) (D'AQUILA, BELLIZZIPASSARINO, 2015; PFANNER, WARSCHIEDWIEDEMANN, 2019).

Estudo funcional e proteômico mostrou que as mitocôndrias possuem uma maquinaria complexa e muito dinâmica (PFANNER, WARSCHIEDWIEDEMANN, 2019). Nas mitocôndrias, seu próprio sistema genético, que inclui um DNA mitocondrial (mtDNA) circular, o qual codifica os genes de 13 polipeptídeos que são traduzidos nos ribossomos mitocondriais para formação das unidades estruturais dos complexos enzimáticos presentes na matriz mitocondrial, que incluem 7 dos 46 polipeptídeos do complexo I (NADH desidrogenase), 1 polipeptídeo dos 11 do complexo III (complexo bc₁), 3 dos 13 polipeptídeos do complexo IV (citocromo c oxidase) e 2 das 16 proteínas do completo V (ATP sintetase). O DNA nuclear (nDNA) possui códigos para outras proteínas mitocondriais, que incluem as 4 subunidades que formam o complexo II (succinato desidrogenase), proteínas ribossomais mitocondriais, fatores de alongamento e outras enzimas mitocondriais (WALLACE, 2005; SCARPULLA, 2008).

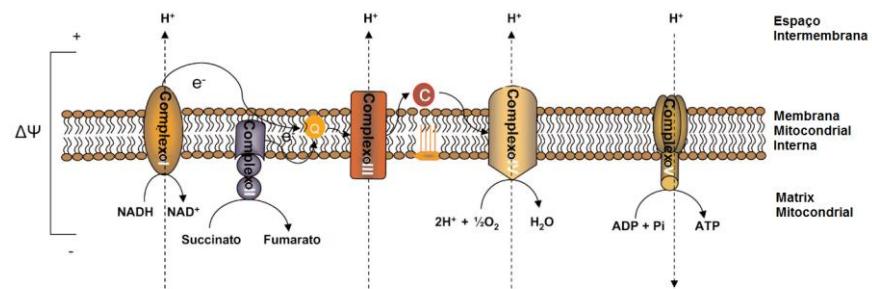
Figura 4 – Mitocôndria e suas principais funções



Fonte: PFANNER, WARSCHIEDWIEDEMANN, 2019

Os complexos respiratórios mitocondriais desempenham um papel crítico na produção de energia celular através do transporte de elétrons, que ocorre entre os complexos I e IV, com a extrusão de prótons pelos complexos I, III e IV para o espaço intermembranas, gerando um gradiente eletroquímico ($\Delta\psi$) entre o espaço intermenbranar e a matriz mitocondrial, e através do complexo V (ATP sintase) a maior parte desses prótons retornam a matriz mitocondrial gerando força próton motriz para síntese de ATP a partir da ADP+Pi (ENNS, 2003; BAYIR e KAGAN, 2008; HAN *et al.*, 2017) (Figura 5).

Figura 5 - Cadeia transportadora de elétrons e produção mitocondrial de ATP.



Cadeira transportadora de elétrons mitocondrial. O fluxo de elétrons é acoplado pela transferência de prótons que ocorre através da membrana mitocôndria, produzindo um gradiente eletroquímico ($\Delta\psi$).

Fonte: Adaptado de Baylr, 2008.

2.4 Espécies reativas de oxigênio, sistemas antioxidantes e estresse oxidativo

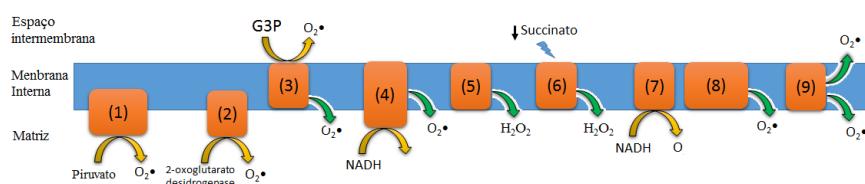
A energia produzida nas mitocôndrias depende da força próton-motriz gerada pelo gradiente eletroquímico da cadeia transportadora de elétrons (CTE), responsável por transferir elétrons de cofatores reduzidos como NADH e FADH₂, derivados do ciclo de Krebs ou da β -oxidação (MELOV, 2000). Quando a CTE torna-se saturada com elétrons, os mesmos podem passar diretamente pelos complexos I e III, gerando assim o O₂[•] (ânion superóxido),

que pode ser reduzido a um radical hidroxila (OH^-) um agente potencialmente mais oxidante, que o $\text{O}_2\cdot$. Estima-se em nível fisiológico que entre 0,2 e 2% do oxigênio gerado seja convertido em espécies reativas de oxigênio (EROs) mitocondriais (MELOV, 2000; MELOV *et al.*, 2000; BEVILACQUA *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2016; FERREIRA, D. J. *et al.*, 2016).

A geração dessas EROs nas mitocôndrias pode acontecer em pelo menos 9 sítios (Figura 6), no piruvato desidrogenase (1), cuja taxa de produção está ligada ao aumento da razão $\text{NAD(P)H}/\text{NAD(P)}^+$ (BRAUTIGAM *et al.*, 2009; FISHER-WELLMAN *et al.*, 2013; AMBRUS *et al.*, 2015); a enzima mitocondrial 2-oxoglutarato desidrogenase (2), que pertence ao ciclo de Krebs, produz EROs pela oxidação do NADH (STAROV *et al.*, 2004; TRETTER, SIPOSADAM-VIZI, 2004); glicerol 3-fosfato desidrogenase (3), uma coenzima na membrana mitocondrial interna, que transfere fatores citosólicos para a cadeia transportadora de elétrons (TRETTER, SIPOSADAM-VIZI, 2004; TRETTER *et al.*, 2007; ORR *et al.*, 2012); flavoproteína oxidoreductase Q (4), responsável por doar elétrons para ubiquinona, aumentando a capacidade de escape dos elétrons (STPIERRE, 2002; PEREVOSHCHIKOVA, 2013); monoaminas oxidase (5) (MAO), uma flavoenzima que pode ter seu grupo prostético reduzido a aldeído e amônia e em seguida oxidado para formação do H_2O_2 (TIPTON *et al.*, 2004; TONINELLO *et al.*, 2004; YOUDIM, EDMONDSON TIPTON, 2006; DI LISA *et al.*, 2009); flavina no complexo II (6), em condições de baixos níveis de succinato e uma atividade diminuída dos complexos I e III (TURRENS, 2003; QUINLAN *et al.*, 2012); flavina no complexo I (7), que sofre redução durante o fluxo de elétrons a partir da nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato no estado reduzido (NADH), produzindo $\text{O}_2\cdot$ (HERREO, 2000); ubiquinona no complexo I (8), que pode sofrer redução na presença de succinato, glicerol-3-fosfato ou acil-CoA, porém quando os elétrons sofrem um bombeamento inverso geram $\text{O}_2\cdot$ (LAMBERT, 2004; BRAND, 2010; CARDOSO, 2012); ubiquinona no complexo III (9), que através da ubiquinona reduzida transfere os elétrons para o citocromo c através do chamado ciclo Q, que resulta na formação de uma semi-ubiquitina que tem a capacidade de reduzir O_2 em $\text{O}_2\cdot$ (BROOKES *et al.*, 2004; FIGUEIRA *et al.*, 2013).

Curiosamente nesses locais, as reações (3) e (9) depositam O_2^\bullet no espaço intermembrana, e desta forma facilitam o acesso das EROs para o citosol, bem como na matriz mitocondrial juntamente com os produtos produzidos pelos sítios de produção (1), (2), (4), (5), (7), (8) (SENA e CHANDEL, 2012; PFANNER, WARSCHIEDWIEDEMANN, 2019).

Figura 6 - Sítios mitocondriais de produção de espécies reativas de oxigênio.



Cada sítio está enumerado de acordo com as especificações acima citadas no texto. As abreviaturas da figura correspondem a G3P (glicerol 3-fosfato desidrogenase), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), NADH (nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (estado reduzido) e O_2^\bullet (ânion superóxido).

Fonte: LIMA, 2016.

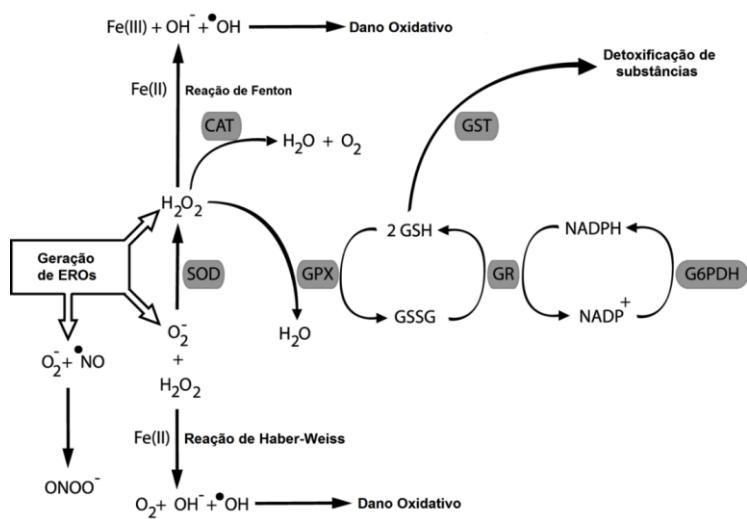
As mitocôndrias possuem uma capacidade antioxidante, que compreende sistemas não-enzimáticos e enzimáticos, os quais desempenham o papel de converter espécies reativas em moléculas menos ofensivas (HALLIWELL, 1994). Essa capacidade de conversão envolve produtos de reações que podem ser utilizados como substratos para utilização da próxima enzima (HALLIWELL, 2012). Com os O_2^\bullet formados, a enzima superóxido dismutase (SOD – Mn-SOD na matriz ou Cu/Zn-SOD no citosol) é responsável pela conversão/detoxificação do O_2^\bullet a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (OKADO-MATSUMOTO; FRIDOVICH, 2001, BRAND, 2010) (Figura 7).

O H_2O_2 formado ainda possui uma parcela de dano a célula, porém desempenha um importante papel de sinalizador (CONRAD, 2013), que desencadeia a ativação de enzimas para sua remoção ou através da reação de Fenton pode reagir com íons de cobre (Cu^+) ou ferro (Fe^{2+}) produzindo radicais hidroxil (OH^\bullet), que em excesso estão envolvidos em processos de peroxidação lipídica em membranas biológicas, oxidação de proteínas, nDNA e mtDNA e até mesmo podem participar de reações para formação do peroxinitrito ($ONOO^\bullet$).

) (HERMES-LIMA, 2004). Ainda em relação a atuação das enzimas no sistema de defesa antioxidante, a catalase (CAT) é responsável pela conversão do H₂O₂ em H₂O e O₂ (AEBI, 1984). Outra enzima que contribui para a neutralização do peróxido de hidrogênio e que executa a mesma função da CAT é a Glutationa Peroxidase (GPx) (RUSZKIEWICZ e ALBRECHT, 2015).

Já em relação ao sistema antioxidante não enzimático, a glutationa reduzida (GSH) pode estabilizar essas espécies reativas por ação própria, através da doação de prótons (H⁺) derivados a partir de nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato no estado reduzido (NADPH), ou desempenhar seu papel juntamente com a ação da glutationa S-transferase, que excreta xenobióticos tóxicos produzidos pela peroxidação lipídica ou fornecendo substratos para GPx (JACKSON, 2002; HERMES-LIMA; 2004; HALLIWELL, 2012; MARI, 2013) (Figura 7).

Figura 7 - Mecanismos de formação de espécies reativas e sistemas antioxidantes.



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

Fonte: Adaptado de Hermes-Lima, 2004.

A produção continua das EROs na célula é necessária para regulação de vários processos celulares, como por exemplo, crescimento e diferenciação celular, no entanto, o desequilíbrio entre as espécies reativas e os sistemas antioxidantes, com o predomínio de agentes oxidantes, pode gerar também um quadro conhecido como estresse oxidativo (SIES e CADENAS, 1985; HAMANAKA e CHANDEL, 2010; DIKALOV, 2011; TOCCHELLI *et al.*, 2011; SENA e CHANDEL, 2012; FIGUEIRA *et al.*, 2013; PFANNER, WARSCHIEDWIEDEMANN, 2019). O dano produzido por essas biomoléculas pode resultar numa disfunção do tecido acometido, gerando uma série de condições patológicas já relatadas na literatura, como câncer, distúrbios neurodegenerativos e envelhecimento precoce (LIN e BEAL, 2006; REUTER *et al.*, 2010; PFANNER, WARSCHIEDWIEDEMANN, 2019).

2.5 Transição de permeabilidade mitocondrial e associação com doenças crônicas

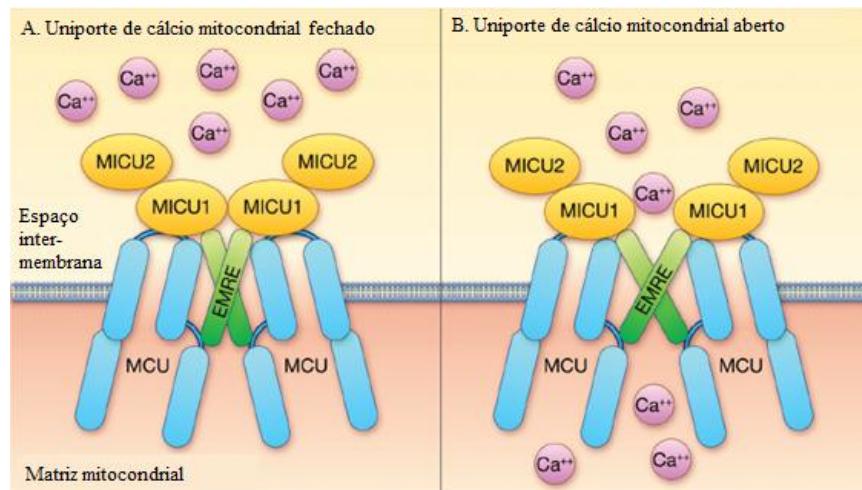
O cálcio (Ca^{2+}) é um importante segundo mensageiro, capaz de regular uma variedade de respostas celulares a curto e a longo prazo, como contração, secreção, expressão gênica, sobrevivência e morte celular, por meio de um sistema sofisticado que requer canais e íons e mudanças no fluxo do Ca^{2+} através da membrana plasmática e da membrana intracelular de organelas (SANTO-DOMINGO e DEMAUREX, 2010; BERRIDGE, 2012). O estado REDOX e a bioenergética mitocondrial podem ser determinados através de vários sistemas, como também os níveis intracelulares de Ca^{2+} podem contribuir para que seja gerado um desbalanço REDOX, evento que pode ser devido a ocorrência da transição de permeabilidade mitocondrial (TPM). A TPM pode resultar na abertura de um poro na membrana mitocondrial interna, conhecido como poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) podendo resultar num comprometimento da funcionalidade das mitocôndrias, inchamento substancial da organela, ruptura de membrana e extravasamento de conteúdos da matriz mitocondrial (KOWALTOWSKI, CASTILHOVERCESI, 2001; KOWALTOWSKI *et al.*, 2009).

Os sinais das concentrações intracelulares de Ca^{2+} podem ser regulados por duas organelas: a mitocôndria e o retículo endoplasmático (RE). O RE é responsável pelos estoques de cálcio das células, ao passo que a mitocôndria

decodifica sinais para liberação desses íons de Ca^{2+} (BERRIDGE, 2010; SANTO-DOMINGO e DEMAUREX, 2010). O acúmulo de cálcio pode levar à redução do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), com consequentes danos a organela por meio da indução do PTPM causando liberação de *citocromo c* e fatores pró-apoptóticos no espaço intermembranas (HALESTRAP, 2009; HALESTRAP e PASDOIS, 2009).

O PTPM é um complexo multicanal de proteínas responsáveis por manter o equilíbrio da cadeia respiratória. Alguns estudos conseguiram identificar que as mitocôndrias possuem um sistema de proteínas de transporte de Ca^{2+} para a organela: MCU (Uniporter de cálcio mitocondrial) (DE STEFANI *et al.*, 2011; CHAUDHURI *et al.*, 2013), MCUb (Uniporter de cálcio mitocondrial subunidade beta) (RAFFAELLO *et al.*, 2013), MICU 1 e 2 (Uniporter de cálcio mitocondrial 1 e 2) (CSORDAS *et al.*, 2013; PATRON *et al.*, 2014), EMRE (regulador de MCU) (SANCAK *et al.*, 2013) e MCUR (Uniporter de cálcio mitocondrial regulatório) (MALLILANKARAMAN *et al.*, 2015) (Figura 8).

Figura 8. Sistema uniporter de cálcio mitocondrial

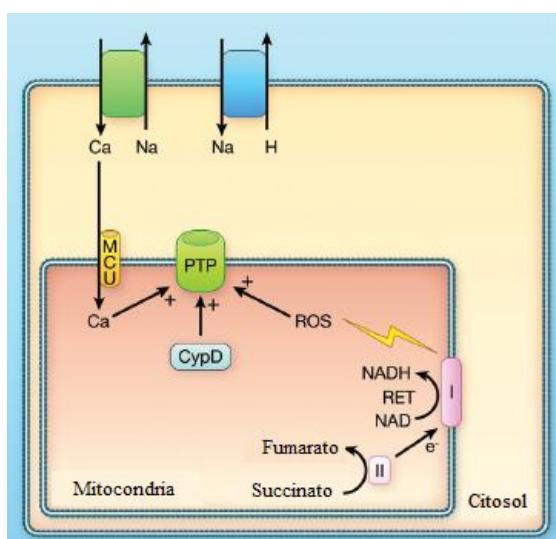


As abreviaturas correspondem: MCU (Uniporter de cálcio mitocondrial); MCUb (Uniporter de cálcio mitocondrial subunidade beta); MICU 1 e 2 (Uniporter de cálcio mitocondrial 1 e 2); EMRE (regulador de MCU); e MCUR (Uniporter de cálcio mitocondrial regulatório)

Fonte: Adaptado de Bauer and Murphy, 2020

Acredita-se que a captação de Ca^{2+} é realizada através desse sistema uniporter (UP) mitocondrial de cálcio, o qual é regulado pelo $\Delta\psi_m$ para a matriz mitocondrial. O efluxo de Ca^{2+} formado é devido a troca de Na^+ bombeado para fora da matriz em troca dos prótons bombeados pela cadeia respiratória, consumindo esse potencial de membrana (BROOKES *et al.*, 2004; HAMILTON *et al.*, 2018; BAUER e MURPHY, 2020). Um outro mecanismo de entrada de Ca^{2+} ocorre através do poro de transição, que em sua abertura sobrecarrega a mitocôndria podendo resultar muitas vezes em consequências patológicas (CROMPTON *et al.*, 1999; HAMILTON *et al.*, 2018; PAUPE e PRUDENT, 2018) (Figura 9).

Figura 9 - Caminhos para captação de cálcio na mitocôndria



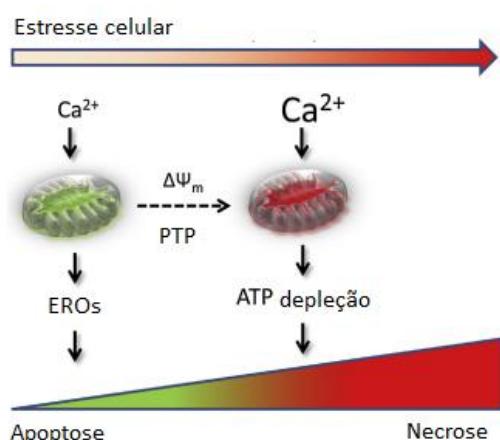
As siglas na figura significam: MCU (Uniporter de cálcio mitocondrial), PTP (poro de permeabilidade mitocondrial), $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (trocador sódio/cálcio) e Na^+/H^+ (trocador sódio/próton).

Fonte: Bauer and Murphy, 2020

Estudos vêm demonstrando que uma sobrecarga celular de Ca^{2+} está atrelada a danos mitocondriais importantes, associados ao desenvolvimento de patologias. A literatura mostra que o sistema de regulação neuronal em taxas alteradas de concentração de Ca^{2+} tem levado ao aumento da produção de espécies reativas comprometendo, por exemplo, a função de neurônios e

levando a quadros de apoptose associados ao desenvolvimento do Alzheimer (BERRIDGE, 2010; SUPNET e BEZPROZVANNY, 2010; BAUER e MURPHY, 2020). Estudos destacam um dano pelo Ca^{2+} na função de células acinares e ductais do pâncreas, acarretando pancreatite aguda, ativação prematura de enzimas digestivas e morte celular (PAUPE e PRUDENT, 2018) por necrose (CRIDDLE, 2016; MALETH e HEGYI, 2016) (Figura 10).

Figura 10 - Modelo hipotético para ilustrar a participação do cálcio no estresse oxidativo e processos de morte celular.



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

Fonte: Adaptado de Criddle, 2016.

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

O ambiente gestacional durante os períodos considerados críticos para o crescimento e desenvolvimento do organismo, vem sendo pontuado como um potencial modulador podendo influenciar no desenvolvimento de doenças crônicas em fases mais tardias da vida (GLUCKMAN e HANSON, 2004; SHELDON *et al.*, 2016; STANFORD *et al.*, 2017). O fenótipo materno

desempenha um papel essencial na saúde da prole, devido uma interação direta com a mãe por meio da placenta (POWER e SCHULKIN, 2013). Essa interação “mãe-feto” possibilita alguns caminhos de intervenção durante a gestação, como o consumo de uma dieta balanceada, bem como a promoção de atividade física (FALCAO-TEBAS *et al.*, 2020). Um estudo demonstrou que o atividade voluntária materna melhora homeostase metabólica e vias de sinalização em ratos jovens, podendo estar atrelado a melhora a bioenergética da prole, minimizando a suscetibilidade ao surgimento e/ou progressão de processos patológicos (KASPER *et al.*, 2021).

2.6 Atividade física voluntária materna e seus efeitos a respostas ambientais

Nas últimas décadas, a alta prevalência de doenças crônicas não-transmissíveis como obesidade, diabetes, hipertensão, dislipidemias, tem levado a população buscar hábitos de vida saudável, incluindo práticas regulares de atividade física (RUIZ *et al.*, 2007; HALLAL, DUMITH *et al.*, 2012). A definição de atividade física se dá, por qualquer movimento realizado pelo músculo esquelético que seja capaz de comandar um gasto energético acima de valores basais (CASPERSEN, 1985; LEANDRO *et al.*, 2009). O termo exercício físico, por sua vez, é utilizado na referência de atividades realizadas de forma sistemática, com controle de parâmetros como intensidade, e este quando realizado de forma regular, onde objetivos precisam serem alcançados, denomina-se treinamento físico (LEANDRO *et al.*, 2009).

A atividade física voluntária, descreve-se quando a locomoção não tem relação com sobrevivência, ou que não se faça uma relação com motivação por fatores externos para sua execução (GARLAND *et al.*, 2011). A atividade física voluntária pode ocorrer de diversas maneiras, que pode variar também nos quesitos intensidade e duração que afeta diretamente no gasto energético, com consequências fisiológicas (GARLAND *et al.*, 2011).

A literatura vem trazendo ao longo dos anos evidências que o exercício induz adaptações em marcadores mitocondriais, aumentando sua capacidade oxidativa e consequente melhor utilização de substratos para produção de ATP

(CONSTABLE et al., 1987; QUILES et al., 2001; DAUSSIN et al., 2012).

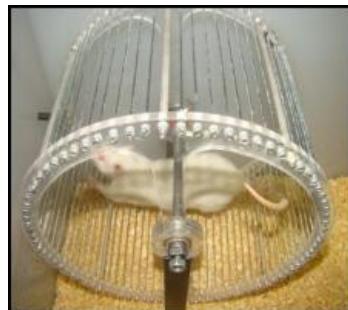
Estudos experimentais chamam atenção para protocolos de treinamento em animais, como, protocolos de resistência anaeróbia (KRISAN et al., 2004; ZANCHI et al., 2010; ANTONIO-SANTOS et al., 2016), protocolos de resistência aeróbias em esteiras (LEANDRO, 2010; FIDALGO, et al. 2010; FALCÃO-TEBAS et al., 2012), treinamento isométricos (LAC e CAVALIE, 1999), exercício em torre de escada (ROSA et al., 2011), considerados como protocolos forçados.

Comentado [CdM1]:

Estudos com camundongos demonstraram que a atividade voluntária em rodas na prole causou aumento do conteúdo, bem como função mitocondrial hepática, envolvendo enzimas chaves do metabolismo energético como β -HAD e citrato sintase, prevenindo mecanismos que poderiam levar a esteatose e doenças gordurosa hepática não alcoólica (RECTOR et al., 2008; RECTOR et al., 2011).

Assim, outros estudos passaram a desenvolver protocolos de atividade física voluntária (SANTANA MUNIZ, 2014) em modelos animais (Figura 11), observando principalmente a atividade realizada pela mãe e suas repercussões na prole (ROSA et al., 2011; CARTER et al., 2012). Evidências demonstram que filhotes na idade adulta, provenientes de mães que realizaram atividade física voluntária durante as fases pré gestacional, gestacional e até o 14º dia da fase de lactação, apresentaram boas respostas insulínicas no músculo esquelético e tecido adiposo (CARTER et al., 2012), sinalizando que o estilo de vida materno pode influenciar em parâmetros que envolvem metabolismo de carboidratos e ácidos graxo a longo prazo na prole.

Figura 11. Modelo de atividade física voluntária materna em rato Wistar



Fonte: SANTANA-MUNIZ, 2014

A pesquisadora SANTANA MUNIZ (2014) avaliou os efeitos da atividade física na prole de ratas ao desmame e observou um aumento no comprimento naso-anal da prole, bem como influência sobre a ingestão alimentar. Outro estudo demonstrou que a atividade física voluntária materna pode estar associada a redução do risco a doenças hepáticas na prole, quando submetida a dieta com alto teor de lipídios (SHELDON et al., 2016), bem como diminuição de riscos de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (STANFORD et al., 2015).

Dessa forma, vários estudos já comprovam segurança da realização da atividade física materna, com benefícios tanto para mãe como para a prole, a curto e longo prazo (PERALES et al., 2016; STANFORD, 2018). Mecanismos subjacentes parecem sustentar os efeitos benéficos da atividade física materna, sendo capazes de induzir alterações funcionais no cérebro, melhorando funções cognitivas na prole (FRAGOSO, et al., 2019).

Tem sido relatado que a atividade física materna tem relação com aumento de angiogênese, neurogênese, processos de aprendizagem e memória na prole (PARNPIANSIL et al., 2003; AKHAVAN et al., 2012). Estudos sugerem que o estresse induzido pelo exercício voluntário é menor, levando a efeitos melhores do exercício materno sobre a prole, quando avaliados fatores relacionados a aprendizagem em filhotes (M AKHAVAN et al., 2013), bem como afetando a propensão ao longo do curso da vida da prole para a prática

da atividade física (ECLARINAL *et al.*, 2016), tais achados podem ter impactos importantes no combate mundial contra o sedentarismo e doenças correlatas.

Embora alguns mecanismos não estejam totalmente elucidados, esses modelos abrem uma janela de estudos para entender melhor os mecanismos que regulam componentes metabólicos na prole exposta a um ambiente nutricional com elevado teor de açúcares e gorduras, provenientes de mães que realizaram atividade física voluntária materna em fases críticas do desenvolvimento.

3 HIPÓTESE

A atividade física voluntária materna favorece a bioenergética mitocondrial, o balanço oxidativo e o equilíbrio do ciclo glicose-ácido graxo da prole durante o desenvolvimento. Essas adaptações atenuam os efeitos adversos decorrentes de uma dieta ocidentalizada, ofertada desde o período pós-desmame, sobre o metabolismo energético hepático de ratos jovens.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da atividade física voluntária materna, durante períodos críticos do desenvolvimento, sobre a bioenergética mitocondrial, balanço oxidativo e metabolismo hepático de ratas e da sua prole (ratos machos aos 70 dias de vida) alimentada com uma dieta ocidentalizada ofertada desde o período pós-desmame.

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Avaliar nas mães:

- Nível de atividade física diária: distância percorrida (km), tempo de atividade (min);
- Ganho de peso corporal;
- Peso do tecido hepático e tecido adiposo (abdominal e visceral) no período que os filhotes foram desmamados;
- Bioenergética mitocondrial (capacidade funcional da cadeia respiratória e inchamento mitocondrial);
- Biomarcadores de estresse oxidativo (níveis de malonealdeído-MDA e carbonilas), atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase-SOD, catalase-CAT, glutationa peroxidase-GPx e glutationa-S-transferase-GST) e avaliação do sistema antioxidante não enzimático (níveis de glutationa reduzida-GSH, glutationa oxidada-GSSG e sulfidrilas- SH).
- Atividade de enzimas-chave de vias metabólicas da glicose, de ácidos graxos e ciclo de Krebs: fosfofrutoquinase 1-PFK1, glicose-6-fosfato desidrogenase-G6PDH, β -hidroxiacil-CoA desidrogenase- β -HAD, ácido graxo sintetase-FAS e citrato sintase-CS.

4.2.2 Na prole:

- Avaliar ganho de peso corporal durante a lactação e consumo alimentar pós-desmame;

- Avaliar peso do tecido hepático e tecido adiposo (subcutâneo, abdominal e visceral);
- Bioenergética mitocondrial (capacidade funcional da cadeia respiratória, inchamento mitocondrial e produção de espécies reativas);
- Biomarcadores de estresse oxidativo (níveis de malonealdeído-MDA e carbonilas), atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase-SOD, catalase-CAT, glutationa peroxidase-GPx e glutationa-S-transferase-GST) e avaliação do sistema antioxidante não enzimático (níveis de glutationa reduzida-GSH, glutationa oxidada-GSSG e sulfidrilas- SH);
- Avaliar a atividade de enzimas-chave de vias metabólicas da glicose, de ácidos graxos e ciclo de Krebs: fosfofrutoquinase 1-PFK1, glicose-6-fosfato desidrogenase-G6PDH, β -hidroxiacil-CoA desidrogenase- β -HAD, ácido graxo sintetase-FAS e citrato sintase-CS.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizadas 24 ratas albinas da linhagem *Wistar* (peso corporal 220-260g, idade entre 85-95 dias) provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da UFPE. Os animais foram mantidos em biotério de experimentação, em condições padronizadas e livre acesso à água e alimentação. O manejo e os cuidados para com os animais seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animal (CEUA) do Centro de Biociências da UFPE (nº 23076.017125/2017-47-Anexo A).

5.2 Protocolo de atividade física voluntária e dieta experimental

A gaiola de atividade física voluntária (GAFV) é feita de acrílico com as seguintes dimensões: 27 cm de largura, 34 cm de altura e 61 cm de comprimento (Figura 12A). Em uma das extremidades foi posicionado um cicloergômetro com 27 cm de diâmetro, composto por acrílico e raios em aço inoxidável (Figura 12B e C). Acoplado a gaiola e ao cicloergômetro há um sistema de monitoramento por sensor (ciclocomputador Cataye, model CC-VL810, Osaka, Japan) (Figura 12D-F). A atividade física das ratas foi avaliada pela movimentação do cicloergômetro, sendo quantificado diariamente através dos sensores que permite o registro das seguintes grandezas físicas: Distância percorrida (km), tempo de atividade (mim) e estimativa do gasto calórico (kcal) (Tabela 1).

Figura 12. Dimensões da gaiola de atividade física voluntária

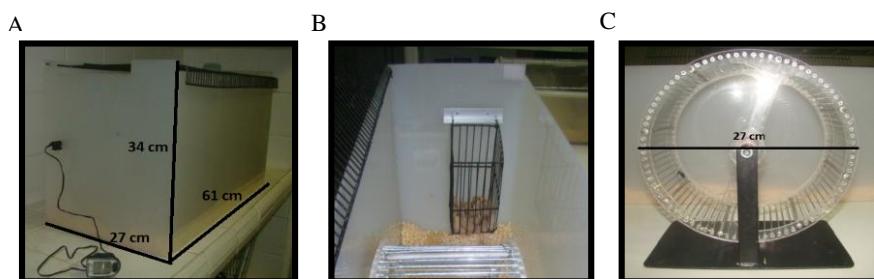




Figura 12. Dimensões da gaiola de atividade física voluntária (A); Gaiola de atividade física voluntária com cicloergômetro e comedouro (B), Cicloergômetro (C), Esquema do funcionamento do ciclocomputador com os sensores [Cataye, model CC-VL810, Osaka, Japan] (D); Posicionamento de um sensor na porção externa da GAFV, acoplado ao ciclocomputador (E); Visão interna dos sensores, um acoplado ao cicloergômetro e outro na GAFV (F).

As ratas nulíparas (60 dias de idade) ($n=24$) foram colocadas individualmente nas GAFV por um período de 30 dias para adaptação e após esse período, as ratas foram classificadas em dois grupos de acordo com o nível de atividade física diário: Inativo (I, $n=8$), Ativo (A, $n=8$) e Muito Ativo (MA, $n=8$) de acordo com os parâmetros e valores apresentados na tabela 1. As ratas foram colocadas em gaiola padrão de biotério feita de polipropileno (33x40x17cm) para o acasalamento e após a visualização da presença de espermatozoides na cavidade vaginal (MARCONDES, BIANCHITANNO, 2002), as ratas foram recolocadas individualmente nas GAFV para composição dos grupos experimentais. No dia do desmame, os filhotes receberam dieta ocidentalizada baseada na Pesquisa de Orçamento Familiar (IBGE, 2004) ou dieta Labina (Presence, Purina®). A dieta ocidentalizada é composta por 20,18% de proteína, 31,99% de lipídios (30,36% de ácidos graxos saturados, 33,7% de monoinsaturados e 35% de ácidos graxos poli-insaturados) e 47,82% de carboidrato (Tabela 1), a dieta Labina considerada dieta controle é composta por 28,3% de proteína, 10% de lipídios e 60,76% de carboidrato. (CARVALHO *et al.*, 2013; FERRO CAVALCANTE *et al.*, 2013) até atingirem a idade de realização do protocolo experimental (70 dias de vida).

Figura 13: Modelo experimental

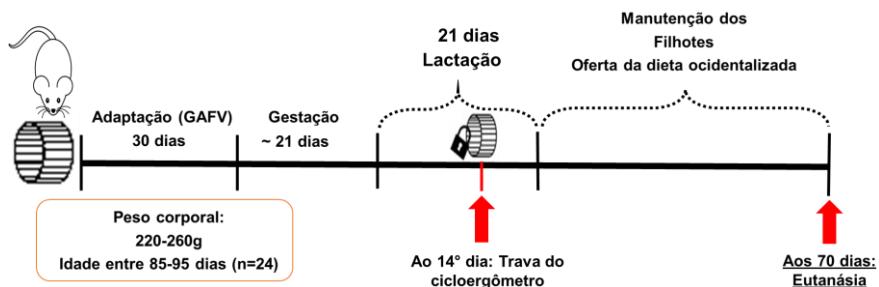


Tabela 1: Classificação dos grupos experimentais de acordo com a atividade física diária (distância percorrida, gasto calórico e tempo de atividade) no cicloergômetro.

Grupos experimentais	n	Distância percorrida (km.dia ⁻¹)	Gasto Calórico (kcal.dia ⁻¹)	Tempo de atividade (min.dia ⁻¹)
Inativo	8	< 1,0	< 10,0	< 20,0
Ativo	8	> 1,0 ≤ 5,0	> 10,0 ≤ 40,0	> 20 ≤ 120,0
Muito Ativo	8	>5,0	>40,0	>120,0

(MUNIZ, 2013)

Tabela 2: Composição da dieta de acordo com o total energético

Ingredientes	Dieta ocidentalizada /100g	Nutrientes	
			Dieta ocidentalizada/100g
Amido de milho	11.8	Proteína	20.8
Farinha de trigo	12	Proteína Animal	16
Biscoito maisena	7.2	Proteína Vegetal	4.8
Farinha de soja	8.5	Lipídios	14.7
Chiclete	0.1	Carboidrato	51.7
Banha de porco	5.5	Fibras (Celulose)	0.3
Margarina (65% de lipídios)	3.5	Mix Mineral	2.5
Creme de leite (20% de lipídios)	3.0	Mix Vitamínico	0.7
Caseína	20	Metionina	0.3
Sacarose	20	Bitartato de Colina	0.25
Óleo de soja	4.0	BHT	0.0014
Fibra (celulose)	0.3	Composição de acordo com o total energético (%)	
Mix Mineral	2.5	Proteína	20.18
Bitartato de colina	0.25	Lipídios	31.99
Metionina	0.3	Carboidrato	47.82
BHT	0.0014		
Cloreto de Sódio	0.36		
Total	100		
Energia Total (kcal/g)	4.2		

Nota: Adaptada de FERRO-CAVALCANTI, et al., 2014. Fonte: Dieta ocidentalizada adaptada da Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) 2002/2003; *Cálculos baseados na informação composição nutricional enviada pelo

fornecedor do produto e da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA). A composição centesimal foi analisado no Laboratório de Análise de Alimentos / UFPE.

5.3 Coleta do tecido hepático para análises bioquímicas

Todos os animais foram eutanasiados através do uso da guilhotina e em seguida, realizada dissecação para a remoção do tecido hepático, aos 70 dias de vida.

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

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

5.5 Isolamento das mitocôndrias hepáticas

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

5.6 Dosagem de proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método de BRADFORD (BRADFORD, 1976). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorbância do complexo proteína-corante. Este complexo absorve luz em comprimento de onda de 595 nm. A absorbância é considerada diretamente

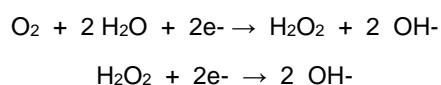
proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA (2mg/mL) foi utilizada como padrão.

5.7 Condições experimentais

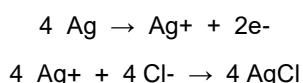
Os experimentos com mitocôndrias isoladas foram realizados a 28 °C em meio de respiração o qual continha 120 mM de KCl, 4mM de Hepes, 5mM de K₂HPO₄, 1mM de EGTA, BSA a 0,2%, com pH final de 7,2. Como substrato respiratório foi utilizada uma mistura de substratos para o complexo I da cadeia respiratória (2mM de malato, 1mM de piruvato, 1mM de α-cetoglutarato e 1mM de glutamato). Os experimentos foram feitos na presença e/ou ausência de 0,5 mM de EGTA.

5.8 Medida do consumo de oxigênio mitocondrial

O consumo de oxigênio mitocondrial foi medido polarograficamente utilizando-se um eletrodo do tipo OXIGY conectado a um oxígrafo (Hansatech Instruments®), em uma câmara de vidro fechada (1mL) e termostatizada (28oC), equipada com agitador magnético (ROBINSON; COOPER, 1970). Esse tipo de eletrodo compreende um cátodo de platina e um ânodo de prata, imersos numa solução eletrolítica (geralmente KCl). A superfície do cátodo é revestida por uma fina membrana de teflon ou polietileno, que são permeáveis ao oxigênio. Quando uma pequena voltagem é aplicada entre os eletrodos, a platina torna-se negativa em relação à prata, tornando-se polarizada. O oxigênio é então reduzido a peróxido de hidrogênio na superfície da platina, funcionando como acceptor de elétrons, segundo as reações:



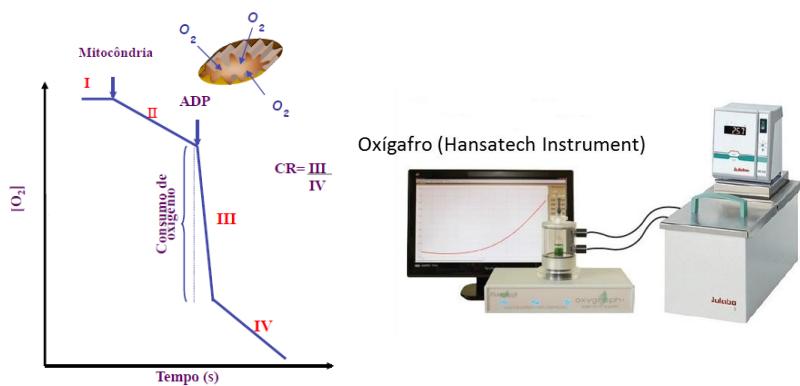
Na superfície do ânodo, a prata é oxidada gerando cloreto de prata, segundo as reações:



A corrente gerada pela diferença dos eletrodos é relacionada estequiométricamente à concentração de O₂ na superfície do cátodo. Os

impulsos elétricos são transmitidos ao oxígrafo, onde foi feita a leitura (Figura 14). Os resultados forma expressos em nmolO₂/min/mg de proteína.

Figura 14. Medida do consumo de oxigênio



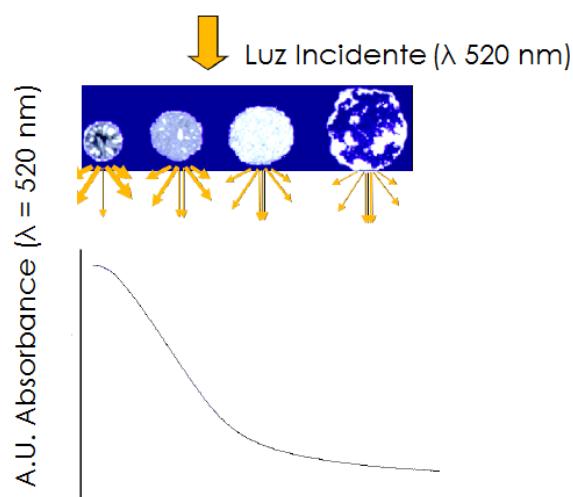
Estados da respiração mitocondrial representada por: I: adição se substratos a cuba do oxígrafo, II: adição de mitocôndria para avaliação do estado basal; III: consumo de oxigênio obtido pela adição de ADP exógeno, permitindo síntese de ATP pela ATP sintase pelo fornecimento de elétrons, representando o consumo máximo de oxigênio (Estado de fosforilação máxima); IV: estado de repouso, obtido pela adição de oligomicina, inibidor de ATP sintase, reduzindo o consumo de O₂.

5.9 Avaliação do inchamento e transição de permeabilidade mitocondrial (TPM)

As suspensões mitocondriais são turvas e espalham a luz incidente. A luz espalhada é uma função da diferença entre o índice de refração da matriz e do meio, e, qualquer processo que diminua esta diferença irá diminuir a luz espalhada e aumentar a transmitância (Figura 15) (NICHOLLS e AKERMAN, 1982). Assim, um aumento no volume da matriz mitocondrial, associado com a entrada de solutos permeáveis, resulta numa aproximação entre o índice de refração da matriz e do meio de reação com a consequente diminuição da luz espalhada. Esta propriedade das mitocôndrias fornece um método qualitativo simples para se estudar o fluxo de solutos através da membrana mitocondrial interna. As mitocôndrias são ideais à aplicação desta técnica porque sua matriz pode sofrer grandes variações de volume, já que a membrana interna sofre desdobramento de suas pregas. O acompanhamento espectrofotométrico da redução da absorbância a 520 nm (MACEDO et al, 1988) foi feito em um

espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA) utilizando mitocôndrias isoladas (0,5 mg de proteína/mL). Essa técnica também pode ser utilizada para avaliar o fenômeno de TPM, o qual resulta em inchamento da organela. A confirmação do aumento do volume mitocondrial em decorrência da TPM foi feita através do uso de inibidores do poro de transição de permeabilidade, como ciclosporina A (CsA) e EGTA (quelante de cálcio).

Figura 15: Inchamento mitocondrial.



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

Fonte: SILVA-FILHO, 2014.

5.10 Avaliação da produção de espécies reativas

A geração de espécies reativas (oxigênio e nitrogênio) mitocondriais foi monitorada espectrofluorimetricamente utilizando-se o probe diclorodihidrofluoreceina ($H_2DCF-DA$), da Sigma. O $H_2DCF-DA$ (5 μM), não é específico apenas para espécies reativas de oxigênio. A fluorescência foi monitorada em um espectrofluorímetro (FLUOstar Omega - BMG Labtech,

USA) usando comprimentos de onda de 488 nm para excitação e 525 nm para emissão (Figura 16) (LEBEL; ISCHIROPOULOS; BONDY, 1992; GARCIA-RUIZ et al., 1997). Os resultados foram expressos como unidades de fluorescência (F.U.) de DCF.

5.11 Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica pela metodologia da substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Para a dosagem de TBARS foi utilizada a técnica colorimétrica de Buege e Aust (BUEGE e AUST, 1978), sendo uma técnica muito utilizada para avaliar a lipoperoxidação, pois o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da LPO, entre eles o malondialdeído e outros aldeídos. Adicionou-se a uma alíquota (300 µg proteína) do homogeneizado ao ácido tricloroacético (TCA) a 30%, o material foi centrifugado a 1180g por 10 minutos, o sobrenadante retirado e adicionado ao ácido tiobarbitúrico a 0,73% que reage com os produtos da lipoperoxidação formando um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada por 15 minutos a 100°C e em seguida resfriada, utilizada para a leitura da absorbância a 535nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA), utilizando cubetas de quartzo. Os resultados foram expressos em µmol/mg de proteína.

5.12 Medida dos níveis de oxidação de proteínas (Carbonilas)

A avaliação da oxidação de proteínas dar-se através da reação com o composto 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) descrito por Zanatta (ZANATTA et al., 2013). As proteínas (80 µg proteína) foram precipitadas em TCA a 30% seguido de centrifugação a 1180g por 15 minutos, o pellet foi ressuspenso e adicionado DNPH 10mM dissolvido em HCl 2,5 N e incubado em local livre de luz a temperatura ambiente durante uma hora. Posteriormente, as proteínas precipitadas em adição ao TCA 20% foram centrifugadas e passaram por uma série de lavagens com tampão contendo acetato de etila e etanol, até o precipitado ser ressuspenso em cloridrato de guanidina e levado ao espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA) para leitura em um comprimento de onda de 370nm (37°C). Os resultados foram expressos em µmol/mg de proteína.

5.13 Avaliação da atividade enzimática da Superóxido dismutase (SOD)

A determinação da atividade da SOD foi feita de acordo com Misra e Fridovich (MISRA e FRIDOVICH, 1972). Homogenato de fígado (80 µg de proteína) foi incubado no tampão carbonato de sódio (0,05 %, pH 10,2, 0,1 mM de EDTA) em banho-maria a 37°C, antes da avaliação da atividade enzimática. A reação teve início pela adição de 20 µM de epinefrina (150 mM), em ácido acético (0,05%). A absorbância foi lida a 480nm por 3 min em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de proteína requerida para inibir a auto-oxidação de 1µmol de epinefrina por minuto.

5.14 Avaliação da atividade enzimática da Catalase (CAT)

A atividade da catalase foi monitorada de acordo com Aebi. O princípio do ensaio é baseado na determinação da constante k de decomposição de H₂O₂, que nas nossas condições de temperatura e pH foi definido como 4,6 x 10⁷. Assim, 0,3M de H₂O₂ foi adicionado a amostra (80µg de proteína), seguido de adição do tampão fosfato 50mM, pH 7,0 a 20°C, a absorção de decaimento foi monitorizada por 4 min a 240nm, em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína (AEBI, 1984). Uma unidade de catalase foi definida como quantidade de proteína requerida para converter 1µmol de H₂O₂ em H₂O por minuto (AEBI, 1984).

5.15 Avaliação da atividade enzimática Glutationa Peroxidase (GPx)

As amostras foram previamente preparadas, adicionando-se uma mistura de cianetos para inibir a atividade pseudo-peroxidase da hemoglobina, transformando-a em cianometamoglobinina. A atividade da glutationa peroxidase (GPx) foi monitorada pela diminuição de absorbância do NADPH a 340 nm, em um meio contendo: amostra (80µg de proteína), tampão fosfato (50mM) e EDTA (5mM), NADPH (0,28mM), Azida sódica (3,75mM), GSH (5mM) e Glutationa redutase (GR). A reação começou com 2,2mM de H₂O₂. A absorbância foi registrada por um período de 3 minutos, a 37°C, em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA). O consumo de NADPH foi monitorado por aproximadamente 5 minutos, com os resultados expressos em U/mg de proteína. Uma unidade de GPx foi definida

como quantidade de proteína requerida para oxidar 1 μ mol de NADPH por minuto (PAGLIA, 1967).

5.16 Avaliação da atividade enzimática da Glutationa-S-Transferase

A atividade da glutationa-S-transferase é diretamente proporcional a taxa de formação do composto DNP-SG (dinitro fenil S glutationa), podendo desta forma ser medida através do monitoramento da taxa de formação do composto. Em uma cubeta de quartzo de 1 mL, adicionou-se a amostra (80 μ g de proteína) ao tampão fosfato (0.1M) e EDTA (1mM), amostra, GSH (1mM) e CDNB (1mM). A absorbância (340nm) foi registrada por um período de aproximadamente 3 min com controle da temperatura (30°C), em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA). Os resultados foram expressos em U/mg proteína. Uma unidade de atividade enzimática da GST foi definida como a quantidade necessária para catalisar a formação de quanto 1 μ mol do composto DNP-SG por minuto (HABIG, PABSTJAKOBY, 1974).

5.17 Dosagens dos níveis de glutationa reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)

A quantificação dos níveis de GSH e GSSG foram realizadas segundo o método de Hissin e Hilf (1976). Em tampão 0,1M fosfato contendo 5mM de EDTA (pH 8.0) foi adicionado 100 μ g do homogenato do fígado e o fluorescente ortoftaldeido (1 μ M), e então incubado a temperatura ambiente, por 15 minutos e lido em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA), utilizando os comprimentos de onda de 350nm de excitação e 420nm de emissão. Para determinar os níveis de GSSG, a amostra foi incubada com 0.04M de N-ethylmaleimide por 30 minutos, seguido da adição de tampão NaOH a 0.1M. Em seguida, os mesmos passos de GSH foi executado para determinar GSSG (HISSIN e HILF, 1976). Os resultados foram expressos em μ M/mg proteína.

5.18 Avaliação do conteúdo total de Sulfidrilas-SH

O conteúdo de sulfidrila foi determinado a partir da reação com o composto DTNB (5,5'-dithiobis (2 nitrobenzoic acid) (ELLMAN, 1959). A alíquota do homogenato (300 μ g de proteína) foi incubada no escuro após a adição de DTNB 10mM e o volume final foi de 1 mL completado com tampão de extração pH 7,4 e realizada a leitura com absorbância (30°C) a 412nm em

espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína.

5.19 Determinação da atividade da fosfofrutoquinase 1 (PFK1)

A fosfofrutoquinase 1 é a enzima que catalisa a fosforilação da frutose-6-fosfato gerando frutose-1,6-bifosfato, a terceira reação da via glicolítica. A atividade máxima da enzima foi determinada segundo método descrito por Opie e Newsholme (1967) e Mansur (1963). O sistema de reação consistiu de Tris-HCl 50 mM pH8.0, MgCl_2 5 mM, EDTA 1.0 mM, mercaptoetanol 5 mM, NADH^+ 13 mM, ATP 20mM, AMP 10 mM, aldolase 5 mM, glicose-6-fosfato desidrogenase 5 mM e triose-fosfato-isomerase 5mM, ao qual foi adicionada a amostra (80 μg de proteína) em um volume final de 0,25 mL. O ensaio teve início pela adição do substrato (frutose-6-fosfato 1mM) e as determinações enzimáticas foi realizadas a 25°C, por 10 min, a 340 nm em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA) (OPIE e NEWSHOLME, 1967; Mansur et al, 1963). Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína.

5.20 Determinação da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) catalisa a primeira reação do shunt da hexose-monofosfato, a via das pentoses. A atividade máxima foi avaliada pelo método descrito por BERGMAYER et al. (1974). O sistema de reação enzimático continha Tris-HCl 86 mM, MgCl_2 6,9 mM, NADPH + 0,4 mM, glicose-6-fosfato 1,2 mM, Triton X-100 0.05 % (v/v), pH 7,6. Foi adicionado ao sistema de reação, 80 μg de proteína total e o ensaio iniciado pela adição do substrato (glicose-6-fosfato). As determinações enzimáticas foram realizadas a 25°C, por 4 min, a 340 nm em um volume final de 0,25mL, em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA). Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína.

5.21 Determinação da atividade da β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (β -HAD)

A atividade da β -HAD foi determinada segundo Ito (ITO et al., 2010). Essa enzima possui especificidade absoluta para o isômero L do substrato com

a hidroxiacila, converte a hidroxila em C-3 em uma cetona e gera NADH. Sua atividade foi avaliada em espectrofluorímetro a um comprimento de onda de 340nm, volume final de 0,25mL. Preparou-se uma solução de Imidazol a 50 mM, depois um mix de reação (Imidazol 50mM + EDTA 12mM + NADH 0,18mM). Incubou-se por um minuto o mix de Reação com 0,08 mg proteína de cada amostra e adicionou-se Acetoacetil-CoA 0.1mM para iniciar a reação. A leitura foi realizada a 340nm de absorbância a 30°C durante 4 min, em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA). Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$.

5.22 Avaliação da atividade da citrato sintase (CS)

A citrato sintase é uma enzima importante do ciclo de Krebs, pois catalisa a entrada de carbono neste ciclo. A enzima catalisa a reação: oxaloacetato + acetil-CoA + H₂O gerando citrato + CoA + H⁺. A atividade máxima da enzima foi determinada segundo Alp, a partir da quantificação do complexo formado entre a CoA liberada com o DTNB do meio (ALP, NEWSHOLMEZAMMIT, 1976). O tampão de ensaio continha Tris-aminometano 50 mM, EDTA 1 mM, DTNB 0,2 mM, acetil-CoA 0.1 mM, oxaloacetato 0,5 mM, Triton X-100 0.05% (v/v), pH 8.1 e amostra (80 μg de proteína). A reação foi iniciada pela adição de oxaloacetato ao meio e a atividade enzimática foi avaliada a 25°C, por 10 min, a 412 nm em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA). Como marcador de treinabilidade moderada também foi realizada a atividade da citrato sintase no músculo sóleo e no músculo EDL. Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$.

5.23 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente através do software GraphPad Prism 5® (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Os resultados foram expressos em média \pm DP. Inicialmente foi realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para dados paramétricos, para comparação entre os grupos, foi utilizado o teste ANOVA Two-way, tendo como fatores a dieta e a atividade física. Para o post-hoc test, foi utilizado o teste de Bonferroni. Um valor de $p<0,05$ foi considerado significativo

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação das mães

6.1.1 Classificação das mães

Para a classificação quanto ao nível de atividade física diária das mães em sedentárias, ativas e muito ativas, foram observados do decimo quinto ao trigésimo dia de adaptação, a distância percorrida por dia (Figura 16), o tempo de atividade física diária (Figura 17) e a estimativa de gasto calórico (Figura 18) com base em MUNIZ e colaboradores (2013). As mães classificadas como sedentárias foram as que percorreram $< 1.0 \text{ (km.dia}^{-1}\text{)}$ (Figura 16A), quanto ao tempo de atividade física diária praticaram $< 20 \text{ (min.dia}^{-1}\text{)}$ (Figura 17A) e tiveram gasto calórico (kcal.dia^{-1}) < 10.0 (Figura 18A). As mães classificadas como ativas foram as que percorreram $> 1.0 \leq 5.0 \text{ (km.dia}^{-1}\text{)}$ (Figura 16B), quanto ao tempo de atividade física diária praticaram $> 20 \leq 120.0 \text{ (min.dia}^{-1}\text{)}$ (Figura 17B) e tiveram os gastos calóricos diário de $> 10.0 \leq 40.0$ (Figura 18B). As mães classificadas como muito ativas foram as que percorreram $> 5.0 \text{ (km.dia}^{-1}\text{)}$ (Figura 16C), quanto ao tempo de atividade física diária praticaram $> 120.0 \text{ (min.dia}^{-1}\text{)}$ (Figura 17C) e tiveram gasto calórico (kcal.dia^{-1}) > 40.0 (Figura 18C).

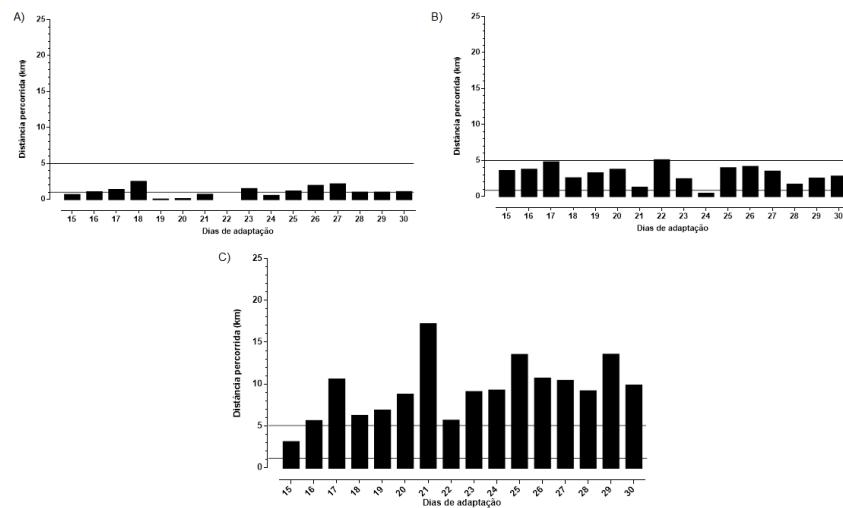


Figura 16. Distância percorrida

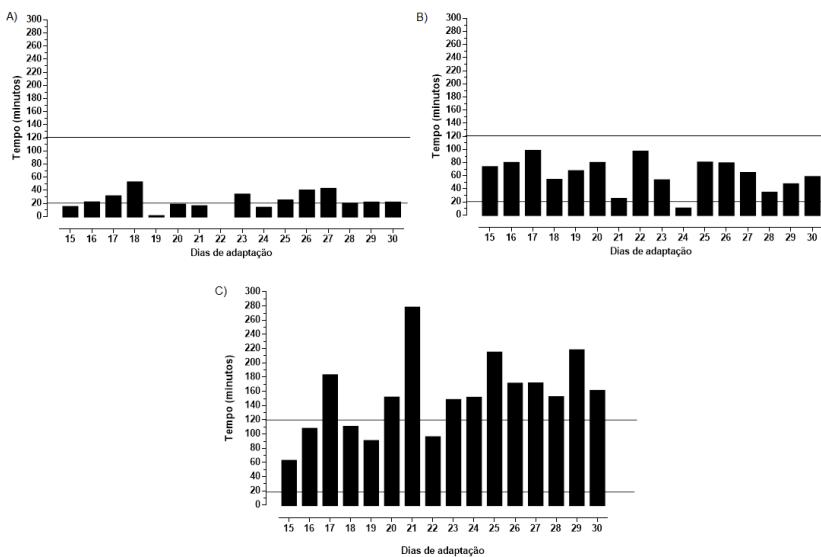


Figura 17. Tempo de atividade física

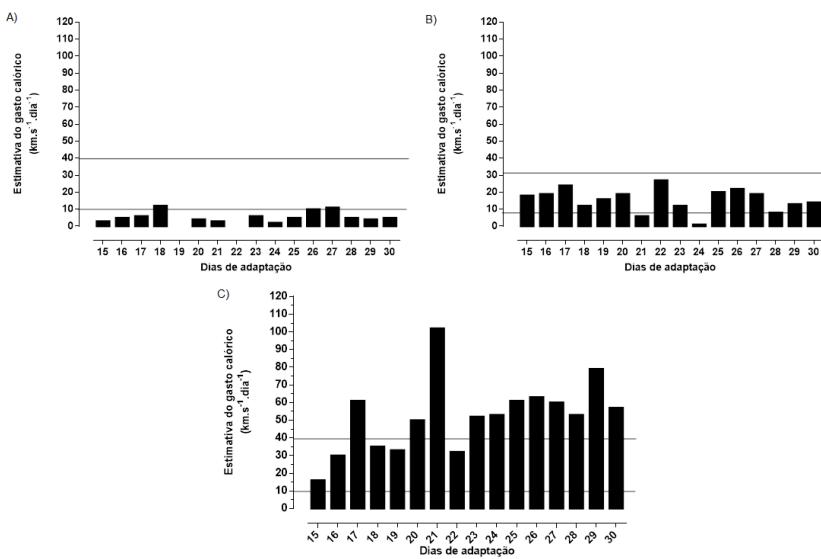


Figura 18. Gasto calórico diário.

Gráficos representativos: Distância diária percorrida em km (Figura 16), tempo de atividade física em minutos (Figura 17), e estimativa de gasto calórico (Figura 18)

considerando últimos 15 dias de adaptação. Durante os períodos de adaptação os grupos foram constituídos por ativos ($n = 8$), inativos ($n = 8$) e muito ativo ($n = 8$).

6.1.2 Ganho de peso corporal

Quando avaliado o peso corporal das mães, durante as fases de adaptação, gestação e lactação, foi observada uma diminuição entre os grupos de mães ativas e muito ativas (A vs MA: $*p<0.05$), sem diferença entre os demais grupos (I vs A: $p=0.573$; I vs MA: $p=0.0648$ $n=8$) (Figura 19A). Na fase de gestação não foi vista diferença significativa entre os grupos (I vs A: $p=0.828$; I vs MA: $p=0.400$; A vs MA: $p=0.343$) (Figura 19B), o mesmo também foi observado na fase de lactação (I vs A: $p=0.657$; I vs MA: $p=0.343$; A vs MA: $p=0.657$) (Figura 19C).

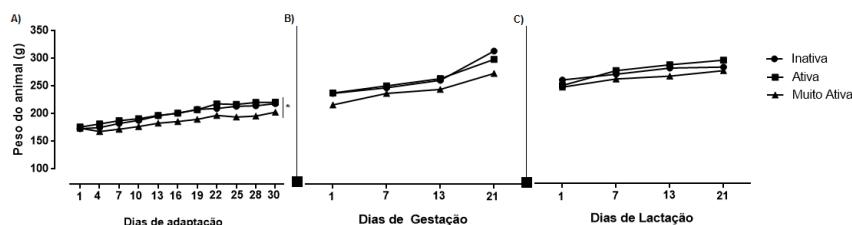


Figura 19. Ganho de peso corporal das mães durante o período de adaptação, gestação e lactação. Durante os períodos de adaptação, gestação e lactação os grupos foram constituídos por inativos ($n=8$), ativos ($n=8$) e muito ativo ($n=8$). Para análise foi usado o teste Mann-Whitney para avaliar as diferenças entre os grupos ($p<0.05$).

6.1.3 Peso do tecido hepático e tecido adiposo (subcutâneo e visceral) no período que os filhotes foram desmamados

Na avaliação do peso do tecido hepático das mães, foi observado um aumento quando comparado os grupos de mães Inativas vs Ativas (I: 12.07 ± 0.93 g vs A: 14.20 ± 1.09 g, $***p<0.001$), e uma diminuição na comparação de mães Ativas vs Muito ativas (A: 14.20 ± 1.09 g vs MA: 12.67 ± 1.02 g, $*p<0.05$) (Tabela 3).

O peso do tecido adiposo visceral apresentou uma diminuição quando comparado os grupos de mães Inativas com os grupos de mães Ativas e Muito Ativas (I: 3.77 ± 0.59 g vs A: 3.15 ± 0.51 g, $*p<0.05$; I: 3.77 ± 0.59 g vs MA: 2.70 ± 0.29 g, $***p<0.001$) (Tabela 3).

Em relação ao peso do tecido adiposo abdominal foi observada uma diminuição quando comparado os grupos de mães Inativas vs Ativas (I: 5.19 ± 0.66 g vs A: 3.82 ± 0.77 g, *** $p < 0.001$) e um aumento significativo na comparação dos grupos de mães Ativas vs Muito Ativas (A: 3.82 ± 0.77 g vs MA: 4.68 ± 0.44 g, * $p < 0.05$) (Tabela 3).

	Fígado	Tecido adiposo visceral	Tecido adiposo abdominal
Inativa	12.07 ± 0.93	3.77 ± 0.59	5.19 ± 0.66
Ativa	$14.20 \pm 1.09^{***}$	$3.15 \pm 0.51^*$	$3.82 \pm 0.77^{***}$
Muito Ativa	$12.67 \pm 1.02^*$	$2.70 \pm 0.29^{***}$	$4.68 \pm 0.44^*$

Tabela 3. Peso do tecido hepático, tecido adiposo visceral e abdominal de ratas fêmeas que praticaram atividade física voluntária durante períodos críticos do desenvolvimento. Os animais que compõe os grupos experimentais realizaram atividade física voluntária, e o tecido foi coletado no dia do desmame dos filhotes; n=7-8 animais por grupo. Todos os valores foram expressos como média \pm SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ realizado com o teste ANOVA de uma via seguido do teste de comparação múltipla TUKEY.

6.1.4 Avaliação da capacidade funcional da cadeia respiratória

Em relação a avaliação da respiração basal foi verificada uma diminuição entre os grupos de mães Ativas e Muito Ativas (A: 3.159 ± 0.72 nmol O₂min/mg de proteína vs MA: 2.192 ± 0.46 , * $p < 0.05$) (Figura 20A). Na avaliação do estado de fosforilação máxima (Estado 3) foi visto um aumento da velocidade de respiração entre os grupos de mães Inativas e Ativas (I: 8.609 ± 1.06 nmol O₂min/mg de proteína vs A: 13.37 ± 2.26 , *** $p < 0.001$) e diminuição entre os grupos Ativa e Muito Ativa (A: 13.37 ± 2.26 nmol O₂min/mg de proteína vs MA: 8.328 ± 1.24 , *** $p < 0.001$) (Figura 20B). Já a velocidade de respiração mitocondrial no estado de repouso, na presença de oligomicina (Estado 4), apresentou diminuição entre os grupos Ativa e Muito Ativa (A: 1.868 ± 0.49 nmol O₂min/mg de proteína vs MA: 1.184 ± 0.16 , * $p < 0.05$) (Figura 20C). A velocidade de respiração no estado desacoplado, obtido pela adição do protonoforo CCCP, apresentou aumento entre os grupos de mães Inativas e Ativas (I: 7.138 ± 0.93 nmol O₂min/mg de proteína vs A: 11.91 ± 1.96 , *** $p < 0.001$) (Figura 20D) e uma diminuição entre os grupos Ativa e Muito Ativa (A: 11.91 ± 1.96 nmol O₂min/mg de proteína vs MA: 7.591 ± 1.56 , *** $p < 0.001$) (Figura

20D). O controle respiratório, obtido pela razão entre o estado 3 e o estado 4, mostrou-se aumentado em função da prática da atividade física materna, como observado na comparação entre os grupos de mães Inativas e Ativas (I: 5.562 ± 1.23 vs A: 7.322 ± 0.96 , * $p<0.05$) (Figura 20E) e entre mães Inativas e Muito Ativas (A: 5.562 ± 1.23 vs MA: 7.054 ± 0.71 , * $p<0.05$) (Figura 20E).

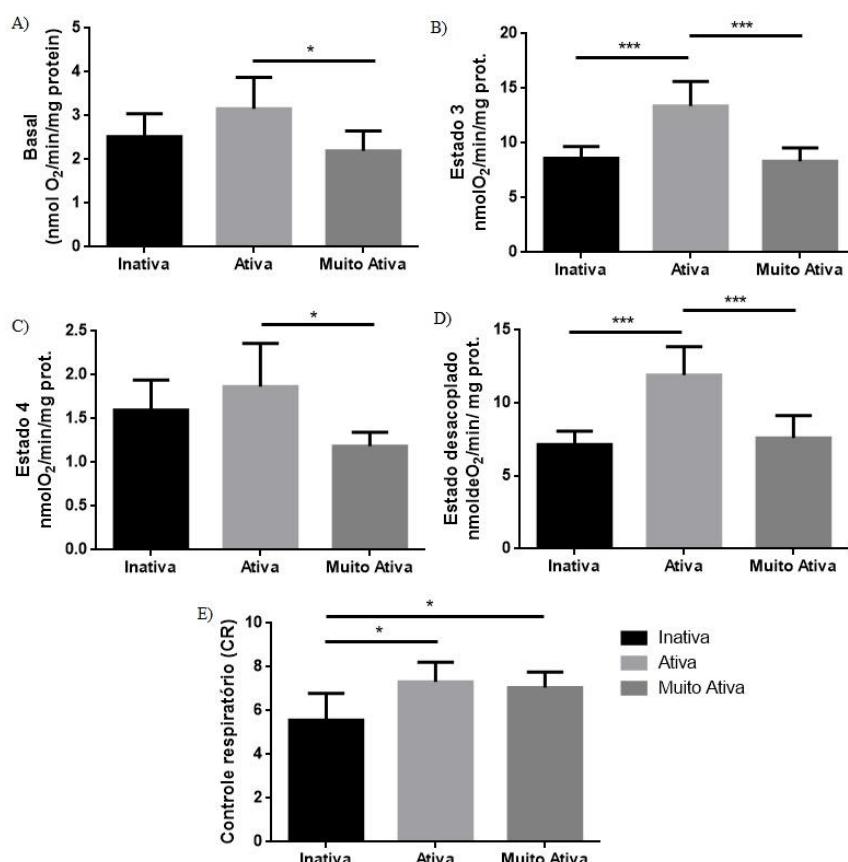


Figura 20. Capacidade respiratória mitocondrial. A) Consumo de O_2 mitocondrial no estado basal (estado 2), B) Estimulado com ADP (estado 3), C) Estimulado com Oligomicina (estado 4), D) Estado desacoplado com protonóforo carbonil cianeto p-(Trifluorometoxi) hidrazona (CCCP) e a E) taxa de controle respiratório (RCR) em mitocôndrias hepáticas de ratas que praticaram atividade física voluntária durante períodos críticos do desenvolvimento. Os animais que compõe os grupos experimentais realizaram atividade física voluntária e o tecido hepático foi coletado no dia do desmame dos filhotes; n=8. Todos os valores foram expressos como média \pm DP. * $p<0.05$; *** $p<0.001$ realizado com o teste ANOVA One way seguido do teste de comparação múltipla TUKEY.

6.1.5 Avaliação do inchamento mitocondrial e da transição de permeabilidade mitocondrial

A avaliação do inchamento mitocondrial na presença do íon Ca^{2+} mostrou uma diminuição quando comparados os grupos de mães Inativas e Muito Ativas (I: 1.26 ± 0.17 AUC vs MA: 0.93 ± 0.23 ; * $p < 0.05$), sem diferença significativa na comparação entre os outros grupos experimentais (Figura 21A).

No entanto, não houve diferença significativa no inchamento entre os grupos na presença de EGTA, um quelante de Ca^{2+} (I: 0.340 ± 0.07 AUC; A: 0.43 ± 0.12 ; MA: 0.46 ± 0.12) (Figura 21B), bem como na presença de Ciclosporina A, um inibidor clássico do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (I: 0.31 ± 0.11 AUC; A: 0.33 ± 0.11 ; MA: 0.43 ± 0.10) (Figura 21C).

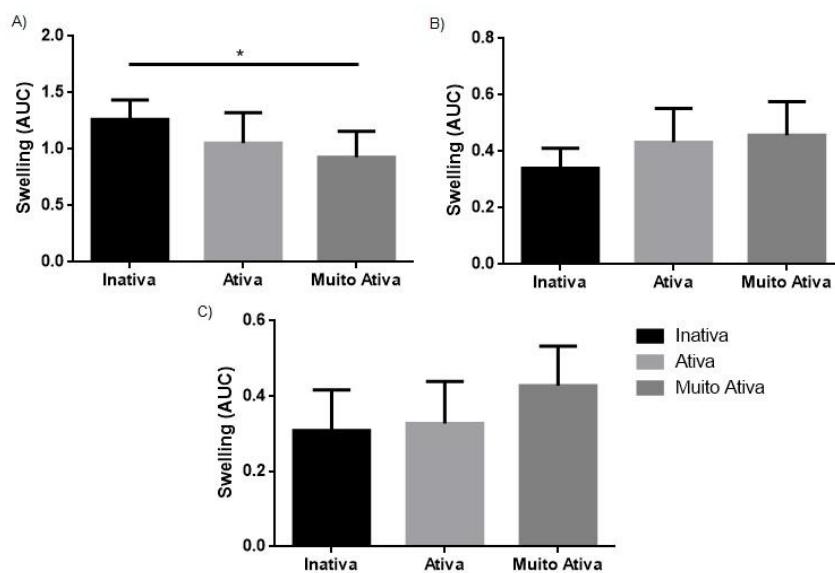


Figura 21. Inchamento mitocondrial. A) Inchamento mitocondrial na presença de íon Ca^{2+} ($10\mu\text{M}$), B) EGTA ($200\ \mu\text{M}$) um quelante de Ca^{2+} e C) Ciclosporina A (CsA, $1\ \mu\text{M}$), um inibidor do poro de transição da permeabilidade mitocondrial, em mitocôndrias hepáticas de ratas que praticaram atividade física voluntária durante períodos críticos do desenvolvimento. Os animais que compõe os grupos experimentais realizaram atividade física voluntária, e o tecido hepático foi coletado no dia do desmame dos filhotes; $n=8$ animais por grupo. Todos os valores foram expressos como média \pm DP. * $p < 0.05$; realizado com o teste ANOVA One Way seguido do teste de comparação múltipla TUKEY.

6.1.6 Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo

Na avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo, os níveis de MDA (expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína) mostrou diminuição quando comparado os grupos de mães Inativas vs Ativas (I: $2.70 \pm 0.21 \mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína vs A: 1.36 ± 0.19 , $****p < 0.0001$), e na comparação dos grupos de mães Inativas vs Muito Ativas (I: 2.70 ± 0.21 vs MA: 1.66 ± 0.29 , $****p < 0.0001$). Um aumento dos níveis de MDA foi visualizado entre os grupos de mães Ativas e Muito Ativas (A: 1.36 ± 0.19 vs MA: 1.66 ± 0.29 , $*p < 0.05$) (Figura 22A).

A avaliação dos níveis de oxidação de proteínas (resultados expressos em mmol/mg de proteína) mostrou uma diminuição quando comparado os grupos de mães Inativas vs Ativas (I: 3.27 ± 0.58 vs A: 1.86 ± 0.51 $**p < 0.01$), o que também foi observado na comparação dos grupos de mães Inativas vs Muito Ativas (I: 3.27 ± 0.58 vs MA: 2.23 ± 0.32 $****p < 0.0001$) (Figura 22B).

Os níveis de sulfidrilas (SH) (resultados expressos em mmol/mg de proteína) apresentaram-se aumentados quando comparado os grupos de mães Inativas e Ativas (I: 73.40 ± 2.53 vs A: 84.34 ± 1.75 $****p < 0.0001$) e apresentou uma diminuição na comparação dos grupos de mães Inativas e Muito Ativas (I: 2.70 ± 0.21 vs MA: 1.66 ± 0.29 $****p < 0.0001$), bem como entre os grupos de mães Ativas e Muito Ativas (A: 84.34 ± 1.75 vs MA: 1.66 ± 0.29 $****p < 0.0001$) (Figura 22C).

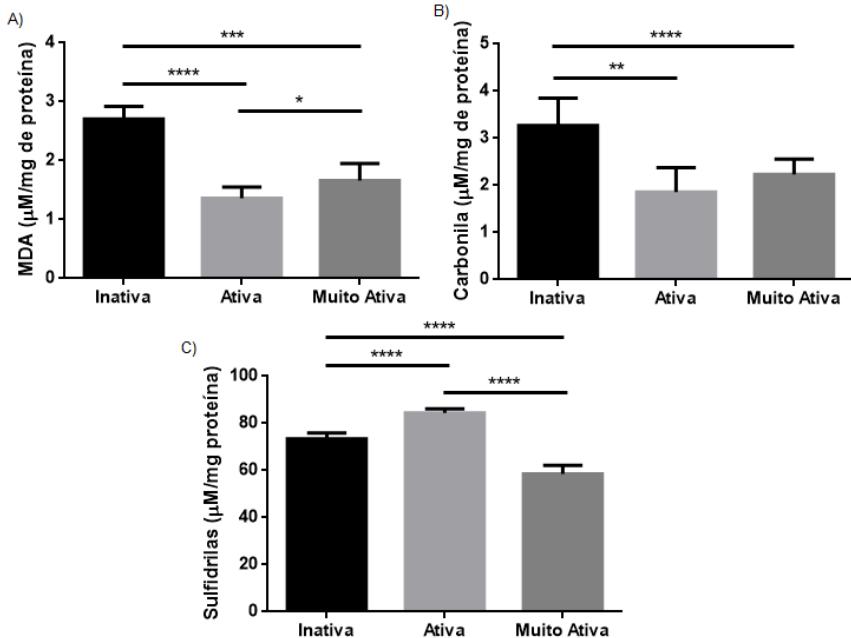


Figura 22. Biomarcadores de estresse oxidativo. A) Níveis de malondealdeido-MDA; B) Conteúdo de carbonilas e C) Sulfidrilas (-SH) no tecido hepático de ratas que praticaram atividade física voluntária durante períodos críticos do desenvolvimento. Os animais que compões os grupos experimentais realizaram atividade física voluntária e o tecido hepático foi coletado no dia do desmame dos filhotes; n=7-8 animais por grupo. Todos os valores foram expressos como média \pm DP. * $p<0.05$; ** $p<0,01$; *** $p<0.0001$ realizado com o teste ANOVA One Way seguido do teste de comparação múltipla TUKEY.

6.1.7 Avaliação do sistema de defesa antioxidante enzimático

Na avaliação do sistema de defesa antioxidante enzimático foi observado um aumento na atividade da enzima superóxido dismutase-SOD (resultados expressos em U/mg de proteína) de acordo com o aumento do nível de atividade física materna entre mães dos grupos Inativas e Ativas (I: 0.48 ± 0.07 vs A: 0.65 ± 0.05 , ** $p<0.01$) e na comparação dos grupos Inativas vs Muito Ativas (I: 0.48 ± 0.07 vs MA: 1.02 ± 0.09 , *** $p<0.0001$), o mesmo se aplica na comparação dos grupos de mães Ativa vs Muito Ativas (A: 0.65 ± 0.05 vs MA: 1.02 ± 0.09 , *** $p<0.0001$ (Figura 23A).

Na atividade da enzima catalase-CAT (resultados expressos em U/mg de proteína) os efeitos foram semelhantes ao que foi visto na enzima SOD, ou seja, a atividade da enzima apresentou aumento em função do nível de atividade física materna, como visto entre mães Inativas e Ativas (I: 2.58 ± 0.59 vs A: 3.59 ± 0.61 , * $p < 0.05$) e na comparação dos grupos Inativas e Muito Ativas (I: 2.58 ± 0.59 vs MA: 4.91 ± 0.59 , *** $p < 0.0001$), como também na comparação dos grupos de mães Ativas e Muito Ativas (A: 3.59 ± 0.61 vs MA: 4.91 ± 0.59 , ** $p < 0.01$) (Figura 23B).

Na atividade da enzima Glutationa-S-transferase-GST (resultados expressos em U/mg de proteína) observou-se aumento na atividade da enzima apenas entre os grupos de mães Inativas e Ativas (I: 13.58 ± 2.40 vs A: 16.83 ± 1.341 , * $p < 0.05$), já na comparação dos grupos de mães Ativas e Muito Ativas (A: 16.83 ± 1.341 vs MA: 10.83 ± 4.34 , ** $p < 0.01$), foi visualizada diminuição na atividade da enzima (Figura 23C).

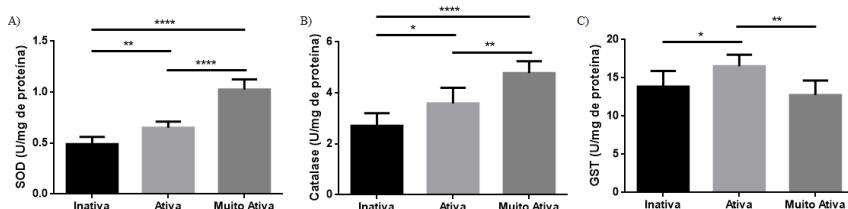


Figura 23. Sistema antioxidante enzimático. A) Atividade da superóxido dismutase (SOD), B) Atividade da catalase (CAT), C) Atividade da Glutationa-S-transferase (GST) no tecido hepático de ratas que praticaram atividade física voluntária durante períodos críticos do desenvolvimento. Os animais que compõe os grupos experimentais realizaram atividade física voluntária, e o tecido foi coletado no dia do desmame dos filhotes; n=7-8. Todos os valores foram expressos como média ± DP. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$ realizado com o teste ANOVA One Way seguido do teste de comparação múltipla TUKEY.

6.1.8 Avaliação do sistema de defesa antioxidante não enzimático

Avaliando os níveis de glutationa reduzida-GSH (resultados expressos em $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) observou-se aumento apenas entre os grupos de mães Inativas e Ativas (I: 1713.31 ± 136.52 vs A: 2204.4 ± 104.91 , *** $p < 0.0001$), já na comparação dos grupos de mães Ativas e Muito Ativas (A: 2204.4 ± 104.91 vs

MA: 1760.29 ± 95.74 , *** $p < 0.0001$) foi visualizada diminuição no conteúdo de GSH (Figura 24A).

Os níveis de glutatona oxidada-GSSG (resultados expressos em $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) apresentou seu conteúdo aumentado apenas entre os grupos de mães Inativas e Ativas (I: 35.45 ± 1.36 vs A: 39.50 ± 1.13 , *** $p < 0.0001$) e uma diminuição na comparação dos grupos de mães Ativas e Muito Ativas (A: 39.50 ± 1.13 vs MA: 35.72 ± 1.48 , *** $p < 0.0001$) (Figura 24B).

A avaliação do estado REDOX, obtido pela razão GSH/GSSG, foi maior nos grupos de mães Inativas e Ativas (I: 48.29 ± 2.87 vs A: 55.86 ± 3.44 , *** $p < 0.001$) e diminuído na comparação dos grupos de mães Ativas e Muito Ativas (A: 55.86 ± 3.44 vs MA: 49.37 ± 3.77 ** $p < 0.01$) (Figura 24C).

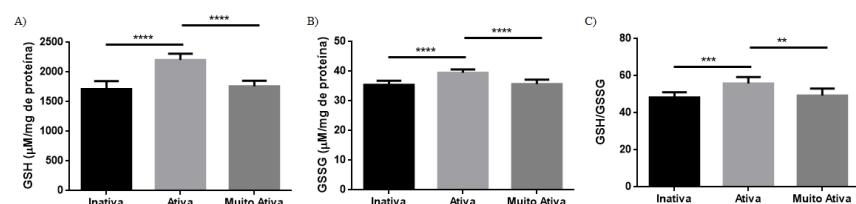


Figura 24. Sistema antioxidante não enzimático. A) Níveis de glutatona reduzida (GSH), B) níveis de glutatona oxidada (GSSG) e C) Estado REDOX no tecido hepático de ratas que praticaram atividade física voluntária durante períodos críticos do desenvolvimento. Os animais que compõe os grupos experimentais realizaram atividade física voluntária, e o tecido foi coletado no dia do desmame dos filhotes; n=7-8 animais por grupo. Todos os valores foram expressos como média \pm DP. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ realizado com o teste ANOVA One Way seguido do teste de comparação múltipla TUKEY.

6.1.9 Avaliação da atividade de enzimas metabólicas

A avaliação do metabolismo das mães foi realizado a partir da atividade de enzimas chave do ciclo glicose-ácido graxo no tecido hepático. A enzima Fosfofrutoquinase 1, importante para via glicolítica, mostrou aumento de sua atividade nas mães que realizaram atividade física voluntária (I: 3.57 ± 0.71 nmol/min/mg de prot. vs A: 6.56 ± 0.68 , *** $p < 0.0001$; I: 3.57 ± 0.71 nmol/min/mg de prot. vs MA: 10.366 ± 0.66 , *** $p < 0.0001$). O aumento da atividade enzimática também foi observado entre mães ativas e muitas ativas (A: 6.56 ± 0.68 nmol/min/mg de prot. vs MA: 10.37 ± 0.66 , *** $p < 0.001$) (Figura 25A).

Na atividade da glicose 6-fosfato desidrogenase, um das enzima regulatórias da via das pentoses fosfato, o aumento foi observado nas mães que realizaram atividade física voluntária quando comparadas as mães inativas (I: 30.19 ± 4.19 nmol/min/mg de prot. vs A: 49.84 ± 3.36 , **** $p < 0.0001$; I: 30.19 ± 4.19 nmol/min/mg de prot. vs MA: 70.63 ± 2.81 , **** $p < 0.0001$). Além disso, foi observado um aumento significativo no grupo de mães muito ativas na comparação com mães ativas (A: 49.84 ± 3.36 nmol/min/mg de prot. vs MA: 60.63 ± 2.81 , *** $p < 0.001$) (Figura 25B).

Na avaliação do metabolismo lipídico, a atividade da β -Hidroxiacil CoA desidrogenase, enzima chave da β -oxidação de ácidos graxos, não foi observado aumento no grupo de mães inativas comparado com o grupo de mães ativas (I: 0.039 ± 0.008 nmol/min/mg de prot. vs A: 0.049 ± 0.012 , $p = 0.4916$). Porém, apresentou aumento significativo nas mães muito ativas quando comparadas ao grupo de mães inativas (I: 0.039 ± 0.008 nmol/min/mg de prot. vs MA: 0.091 ± 0.033 , **** $p < 0.0001$), bem como entre mais ativas e muito ativas (A: 0.049 ± 0.012 nmol/min/mg de prot. vs MA: 0.091 ± 0.033 , **** $p < 0.0001$) (Figura 25C).

Em relação a atividade da ácido graxo sintase (FAS), enzima responsável pela síntese de ácidos graxos, observou-se aumento no grupo de mães ativas e muito ativas quando comparado com o grupo de mães inativas (I: 0.065 ± 0.010 nmol/min/mg de prot. vs A: 0.041 ± 0.008 , **** $p < 0.0001$; I: 0.065 ± 0.010 nmol/min/mg de prot. vs MA: 0.031 ± 0.004 , **** $p < 0.0001$). Em comparação as mães ativas e mães muito ativas, foi também observado um aumento significativo (A: 0.041 ± 0.008 nmol/min/mg de prot. vs MA: 0.031 ± 0.004 , *** $p < 0.001$) (Figura 25D).

A atividade da enzima citrato sintase, que participa do Ciclo de Krebs, apresentou aumento no grupo mães ativas e muito ativas, em comparação ao grupo de mães inativas (I: 16.91 ± 1.63 nmol/min/mg de prot. vs A: 20.08 ± 2.41 , * $p < 0.05$; I: 16.91 ± 1.63 nmol/min/mg de prot. vs MA: 25.17 ± 2.11 , **** $p < 0.0001$) e entre os grupo mães ativas e muito ativas (A: 20.08 ± 2.41 nmol/min/mg de prot. vs MA: 25.17 ± 2.11 , *** $p < 0.001$) (Figura 25E).

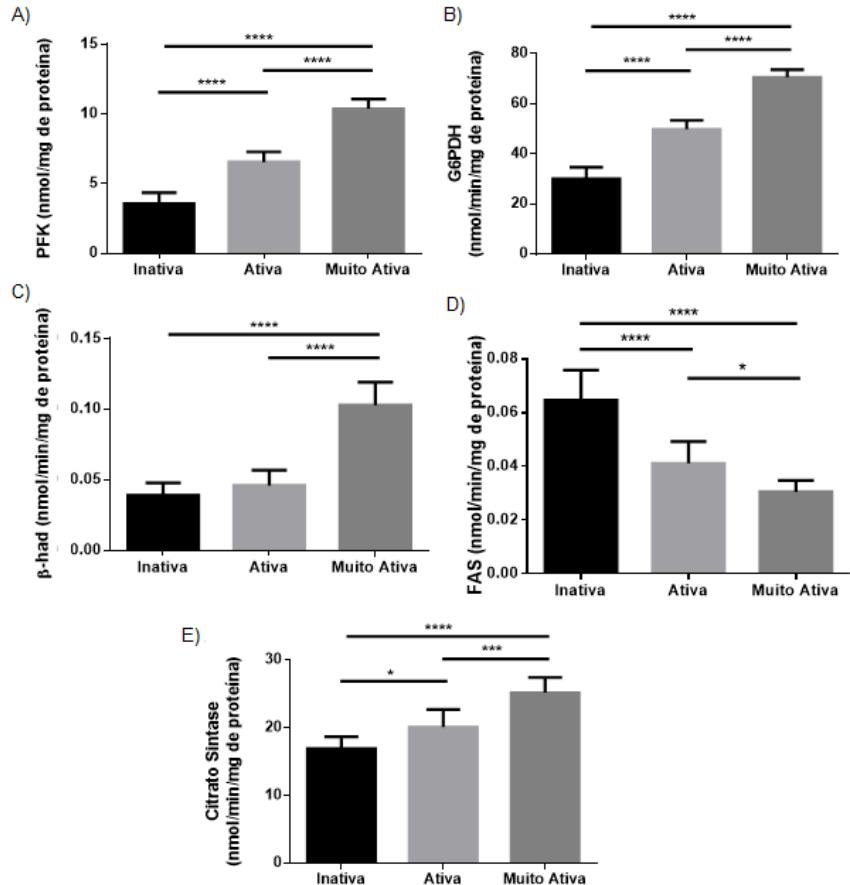


Figura 25. Atividade de Enzimas metabólicas no tecido hepático. A) Atividade da fosfofrutoquinase (PFK), B) Atividade da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), C) Atividade da β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (β -Had), D) Atividade da Ácido graxo sintase (FAS) e E) Atividade da citrato sintase no tecido hepático de ratas que praticaram atividade física voluntária durante períodos críticos do desenvolvimento. O tecido foi coletado no dia do desmame dos filhotes; n=7-8 animais por grupo. Todos os valores foram expressos como média \pm SD. **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 realizados com o teste ANOVA One way seguido do teste de comparação múltipla de TUKEY.

6.2 Avaliação na prole

6.2.1 Avaliação do peso do animal e peso do tecido hepático da prole

A avaliação do peso do tecido hepático mostrou aumento entre os grupos dos animais que receberam dieta ocidentalizada (O) com seus respectivos grupos controle (C) (IC: 13.466 ± 0.915 g vs IO: 15.755 ± 0.751 g, ** $p < 0.01$; AC: 12.196 ± 0.502 g vs AO: 16.179 ± 1.218 , ** $p < 0.01$; MAC: 13.718 ± 0.966 g vs MAO: 16.435 ± 1.662 , *** $p < 0.001$;) (Tabela 4).

Quando avaliado o peso do animal foi observado aumento quando comparados os grupos de mães Inativas com os grupos de mães Ativas e Muito Ativas que receberam dieta ocidentalizada (IO: 276.286 ± 11.889 g vs AO: 321.125 ± 7.913 g, *** $p < 0.0001$; IO: 276.286 ± 11.889 g vs MAO: 328.125 ± 16.736 g, *** $p < 0.0001$). Na comparação entre grupos, observamos um aumento da média do peso do grupos de mães Muito Ativas que receberam dieta ocidentalizada, quando comparada com o grupo que recebeu dieta controle (MAC: 278.000 ± 11.034 g vs MAO: 328.125 ± 16.736 g, *** $p < 0.0001$).

Peso do tecido hepático		Peso do animal		
	Controle	Ocidentalizada	Controle	Ocidentalizada
Inativa	13.466 ± 0.915	15.755 ± 0.751^a	261.429 ± 10.953	276.286 ± 11.889^b
Ativa	12.196 ± 0.502	16.179 ± 1.218^a	284.625 ± 7.272	321.125 ± 7.913^b
Muito Ativa	13.718 ± 0.966	16.435 ± 1.662^a	278.000 ± 11.034	$328.125 \pm 16.736^{a,b}$

Tabela 4. Avaliação do peso do tecido hepático e peso corporal dos filhotes. Avaliação na prole de ratas que praticaram atividade física voluntária durante períodos críticos do desenvolvimento. O tecido hepático foi coletado aos 70 dias de vida dos filhotes; n=7-8 animais por grupo. Todos os valores foram expressos como média \pm DP. * $p < 0.05$; realizado com o teste ANOVA two way seguido do teste de comparação múltipla de TUKEY. a: comparação com o grupo controle no mesmo nível de atividade física materna; b: comparação com o grupo de mesma dieta e diferente nível de atividade física materna.

6.2.2 Peso do tecido adiposo (subcutâneo, abdominal e visceral)

Em relação ao peso do tecido adiposo subcutâneo não foi visualizada diferença significativa na comparação entre os grupos experimentais independente do nível de atividade física materna e dieta ofertada.

Quando avaliado o peso do tecido adiposo abdominal foi observado aumento quando comparados os grupos de mães Inativas e Ativas que receberam dieta ocidentalizada (IO: 4.836 ± 0.393 g vs AO: 6.572 ± 0.864 g, *** $p < 0.001$).

Em relação ao peso do tecido adiposo visceral foi observado aumento quando comparada a prole dos grupos de mães Ativas que receberam dieta ocidentalizada (AO: 3.627 ± 0.631 g vs MAO: 4.614 ± 0.378 g, ** $p < 0.01$). E na avaliação entre grupos, observamos aumento entre o grupo de MAC e MAO (MAC: 3.723 ± 0.428 g vs MAO: 4.614 ± 0.378 , ** $p < 0.01$) (Tabela 5).

	Subcutâneo		Abdominal		Visceral	
	Controle	Ocidentalizada	Controle	Ocidentalizada	Controle	Ocidentalizada
Inativa	5.099 ± 0.831	6.123 ± 0.891	5.110 ± 0.576	4.836 ± 0.393^b	3.604 ± 0.612	4.056 ± 0.434
Ativa	5.576 ± 1.104	5.729 ± 0.886	4.388 ± 0.570	6.572 ± 0.864^b	2.933 ± 0.484	3.627 ± 0.631^b
Muito Ativa	6.313 ± 0.683	6.780 ± 0.880	5.288 ± 0.526	5.696 ± 0.806	3.723 ± 0.428	$4.614 \pm 0.378^{*,b}$

Tabela 5. Avaliação do peso dos tecido adiposo subcutâneo, abdominal e visceral. Avaliação na prole de ratas que praticaram atividade física voluntária durante períodos críticos do desenvolvimento. O tecido hepático foi coletado aos 70 dias de vida dos filhotes; n=7-8 animais por grupo. Todos os valores foram expressos como média \pm DP. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; realizado com o teste ANOVA de two way seguido do teste de comparação múltipla de TUKEY. a: comparação com o grupo controle no mesmo nível de atividade física materna; b: comparação com o grupo de mesma dieta e diferente nível de atividade física.

6.2.3 Avaliação do consumo alimentar da prole

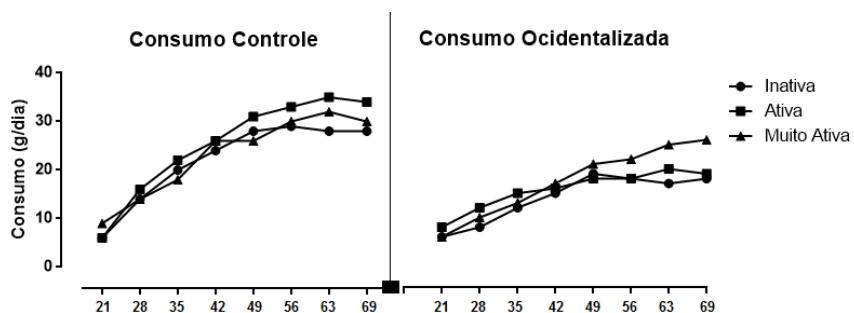


Figura 26. Consumo de dieta na prole após o desmame. Traçado representativo com valores que expressam a quantidade de dieta ingerida pelos filhotes provenientes de mães que realizaram o protocolo de atividade física voluntária materna.

		Semana 1 (g)	Semana 2 (g)	Semana 3 (g)	Semana 4 (g)	Semana 5 (g)	Semana 6 (g)	Semana 7 (g)
Inativa	Controle	74,25±1,69	117,54±2,02	153,58±2,45	180,29±2,29	205,13±2,63	206,2±2,35	195,42±3,05
	Ocidentalizada	57,71±0,90 ^a	76,00±1,20 ^{a,b,c}	99,88±1,31 ^{a,b,c}	110,25±1,97 ^{b,c}	128,71±1,52 ^{a,b,c}	117,46±1,40 ^{a,b,c}	118,50±2,33 ^{b,c}
Ativa	Controle	76,67±0,55	123,75±1,50	168,83±2,22	196,08±2,17	209,33±2,67	234,67±3,74	240,58±5,67
	Ocidentalizada	62,08±0,82 ^a	88,33±1,21 ^a	106,17±3,01 ^a	121,00±1,21 ^{a,d}	138,08±1,49 ^a	130,33±0,87 ^{a,d}	129,42±2,74 ^{a,d}
Muito Ativa	Controle	74,17±2,00	117,46±3,50	151,00±4,53	181,63±5,43	198,92±5,50	206,79±4,82	215,83±0,79
	Ocidentalizada	60,58±0,90 ^a	80,17±1,31 ^a	104,63±2,44 ^a	129,42±1,96 ^a	137,50±2,25 ^a	138,29±3,24 ^a	154,88±5,99 ^a

Tabela 6. Consumo de dieta da prole em gramas por semana. Considera-se, a: diferença entre os grupos que receberam dieta ocidentalizada com seus respectivos grupos de dieta controle, dentro do mesmo nível de atividade física materna; b: diferença entre os grupos de mães inativas e ativas que receberam dieta ocidentalizada; c: diferença entre os grupos de mães inativas e muito ativas que receberam dieta ocidentalizada; d: diferença entre os grupos de mães ativas e muito ativas que receberam dieta ocidentalizada. Todos os valores foram expressos como média ± DP, após realização do teste ANOVA two-way seguido do teste de comparação múltipla de TUKEY. **Nota:** O cálculo foi feito a partir da soma da dieta consumida por semana pela prole, a partir dos 21 dias de vida.

		Sete dias	Sete dias	Sete dias	Sete dias	Sete dias	Sete dias	Sete dias
		Semana 1 -	Semana 2 -	Semana 3 -	Semana 4 -	Semana 5 -	Semana 6 -	Semana 7 -
		g (Kcal)	g (Kcal)	g (Kcal)	g (Kcal)	g (Kcal)	g (Kcal)	g (Kcal)
		337,35	534,04	697,79	819,14	931,96	937,08	887,86
		Total Kcal	Total Kcal	Total Kcal	Total Kcal	Total Kcal	Total Kcal	Total Kcal
Inativa	Controle	Ptna	21,01 (84,05)	33,26 (133,06)	43,46 (173,86)	51,02 (204,09)	58,05 (232,20)	58,37 (233,48)
		Lip	8,09 (72,84)	12,81 (115,51)	16,74 (150,67)	19,65 (176,87)	22,36 (201,23)	22,48 (202,33)
		CHO	45,11 (180,46)	71,42 (285,67)	93,32 (37,22)	109,55 (438,18)	124,63 (498,54)	125,32 (501,27)
		Total Kcal	323,11	425,53	559,21	617,30	720,65	657,66
	Occidentalizada	Ptna	11,65 (46,58)	15,24 (61,35)	20,15 (80,62)	22,25 (88,99)	25,97 (103,39)	23,91 (95,55)
		Lip	18,46 (166,15)	24,31 (218,81)	31,95 (287,55)	35,27 (317,42)	41,17 (370,56)	37,57 (338,17)
		CHO	27,60 (110,38)	36,34 (145,37)	47,76 (191,04)	52,72 (210,89)	61,55 (246,19)	56,17 (246,67)
		Total Kcal	342,25	546,95	722,74	855,75	925,77	998,44
Ativa	Controle	Ptna	21,70 (86,79)	35,02 (140,09)	47,78 (191,12)	55,49 (221,97)	59,24 (236,97)	66,41 (264,64)
		Lip	8,36 (75,21)	13,49 (121,40)	18,40 (165,63)	21,37 (192,36)	22,82 (205,36)	25,58 (230,21)
		CHO	45,06 (180,25)	71,37 (285,47)	91,75 (366,99)	110,36 (441,42)	120,86 (483,45)	131,14 (502,59)
		Total Kcal	364,91	507,66	625,97	732,89	816,88	877,30
	Occidentalizada	Ptna	17,57 (70,28)	25,00 (99,99)	30,05 (120,18)	34,24 (136,97)	39,08 (156,31)	36,88 (147,54)
		Lip	19,86 (178,74)	28,26 (254,32)	33,96 (305,66)	38,71 (348,37)	44,17 (397,56)	41,69 (375,24)
		CHO	28,97 (115,88)	38,34 (153,34)	50,03 (200,13)	61,89 (247,55)	63,75 (263,01)	66,13 (264,52)
		Total Kcal	336,97	533,66	686,05	825,20	903,76	939,54
		Ptna	20,99 (83,96)	33,24 (132,96)	42,73 (170,93)	51,40 (205,60)	56,29 (225,17)	58,52 (234,09)
		Lip	8,08 (72,76)	12,80 (115,23)	16,46 (148,13)	19,80 (178,17)	21,68 (195,15)	22,54 (202,86)
		CHO	45,06 (180,25)	71,37 (285,47)	91,75 (366,99)	110,36 (441,42)	120,86 (483,45)	131,14 (502,59)
		Total Kcal	358,89	474,90	619,19	766,65	814,54	819,23
Muito Ativa	Controle	Ptna	17,15 (68,58)	22,69 (90,75)	29,61 (118,44)	36,62 (146,50)	38,91 (155,65)	43,83 (175,32)
		Lip	19,38 (174,43)	25,65 (230,81)	33,47 (301,23)	41,40 (372,60)	43,99 (395,38)	44,24 (398,16)
		CHO	28,97 (115,88)	38,34 (153,34)	50,03 (200,13)	61,89 (247,55)	65,75 (263,01)	66,13 (264,52)
		Total Kcal	340,97	533,66	686,05	825,20	903,76	939,54

Tabela 7: Consumo de dieta em gramas e Kcal respectiva por macronutriente. Nota: O cálculo foi feito a partir da soma da dieta consumida por semana pela prole, considerando assim, a partir do dia do desmame. A distribuição de macronutrientes levou-se em consideração a composição das deitas descritas no tópico: 5.2 Protocolo de atividade física voluntária e dieta experimental. (Abreviaturas: Ptna: Proteína; Lip: Lipídios; CHO: Carboidrato).

6.2.4 Avaliação da capacidade funcional da cadeia respiratória

Os resultados do consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas de fígado mostraram aumento na respiração basal (estado 2) entre os grupos MAC e MAO (MAC: $0,963 \pm 0,17$ nmolO₂/min/mg prot vs MAO: $2,45 \pm 0,39$, * $p<0,05$), sem diferença significativa entre os demais grupos experimentais (Figura 27A). A capacidade de fosforilação mitocondrial (Estado 3) (Figura 26B), a velocidade de respiração no estado de repouso (estado 4) (Figura 26C) e no estado desacoplado, (Figura 27D) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. O controle respiratório (obtido pela razão estado 3/estado 4) de mitocôndrias hepáticas da prole também não mostrou diferença significativa entre os grupos (Figura 27E).

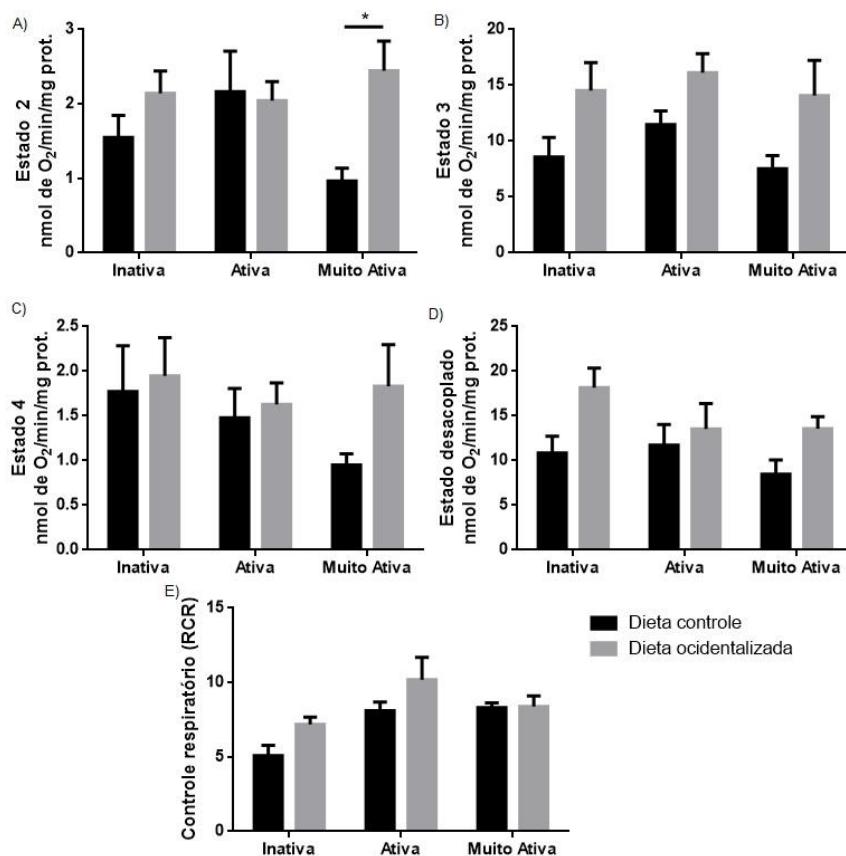


Figura 27. Capacidade respiratória mitocondrial. A) O consumo de O₂ mitocondrial no estado basal (estado 2), B) estimulado com ADP (estado 3), C) estado de repouso (estado 4), D) desacoplado com CCCP e a E) taxa de controle respiratório (RCR) foram determinados em mitocôndrias hepáticas de ratos machos com 70 dias de vida nascidos de mães que praticaram atividade física durante períodos críticos do desenvolvimento. n=7-8 animais por grupo. Os animais que compõem o grupo da dieta ocidentalizada receberam a dieta desde o desmame até os 70 dias de vida. Todos os valores foram expressos como média ± DP, *p<0,05; realizado com o teste ANOVA two way seguido do teste de comparação múltipla de TUKEY.

6.2.5 Avaliação do inchamento mitocondrial e da transição de permeabilidade mitocondrial

Nossos experimentos mostraram inchamento (diminuição da absorbância) na presença do íon Ca²⁺ (10 μM) quando comparados os grupos IC e IO (IC: 1,05 ± 0,44 AUC vs IO: 2,74 ± 0,62, ****p<0,0001). A diminuição do inchamento mitocondrial foi observada entre os grupos IO e AO e IO e MAO (IO: 2,74 ± 0,62 AUC vs AO: 1,39 ± 0,16, ***p<0,0001; IO: 1,05 ± 0,44 AUC vs MAO: 1,91 ± 0,037, ***p<0,001). O aumento do inchamento mitocondrial foi observado entre os grupos AO e MAO (AO: 1,39 ± 0,16 AUC vs MAO: 1,91 ± 0,37, *p<0,05) (Figura 28A).

Na presença do EGTA (200μM), um quelante de íon Ca²⁺, foi observada diminuição do inchamento mitocondrial entre os grupos IO com AO e MAO (IO: 0,50 ± 0,11 AUC vs AO: 0,29 ± 0,07, ***p<0,001; IO: 0,50 ± 0,11 AUC vs AO: 0,25 ± 0,01, **p<0,01) (Figura 28B).

Na presença da ciclosporina A (CsA 1μM), um inibidor clássico do poro de transição da permeabilidade mitocondrial, foi observado aumento entre IC e IO (IC: 0,39 ± 0,07 AUC vs IO: 0,55 ± 0,05, **p<0,01) e entre AC e AO (AC: 0,44 ± 0,06 AUC vs AO: 0,59 ± 0,09, **p<0,01). A diminuição do inchamento mitocondrial foi verificada quando comparados IO e MAO (IO: 0,55 ± 0,05 AUC vs MAO: 0,20 ± 0,02, ****p<0,0001) e AO e MAO (AO: 0,59 ± 0,09 AUC vs MAO: 0,20 ± 0,02, ****p<0,0001) (Figura 28C).

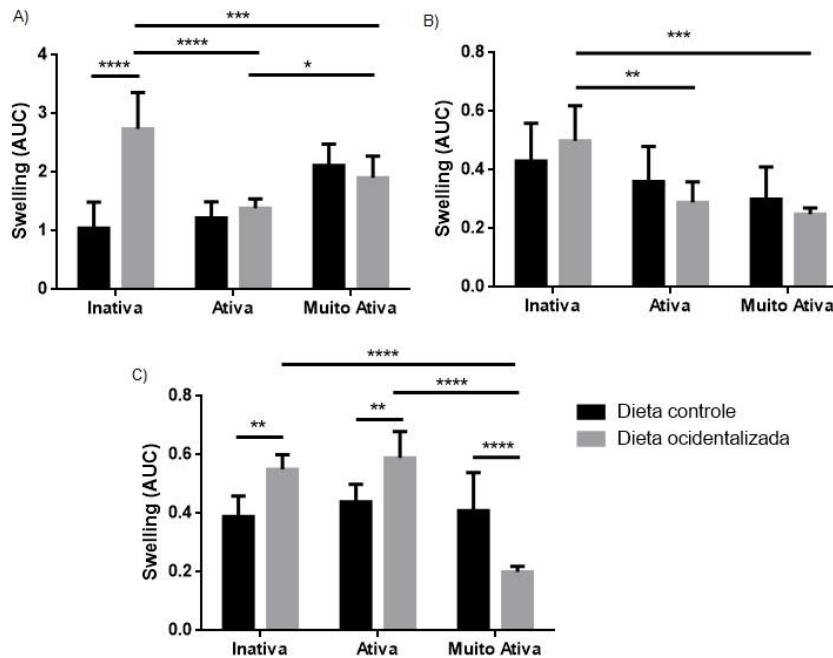


Figura 28 Inchamento mitocondrial. A) Inchamento mitocondrial na presença de íon Ca²⁺ (10µM), B) EGTA (200 µM) um quelante de Ca²⁺ e C) Ciclosporina A (CsA, 1 µM), um inibidor do poro de transição da permeabilidade mitocondrial, no fígado mitocôndrias de ratos machos aos 70 dias de idade nascidos de mães que praticaram atividade física durante períodos críticos do desenvolvimento. n=7-11 animais por grupo. Os animais do grupo da dieta ocidentalizada receberam a dieta desde o desmame até os 70 dias de vida. Todos os valores foram expressos como média ± DP. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 realizado com o teste ANOVA two way seguido do teste de comparação múltipla de TUKEY.

6.2.6 Avaliação da produção de espécies reativas

A produção de espécies reativas mitocondriais apresentou aumento quando comparados os grupos IC e IO (IC: 22,55 ± 2,02 U.F vs IO: 29,91±3,10, ****p<0,0001) e diminuição quando comparados IO com AO e MAO (IO: 29,91±3,10 U.F vs AO: 13,75±2,11, ****p<0,0001 e IO: 29,91 ± 3,10 U.F vs MAO: 21,60 ± 2,19, ****p<0,0001). No entanto, quando comparado AO com MAO (AO: 14,69 ± 2,65 U.F vs MAO: 21,60 ± 2,19, ***p<0,001) e MAC com MAO (MAC: 16,09 ± 2,39 U.F vs MAO: 21,60±2,19, **p<0,01) foi observado aumento na produção de espécies reativas (Figura 29A).

Na presença de EGTA não foi observada diferença entre os grupos, indicando a participação do íon Ca^{2+} na produção de espécies reativas (Figura 29B).

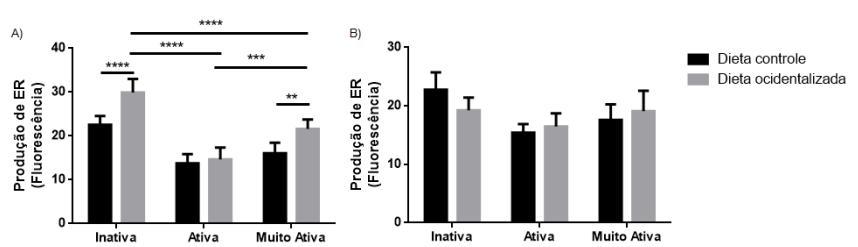


Figura 29. Produção de espécies reativas (ER). A) Produção de ER mitocondriais na presença de íon Ca^{2+} ($10 \mu\text{M}$) e B) EGTA ($200 \mu\text{M}$), quelante de Ca^{2+} , em mitocôndrias hepáticas de ratos machos aos 70 dias de vida nascidos de mães que realizaram atividade física durante períodos críticos do desenvolvimento. $n= 5-7$ animais por grupo. Os animais do grupo de dieta ocidentalizada receberam a dieta desde o desmame até os 70 dias de vida. Todos os valores foram expressos como média \pm DP. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$ realizado com o teste ANOVA two way seguido do teste de comparação múltipla de TUKEY.

6.2.7 Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo

Em relação a avaliação da peroxidação lipídica, os resultados mostraram que os filhotes alimentados com dieta ocidentalizada cujas mães praticaram AFVM apresentaram queda significativa nos níveis de MDA, como pode ser observado entre os grupos IO e AO (IO: $23,17 \pm 1,69 \mu\text{M} / \text{mg prot.}$ vs $13,97 \pm 2,67$, ** $p<0,01$) e IO e MAO (IO: $23,17 \pm 1,69 \mu\text{M} / \text{mg prot.}$ vs MAO: $13,45 \pm 1,31$, ** $p<0,01$) (Figura 30A).

A avaliação da oxidação de proteínas não mostrou diferença significativa nos grupos independentemente da dieta e da atividade física materna (Figura 30B).

Na avaliação do conteúdo de sulfidrilas foi observado aumento quando comparados os grupos IO e MAO (IO: $0,025 \pm 0,002 \mu\text{M} / \text{mg prot.}$ vs MAO: $0,132 \pm 0,014$, *** $p<0,001$) (Figura 30C).

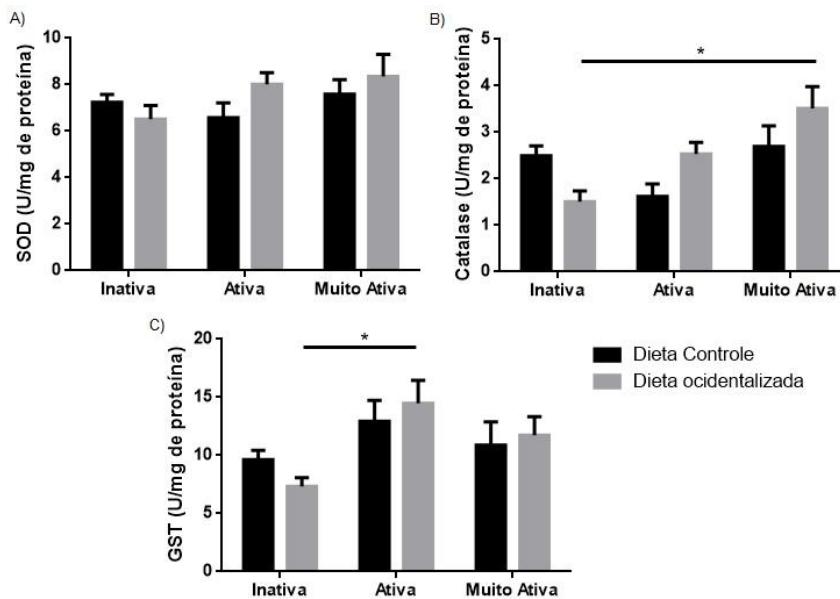


Figura 30. Biomarcadores de estresse oxidativo. A) Níveis de malondealdeido-MDA, B) Conteúdo de carbonilas e C) Sulfidrilas (-SH) no tecido hepático de ratos machos com 70 dias de vida nascidos de mães que praticaram atividade física durante períodos críticos do desenvolvimento. $n = 7-8$ animais por grupo. Os animais do grupo de dieta ocidentalizada receberam a dieta desde o desmame até os 70 dias de vida. Todos os valores foram expressos como média \pm DP. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ realizado com o teste ANOVA two way seguido do teste de comparação múltipla de TUKEY.

6.2.8 Avaliação do sistema de defesa antioxidante enzimático

Avaliando o sistema antioxidante enzimático, a atividade superóxido dismutase (SOD) não apresentou diferença entre os grupos (Figura 31A). No entanto, a atividade da CAT mostrou-se aumentada quando comparados os grupos IO e MAO (IO: $2,49 \pm 0,22$ U/mg prot. vs MAO: $3,17 \pm 0,47$, * $p < 0,05$) (Figura 31B). Em relação à atividade da GST, verificamos aumento quando comparados os grupos IO e AO (IO: $7,35 \pm 0,73$ U/mg prot. vs AO: $14,49 \pm 1,97$, * $p < 0,05$) (Figura 31C).

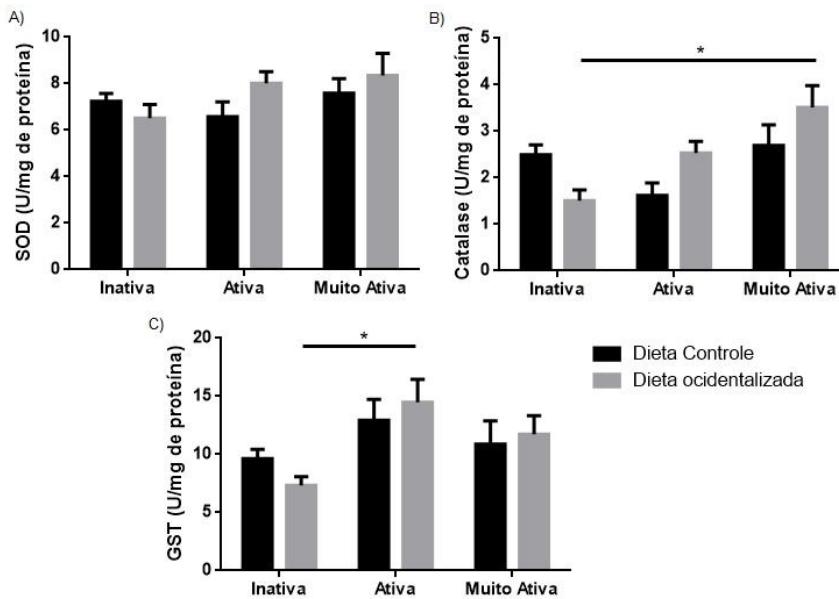


Figura 31. Sistemas antioxidantes enzimáticos. A) Atividade da superóxido dismutase (SOD), B) Atividade da catalase (CAT), C) Atividade da glutationa-S-transferase (GST) em tecido hepático de ratos machos aos 70 dias de vida nascidos de mães que realizaram atividade física durante períodos críticos do desenvolvimento. $n = 7-9$ animais por grupo. Os animais do grupo da dieta ocidentalizada receberam a dieta desde o desmame até os 70 dias de vida. Todos os valores foram expressos como média \pm DP. * $p<0,05$; realizado com o teste ANOVA two way seguido do teste de comparação múltipla de TUKEY.

6.2.9 Avaliação do sistema de defesa antioxidante não enzimático

Em relação aos níveis glutationa reduzida (GSH) não foi observada diferença significativa entre os grupos que receberam dieta ocidentalizada cujas mães praticaram AFVM. No entanto, observou-se que os grupos AO e MAO apresentaram diminuição em seus níveis quando comparados aos seus respectivos controles (AC: $1986,44 \pm 180,50 \mu\text{mol}/\text{mg prot}$. vs AO: $1141,86 \pm 187,53$, *** $p<0,0001$; MAC: $2692,29 \pm 294,77 \mu\text{mol}/\text{mg prot}$. vs MAO: $1291,24 \pm 616,16$, *** $p<0,0001$) (Figura 32A).

Os níveis de glutationa oxidada (GSSG) mostraram diminuição entre IC e IO (IC: $78,41 \pm 4,52 \mu\text{mol}/\text{mg prot}$. vs IO: $65,32 \pm 3,76$, ** $p<0,01$) e entre AC e AO (AC : $73,09 \pm 7,87 \mu\text{mol}/\text{mg prot}$. vs AO: $59,12 \pm 10,11$, ** $p<0,01$). Foi possível observar níveis aumentados de GSSG quando comparados os grupos

IO e MAO (IO: $65,32 \pm 3,76$ $\mu\text{mol}/\text{mg prot.}$ vs MAO: $78,84 \pm 9,83$, $****p < 0,0001$), bem como AO e grupos MAO (AO: $59,12 \pm 10,10$ $\mu\text{mol}/\text{mg prot.}$ vs MAO: $78,84 \pm 9,83$, $****p < 0,0001$) (Figura 32B).

Avaliando o estado REDOX celular, não foi observada diferença entre os grupos que receberam dieta ocidentalizada cujas mães praticavam AFVM (Figura 32C). Uma diminuição significativa foi observada quando comparados os grupos AC e AO (AC: $27,51 \pm 4,07$ $\mu\text{mol}/\text{mg prot.}$ vs AO: $19,40 \pm 1,28$, $**p < 0,01$) e os grupos MAC e MAO (MAC: $32,25 \pm 3,87$ $\mu\text{mol}/\text{mg prot.}$ vs MAO: $16,679 \pm 8,376$, $****p < 0,0001$).

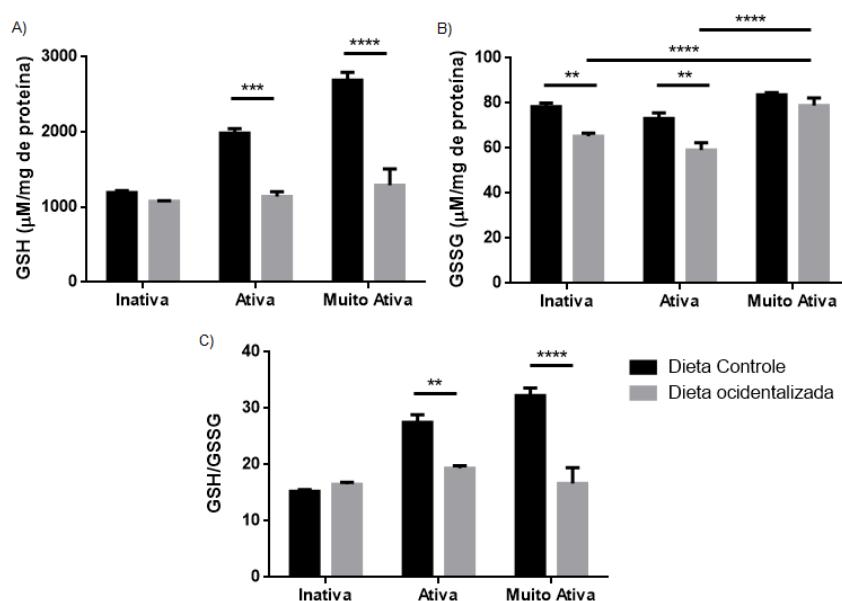


Figura 32. Sistemas antioxidantes não enzimáticos. A) Níveis reduzidos de glutationa (GSH) B) Níveis de glutatona oxidada (GSSG) e C) Estado REDOX no tecido hepático de ratos machos aos 70 dias de vida nascidos de mães que realizaram atividade física durante períodos críticos do desenvolvimento. $n=8-9$ animais por grupo. Os animais do grupo da dieta ocidentalizada receberam a dieta desde o desmame até os 70 dias de vida. Todos os valores foram expressos como média \pm DP. $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$; realizado com o teste ANOVA two way seguido do teste de comparação múltipla de TUKEY.

6.2.10 Avaliação de enzimas metabólicas da prole

A avaliação do metabolismo foi realizado a partir da atividade de enzimas chave do ciclo glicose-ácido graxo no tecido hepático da prole de mães que realizaram atividade física voluntária durante períodos críticos do desenvolvimento. A Fosfofrutoquinase 1, importante enzima da via glicolítica, mostrou aumento na sua atividade nos animais que receberam dieta ocidentalizada, cujas mães realizaram atividade física voluntária (IO: 2.69 ± 1.24 nmol/min/mg de prot. vs AO: 4.27 ± 0.334 , **** $p < 0.0001$; IO: 2.69 ± 1.24 nmol/min/mg de prot. vs MAO: 13.937 ± 1.695 , **** $p < 0.0001$). Esse aumento também foi observado entre os grupos que receberam dieta ocidentalizada provenientes de mães ativas e muitas ativas (AO: 4.27 ± 0.334 nmol/min/mg de prot. vs MAO: 13.937 ± 1.695 , **** $p < 0.0001$) e entre os grupos MAC e MAO (MAC: 10.61 ± 1.69 nmol/min/mg de prot. vs MAO: 13.937 ± 1.695 , **** $p < 0.0001$) (Figura 33A).

Na atividade da glicose 6-fosfato desidrogenase, enzima importante da via das pentoses fosfato, aumento significativo foi observado na prole que recebeu dieta ocidentalizada provenientes de mães inativa com seu respectivo grupo controle (IC: 30.19 ± 4.19 nmol/min/mg de prot. vs IO: 42.86 ± 2.64 , * $p < 0.05$). No grupo de mães inativas que recebeu dieta ocidentalizada também foi observado aumento quando comparado com os grupos de mães ativas e muito ativas que receberam a mesma dieta (IO: 42.86 ± 2.64 nmol/min/mg de prot. vs AO: 60.97 ± 2.19 , ** $p < 0.01$; IO: 42.86 ± 2.64 nmol/min/mg de prot. vs MAO: 77.29 ± 3.63 , * $p < 0.05$). Também houve aumento na atividade da G6PDH entre os animais que receberam dieta ocidentalizada, provenientes de mães ativas e muito ativas (AO: 60.97 ± 2.19 nmol/min/mg de prot. vs MAO: 77.29 ± 3.63 , ** $p < 0.01$) (Figura 33B).

Em relação ao metabolismo lipídico, a atividade da β -Hidroxiacil CoA desidrogenase, enzima chave da β -oxidação de ácidos graxos, apresentou aumento nos grupos da prole que receberam dieta ocidentalizada provenientes de mães inativas comparado com o grupo de mães muito ativas (IO: 0.014 ± 0.006 nmol/min/mg de prot. vs MAO: 0.208 ± 0.049 , **** $p < 0.0001$), bem como entre o grupo de mães ativas com o de mães muito ativas (AO:

0.033 ± 0.007 nmol/min/mg de prot. vs MAO: 0.208 ± 0.049 , **** $p < 0.0001$). Os animais de mães muito ativa que receberam dieta ocidentalizada, também mostraram aumento da atividade da enzima quando comparado com o grupo muito ativo controle (MAC: 0.105 ± 0.018 nmol/min/mg de prot. vs MAO: 0.208 ± 0.049 , **** $p < 0.0001$) (Figura 33C).

A atividade da ácido graxo sintase (FAS), enzima responsável pela síntese de ácidos graxos, apresentou-se aumentada no grupo de mães inativa que recebeu dieta ocidentalizada quando comparado com o grupo proveniente de mães inativas que recebeu dieta controle (IC: 0.069 ± 0.021 nmol/min/mg de prot. vs IO: 0.125 ± 0.014 , **** $p < 0.0001$), bem como na prole de mães ativa controle e ativa que recebeu dieta ocidentalizada (AC: 0.042 ± 0.008 nmol/min/mg de prot. vs AO: 0.068 ± 0.018 , ** $p < 0.01$). Os animais que receberam dieta ocidentalizada, mas que as mães realizaram atividade física voluntária apresentaram diminuição na atividade da FAS (IO: 0.125 ± 0.014 nmol/min/mg de prot. vs AO: 0.068 ± 0.018 , **** $p < 0.0001$; IO: 0.125 ± 0.014 nmol/min/mg de prot. vs MAO: 0.022 ± 0.006 , **** $p < 0.0001$). Também foi observada diminuição da atividade da FAS entre os grupos que receberam dieta ocidentalizada provenientes de mães ativas e muitas ativas (AO: 0.068 ± 0.018 nmol/min/mg de prot. vs MAO: 0.022 ± 0.006 , **** $p < 0.0001$) (Figura 33D).

Em relação a atividade da citrato sintase, enzima que participa do Ciclo de Krebs, foi observado um aumento quando comparado a prole de mães inativas com a de mães muito ativas que receberam dieta ocidentalizada (IO: 16.94 ± 1.77 nmol/min/mg de prot. vs MAO: 33.64 ± 2.51 , *** $p < 0.001$) e entre os grupos muito ativo controle e muito ativo obesogênico (MAC: 24.67 ± 2.33 nmol/min/mg de prot. vs MAO: 33.64 ± 2.51 , * $p < 0.05$) (Figura 33E).

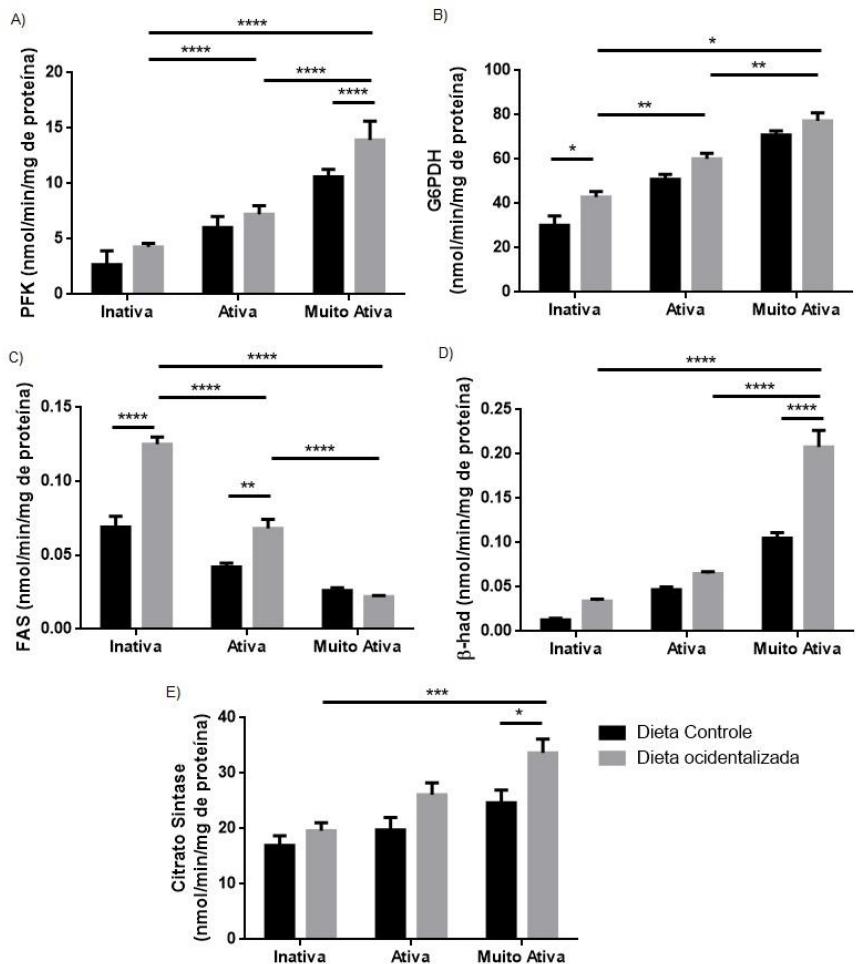


Figura 33. Enzimas metabólicas no tecido hepático da prole. A) Atividade da fosfofrutoquinase (PFK), B) Atividade da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), C) Atividade da β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (β -Had), D) Atividade da Ácido graxo sintase (FAS), E) Atividade da citrato sintase no tecido hepático da prole de ratas que praticaram atividade física voluntária durante períodos críticos do desenvolvimento. O tecido foi coletado aos 70 dias de vida dos filhotes; n=7-8 animais por grupo. Todos os valores foram expressos como média \pm DP. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001; realizado com o teste ANOVA two way seguido do teste de comparação múltipla de TUKEY.

7. DISCUSSÃO

7.1. Efeitos nas mães

A busca por estratégias para minimizar o risco de doenças metabólicas tem se tornado cada vez mais frequente na ciência. Além da avaliação dos efeitos da atividade física materna na prole de ratos machos submetidos a uma dieta ocidentalizada após o desmame, nosso estudo também buscou avaliar nessas ratas os efeitos da atividade física voluntária, visto que há uma escassez de estudos com esse objetivo, pois o foco da maioria dos artigos científicos são direcionados aos efeitos na prole. Dessa forma, avaliamos nessas fêmeas alguns parâmetros de bioenergética mitocondrial, balanço oxidativo e metabolismo hepático, a fim de observarmos os efeitos diretos da atividade física voluntária (AFV) antes, durante e após a gestação.

Já é bastante conhecido na literatura que uma atividade mitocondrial adequada é crítica para a sobrevivência de células eucarióticas. Desregulação dessa atividade mitocondrial está diretamente relacionada ao surgimento de diversas doenças crônicas, uma vez que a disfunção mitocondrial pode desencadear, por si só, o estresse oxidativo, falha bioenergética, inflamação, acúmulo de proteínas e morte celular (BULLON et al., 2016), aspectos comuns em distúrbios metabólicos, como a síndrome metabólica, por exemplo.

Considerando o fígado como órgão essencial no metabolismo de macromoléculas e reconhecendo a importância das mitocôndrias no metabolismo energético, nos propomos avaliar os efeitos da atividade física voluntaria materna na bioenergética mitocondrial hepática. Avaliamos no fígado dessas ratas, a respiração mitocondrial observando um alta capacidade de consumo de oxigênio principalmente em mães ativas (Figura 20), indicando uma maior atividade metabólica em função da atividade física. A energia necessária para a fosforilação oxidativa é proveniente do $\Delta\Psi_m$ gerado pela cadeia transportadora de elétrons que reduz O_2 a H_2O e pela atividade da ATP-sintase que fosforila o ADP em ATP. Em nosso modelo experimental, a mitocôndria teve um aumento de velocidade de consumo de O_2 no estado 3 (estimulado por ADP), sugerindo uma maior eficiência de fosforilação (Figura

20B), no estado desacoplado (Figura 20D), como também apresentou um maior controle respiratório (Figura 20E). O aumento da atividade mitocondrial nas ratas que realizaram atividade física voluntária parece favorecer o seu metabolismo oxidativo. Nossos resultados de maior atividade da respiração mitocondrial em ratas que praticaram atividade física corroboram com o estudo de Mc Coin *et al.* (2019) que avaliou mitocôndrias hepáticas de camundongos fêmeas que praticaram atividade física voluntária em roda, durante oito semanas, e também apresentaram aumento da capacidade respiratória máxima, além de uma menor produção de ERO's (MC COIN, *et al.*, 2019).

A saúde celular depende da atividade mitocondrial, uma vez que essas organelas são as principais produtoras de energia necessária para a realização de diferentes funções celulares. Diversas atividades mitocondriais, incluindo a produção de ATP, são reguladas pela sinalização mediada pelo ion Ca^{2+} . De fato, o Ca^{2+} , um segundo mensageiro intracelular chave, pode alcançar o espaço intermembranas e em seguida a matriz mitocondrial, onde regula proteínas, enzimas e transportadores responsáveis pela síntese de ATP (ROSSI *et al.*, 2018). No entanto, uma entrada desregulada ou excessiva de cálcio intramitocondrial pode levar ao aumento da produção de EROs, estresse oxidativo e abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) (FIGUEIRA *et al.*, 2013). Uma das formas de avaliarmos a integridade da membrana mitocondrial interna é através da análise do inchamento mitocondrial que ocorre em decorrência do desdobramento das cristas mitocondriais que podem tanto ser transitórios, decorrentes de uma resposta fisiológica, quanto permanentes uma vez associados a abertura do PTPM, o qual está diretamente relacionado a diversas consequências patológicas (CROMPTON *et al.*, 1999; HAMILTON *et al.*, 2018; PAUPE e PRUDENT, 2018). Nossos dados mostraram que as mitocôndrias de fígado de ratas que realizaram atividade física voluntária, classificadas em nosso estudo como muito ativas, apresentaram maior resistência ao inchamento da organela quando comparado com o grupo de ratas inativas (Figura 21A). Um estudo que também avaliou como uma proposta de intervenção a AFV em rodas por 12 semanas, em mitocôndrias cardíacas de ratos, não observou essa maior resistência ao inchamento mitocondrial na presença de Ca^{2+} e nenhuma

alteração na expressão da Ciclofilina D e do translocador de nucleotídeo de adenina (ANT), mas também não mostrou maior inchamento da organela em decorrência da atividade física praticada (MARQUES-ALEIXO *et al.*, 2018). A diferença em relação aos resultados observados nos dois estudos, pode estar relacionada ao gênero, a intensidade da atividade física praticada, como também ao tecido avaliado.

Muitas doenças crônico-metabólicas estão relacionadas a um quadro prévio de estresse oxidativo. A fim de avaliarmos se a AFV em ratas induziria uma melhora do balanço oxidativo hepático, realizamos a dosagem de alguns biomarcadores de estresse oxidativo, como também, avaliamos os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Como visto em nossos resultados, houve uma diminuição na peroxidação lipídica e na oxidação de proteínas hepáticas, como também, um aumento no conteúdo de tióis totais nos grupos que praticaram AFV em comparação com as fêmeas inativas (Figura 22). Outro estudo que também avaliou AFV praticada em rodas por camundongos, durante 21 dias, mostrou diminuição do níveis de MDA no fígado, sem alteração nos níveis de tióis totais (CUNHA *et al.*, 2020).

A avaliação do sistema de defesa antioxidante enzimático mostrou um aumento na atividade da SOD, da catalase e da glutationa-s-transferase (GST) no grupo de ratas ativas, comparado com as inativas (Figura 23), corroborando com os achados de Powers e Sen (2000) (POWERS e SEN, 2000). Essa maior atividade do sistema antioxidante enzimático pode refletir positivamente na sinalização celular para manutenção da homeostase entre agentes oxidantes e antioxidantes durante a realização do exercício, minimizando a ativação de vias de sinalização que resultem numa situação de estresse oxidativo que antecede o surgimento de doenças crônicas (DIMAURO, PARONETTOCAPOROSSI, 2020).

O sistema das glutationas tem papel fundamental como defesa antioxidante não enzimática, especialmente a glutationa reduzida (GSH), onde sua ação pode ser de forma direta nas espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio, ou como co-fator para outras enzimas como glutationa-s-transferase e glutationa peroxidase, atuando assim na proteção das células contra os

efeitos do estresse oxidativo (DEPONTE, 2013). Em nosso estudo foi observado que os níveis de GSH estavam aumentados nas fêmeas classificadas como ativas, comparadas com as inativas (Figura 24), dados que corroboram com outro estudo que observou resultados semelhantes no fígado de ratas ativas (YAMAMOTO et al., 2002). Os níveis de GSH aumentados, associados ao aumento do estado REDOX, indicam também uma melhora na capacidade antioxidante hepática não enzimática, em função da realização da AFV.

Sendo as mitocôndrias organelas onde ocorrem a oxidação de moléculas provenientes da metabolização de carboidratos, lipídios e proteínas (GARCÍA-GARCÍA et al., 2020), além da avaliação de alguns parâmetros da bioenergética mitocondrial e balance oxidativo de fêmeas que praticaram AFV, achamos importante avaliarmos também a atividade de enzimas chaves no metabolismo de carboidratos, lipídios e ciclo de Krebs. Nossos resultados sugerem maior atividade da via glicolítica e da via das pentoses fosfato em decorrência da AFV, fornecendo piruvato e NADPH, respectivamente. Esse piruvato pode ser convertido em Acetil-CoA e seguir para a oxidação via ciclo de Krebs e o NADPH, em função dos resultados observados na melhora de estado REDOX celular, possivelmente está atuando como coenzima para o ciclo das glutationas. Em relação ao metabolismo lipídico foi observado um aumento da β -oxidação e diminuição da síntese de ácidos graxos no fígado de fêmeas ativas e muito ativas. A avaliação da atividade da citrato sintase sugere uma maior atividade do ciclo de Krebs e melhora do metabolismo oxidativo (Figura 25), o que pode explicar, pelo menos, em parte a diminuição de adiposidade função da atividade física praticada.

A literatura tem demonstrado que a atividade física ou exercício melhoram o metabolismo hepático, em parte, por conta do aumento da expressão do coativador ativado por proliferador de peroxissomo 1 α (PGC-1 α), o qual regula a gliconeogênese, biogênese mitocondrial, o fluxo do ciclo de Krebs, como também aumenta a oxidação de gorduras (FERNANDEZ-MARCOS e AUWERX, 2011; FLETCHER et al., 2014; LAYE et al., 2009; SANTOS-ALVES et al., 2015). Estudo de Mc Coin et al., 2019 mostrou uma

proteção a danos hepáticos induzidos por dieta com alto teor e gordura em camundongos fêmeas que praticaram AFV (MC COIN *et al.*, 2019).

De forma conjunta, nossos resultados mostram que a AFV em ratas, antes, durante e após a gestação, induz modulações positivas na bioenergética mitocondrial, além de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, melhorar o estado REDOX celular e estimular o metabolismo energético hepático favorecendo a oxidação de carboidratos e lipídios.

7.2. Efeitos na prole

O ambiente pré-natal é amplamente considerado como tendo um importante impacto no desenvolvimento do feto (BARKER, 1998; BARKER e OSMOND, 1986; BARKER *et al.*, 1989; RAIPURIA *et al.*, 2015). Essas alterações ambientais podem ter consequências de longa duração que contribuem para a saúde geral da prole, como sugerido pelo conceito da “Origem de desenvolvimentista da saúde e da doença (DOHaD)” com base em dados epidemiológicos (BARKER e OSMOND, 1986; HANSON e GLUCKMAN, 2014; McMILLEN e ROBINSON, 2005).

Dados da literatura suportam a ideia que a atividade física materna durante fases críticas do desenvolvimento, como gestação e lactação, pode melhorar a saúde da prole adulta envolvendo efeitos metabólicos associados a vários órgãos e tecidos, minimizando o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (CARTER *et al.*, 2012; CARTER *et al.*, 2013; LAKER *et al.*, 2014; STANFORD *et al.*, 2015). No entanto, pouco ainda são os estudos que se propõem avaliar os mecanismos metabólicos associados a essa proteção no tecido hepático da prole, como também, se a mesma consegue ser mantida quando a prole dessas mães que praticaram atividade física voluntária for submetida a uma alteração do ambiente nutricional ainda na primeira infância. Nesse sentido, nosso trabalho propõe a avaliação da bioenergética mitocondrial, balanço oxidativo e metabolismo hepático da prole de ratas que praticaram AFV, durante períodos críticos do desenvolvimento, mas que foram submetidas a uma dieta ocidentalizada desde o pós-desmame até a fase de adulto jovem.

O ambiente gestacional nas primeiras fases da vida é fundamental para a delimitação funcional do organismo até fases posteriores de seu desenvolvimento. A atividade física materna tem sido sugerida como método terapêutico não farmacológico com o objetivo de melhorar eventos de biogênese mitocondrial, autofagia/mitofagia em animais adultos, fornecendo uma base para minimizar processos relacionados ao desenvolvimento de patologias (CUNNINGHAM et al., 2018). Apesar de estudos indicarem que a atividade física voluntária exerce seus efeitos positivos na saúde metabólica da prole, por meio de uma variedade de vias biológicas, os mecanismos exatos subjacentes à sua influência na saúde não são totalmente conhecidos. Uma hipótese para explicar esse efeito benéfico é que a atividade física regular materna tem um impacto positivo no fenótipo mitocondrial da prole com melhoria da sua função, aumenta a atividade do sistema antioxidante e reduz o estresse oxidativo.

A saúde celular depende da atividade mitocondrial, uma vez que essas organelas são as principais produtoras de energia necessária para as funções celulares. Em particular, as mitocôndrias são cruciais para células de eucariontes que produzem ATP, principalmente por meio da fosforilação oxidativa (ROSSI et al., 2018). A análise da respiração mitocondrial em fígado de ratos mostrou que os animais do nosso estudo apresentaram aumento do consumo de oxigênio no estado basal apenas no grupo de mães muito ativas que receberam dieta ocidentalizada, quando comparados ao seu respectivo grupo controle. Nossos resultados mostraram que a dieta não causou diminuição na capacidade respiratória, o mesmo observado em um estudo com dieta hiperlipídica em ratos machos e fêmeas (MCCOIN et al., 2019). Outros estudos têm demonstrado que deficiências na função respiratória das mitocôndrias hepáticas podem ser causadas por dieta rica em gordura (GARNOL et al., 2014; MAZZOLI et al., 2019) observando aumento na atividade do complexo I em ratos adultos jovens por mudanças no padrão alimentar.

As mitocôndrias desempenham um papel fundamental no processo de respiração celular e produção de ATP, além de serem importantes locais de produção de EROs. A integridade da membrana mitocondrial é essencial para

a manutenção da homeostase da organela. A avaliação do inchamento está associada à análise da integridade de membrana mitocondrial e à abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial, que está, portanto, associado à progressão de várias patologias, como câncer, diabetes, obesidade, esteatose hepática não alcoólica e doenças neurológicas (PAUPE e PRUDENT, 2018; BAUER e MURPHY, 2020). Um aumento do inchamento mitocondrial foi observado nos grupos que receberam dieta ocidentalizada provenientes de mães inativas comparado com o controle, no entanto, nas proles de mães que praticaram AFV e consumiram dieta ocidentalizada desde o período pós-desmame houve uma redução do inchamento mitocondrial quando comparados aos grupos de mães inativas que receberam dieta ocidentalizada. Este evento pode estar associado ao aumento da produção de EROS (KOWALTOWSKI et al., 2009) induzida por Ca^{2+} , uma vez que na presença de EGTA, um quelante de cálcio, o inchamento mitocondrial induzido pela dieta experimental foi prevenido (Figura 28). Na presença de Ciclosporina A, um inibidor clássico do PTPM, o inchamento mitocondrial induzido pela dieta não foi prevenido, sugerindo que o inchamento mitocondrial observado no grupo que recebeu dieta ocidentalizada possivelmente não ocorre por meio da abertura do poro clássico de TPM.

O estresse oxidativo pode ocorrer pelo aumento da produção de EROS e/ou pela diminuição dos sistemas de defesas antioxidantes, com predominância de agentes oxidantes, e está associado ao desenvolvimento de obesidade, dislipidemias, esteatose hepática, resistência à insulina e síndrome metabólica (FIGUEIRA et al., 2013; PFANNER, WARSCHIEDWIEDEMANN, 2019). Um estudo recente com camundongos mostrou que o aumento da produção de EROS estava associado à ingestão de dieta rica em lipídios (FEILLET-COUDRAY et al., 2019). Nossos dados demonstraram aumento na produção de espécies reativas no grupo de mães inativas que receberam dieta ocidentalizada, e que a atividade física voluntária materna foi capaz de atenuar essa produção. Este efeito foi totalmente inibido na presença de EGTA, mostrando que o íon Ca^{2+} desempenha um papel importante na produção de espécies reativas mitocondriais.

A fim de avaliarmos se o aumento da produção de espécies reativas em mitocôndrias hepáticas no grupo que recebeu dieta ocidentalizada, proveniente de mães inativas levaria a um quadro de estresse oxidativo e se a prática de AFVM seria capaz de melhorar o balanço oxidativo da prole, nos propomos analisar biomarcadores de estresse oxidativo, atividade de enzimas antioxidantes, além do sistema antioxidant não enzimático. Entre os biomarcadores de estresse oxidativo, considerando os níveis de MDA, houve diminuição significativa nos grupos de mães ativas e muito ativas, em comparação com o grupo de mães inativas que receberam dieta ocidentalizada. A peroxidação lipídica tem sido considerada um importante componente no processo patológico da obesidade (VINCENT, 2008). Os níveis de sulfidrilas aumentaram nos grupos de mães muito ativas em comparação às mães inativas, sugerindo aumento dos níveis de tióis totais.

Em relação a atividade do sistema antioxidant enzimático, nossos resultados mostraram aumento nas atividades da catalase (CAT) e da glutationa-s-transferase (GST) na prole de mães ativas e muito ativas quando comparadas ao grupo de mães inativas que receberam dieta ocidentalizada desde o período pós-desmame até a fase de adulto jovem. Alguns estudos já demonstraram o efeito da atividade física materna como um modulador positivo nos sistemas antioxidant enzimáticos (MCCOIN et al., 2019; SAIYIN et al., 2019).

O sistema das glutationas é considerado um importante antioxidant endógeno, podendo promover proteção contra agentes oxidantes e danos causados pela produção de EROS. A glutationa reduzida (GSH) pode atuar junto com a GST na expulsão de xenobióticos tóxicos produzidos pela peroxidação lipídica. Estudos observaram que os níveis reduzidos de glutationa diminuíram significativamente nos grupos que receberam dieta ocidentalizada (NOEMAN, HAMOODABAALASH, 2011; FEILLET-COUDRAY et al., 2019). A diminuição dos níveis de GSH e do estado REDOX celular (obtido pela razão GSH/GSSG) observado em nossos resultados corroboram com dados da literatura que mostraram o efeito da dieta ocidentalizada na alteração da homeostase do estado REDOX (MAZZOLI et al., 2019). A menor atividade do sistema antioxidant não enzimático em função do consumo da dieta

ocidentalizada pela prole ocorreu independentemente do nível de AFV materna.

A literatura tem mostrado que aumento de lipídios e ácidos graxos livres circulantes quando não catabolizados de forma eficiente podem resultar no aumento de adiposidade visceral, além de uma modificação na distribuição de gordura e consequente aumento da circunferência abdominal. Esta situação se deve, em parte, ao fato da inabilidade do tecido adiposo em estocar o excesso de energia, dessa forma, a sobrecarga de ácidos graxos livres é acumulada no músculo, coração, fígado, ou como gordura subcutânea (COOPER *et al.*, 2007; DESPRES e LEMIEUX, 2006). Sob essa condições, redistribuição de gorduras geralmente é acompanhada por infiltração de macrófagos, os quais liberam molecular pro-inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF), ou proteína C reativa gerando um quadro de resposta inflamatória crônica de baixo grau, como observado em algumas doenças crônicas, como a síndrome metabólica, por exemplo (BERG e SCHERER, 2005; GARCIA-GARCIA *et al.*, 2020; GETO *et al.*, 2020).

Na avaliação do peso do animal observamos um aumento nos grupos da prole que receberam dieta ocidentalizada, cujas mães realizaram AFV durante períodos críticos de desenvolvimento. Em relação ao peso do tecido hepático, observamos um aumento nos grupos da prole que receberam dieta ocidentalizada, na comparação com seus respectivos grupos controle, independentemente das mães terem ou não praticado AFV. A avaliação do peso tecido adiposo subcutâneo, abdominal e visceral mostrou um aumento do tecido adiposo abdominal e diminuição do tecido adiposo visceral nos grupos provenientes de mães ativas e que receberam dieta ocidentalizada pós desmame, em comparação com seu respectivo grupo inativo.

O consumo alimentar na prole mostrou que os grupos que receberam dieta ocidentalizada apresentaram menor ingestão da dieta no decorrer das semanas, no entanto, destaca-se que a ingestão calórica dos grupos de dieta ocidentalizada aumentou conforme a progressão das semanas, porém observamos dois fatores importantes que merecem destaque: o primeiro foi que os filhotes que receberam dietas ocidentalizadas sempre consumiam

menos componente calórico observado semanalmente, o segundo é que quando focamos em relação as calorias, aquelas derivadas dos lipídios foram maiores em comparação com o componente calórico da dieta controle.

A literatura tem mostrado respostas metabólicas positivas na prole de mães fisicamente ativas (HARRIS, BAERSTANFORD, 2018). Nossso estudo observou que a atividade física materna foi capaz de causar alterações em enzimas chaves de vias metabólicas específicas do ciclo glicose ácido graxo. Foi observado uma maior atividade da PFK, de acordo com o aumento do nível de atividade física, sugerindo um maior catabolismo de carboidratos, podendo também correlacionar devido a um grande aporte de nutrientes através de ambas as dietas ofertadas a prole após o desmame (observar valores de carboidratos ingeridos nas dietas na tabela 8). O mesmo observado na atividade da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), uma enzima limitante da velocidade da via das pentoses fosfato, com papel direto na produção de NADPH (coenzima ligada a atividade celular) (STANTON, 2012), seu aumento sugere uma maior demanda de NADPH, podendo reduzir deficiências celulares que poderiam levar a quadros patológicos, decorrentes de diminuição do estado REDOX celular e estresse oxidativo.

A avaliação do metabolismo lipídico mostrou que a atividade da enzima de síntese de ácidos graxos (FAS), apresentou diminuição na prole que recebeu dieta ocidentalizada de acordo com o nível de atividade física materna, e a atividade da β hidroxiacil-CoA-desidrogenase (β -Had), enzima chave da β -oxidação de ácidos graxos apresentou comportamento inverso, com aumento de sua atividade de acordo com o nível de atividade física materna, mostrando que as vias metabólicas estão atuantes e responsivas aos excessos causados pela dieta. A citrato sintase, enzima com papel importante no ciclo do ácido cítrico, apresentou aumento de sua atividade na prole de mães muito ativas e que receberam dieta ocidentalizada, sugerindo uma maior atividade desse ciclo possibilitando uma maior oferta de coenzimas reduzidas NADH_2 e FADH_2 para o metabolismo mitocondrial, além das ofertadas pelo aumento da oxidação de ácidos graxos. Esse maior aporte de coenzimas reduzidas possibilita uma maior velocidade da cadeia transportadora de elétrons e favorecimento da bioenergética mitocondrial.

Assim, os resultados visualizados na prole mostram que um ambiente de exposição a componentes nutricionais em desequilíbrio pode resultar em maior inchamento mitocondrial, aumento na produção de espécies reativas e diminuição de tióis totais , bem como alterações na atividade de enzimas chaves relacionadas ao metabolismo energético hepático que podem repercutir negativamente na saúde da prole a longo prazo e que a atividade física voluntaria materna minimizou esses efeitos, como também melhorou o balanço desses animais. Em resumo, nossos resultados sugerem que a atividade física voluntária materna pode atenuar efeitos de deletérios na prole, decorrentes da exposição a dieta ocidentalizada desde o período pós-desmame até a fase adulta.

CONCLUSÕES

Estudos indicam que a exposição materna a roda de corrida exerce efeitos positivos em várias vias biológicas do organismo, porém poucos mecanismos estão elucidados ou totalmente determinados. Nossa estudo sugere que a atividade física voluntária antes, durante e após a gestação pode causar impactos positivos em alguns parâmetros da bioenergética mitocondrial, balanço oxidativo e metabolismo, tanto nas mães quanto na sua prole e que mesmo diante da exposição a uma dieta ocidentalizada, o fígado é capaz de promover adaptações para minimizar danos decorrentes do desafio nutricional.

REFERÊNCIAS

. In: (Ed.). **Diet and Health: Implications for Reducing Chronic Disease Risk.** Washington (DC), 1989.

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

AKHAVAN, M. M.; FOROUTAN, T.; SAFARI, M.; SADIGHI-MOGHADDAM, B.; EMAMI-ABARGHOIE, M.; RASHIDY-POUR, A. Prenatal exposure to maternal voluntary exercise during pregnancy provides protection against mild chronic postnatal hypoxia in rat offspring. **Pak J Pharm Sci**, v. 25, n. 1, p. 233-8, Jan 2012.

ALHEIROS-LIRA, M. C.; ARAUJO, L. L.; TRINDADE, N. G.; DA SILVA, E. M.; CAVALCANTE, T. C.; DE SANTANA MUNIZ, G.; NASCIMENTO, E.; LEANDRO, C. G. Short- and long-term effects of a maternal low-energy diet ad libitum during gestation and/or lactation on physiological parameters of mothers and male offspring. **Eur J Nutr**, v. 54, n. 5, p. 793-802, Aug 2015.

ALP, P. R.; NEWSHOLME, E. A.; ZAMMIT, V. A. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **Biochem J**, v. 154, n. 3, p. 689-700, Mar 15 1976.

AMBRUS, A.; NEMERIA, N. S.; TOROCSIK, B.; TRETTNER, L.; NILSSON, M.; JORDAN, F.; ADAM-VIZI, V. Formation of reactive oxygen species by human and bacterial pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complexes reconstituted from recombinant components. **Free Radic Biol Med**, v. 89, p. 642-50, Dec 2015.

ARRUDA, A. P.; PERS, B. M.; PARLAKGUL, G.; GUNEY, E.; INOUYE, K.; HOTAMISLIGIL, G. S. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. **Nat Med**, v. 20, n. 12, p. 1427-35, Dec 2014.

BAUER, T. M.; MURPHY, E. Role of Mitochondrial Calcium and the Permeability Transition Pore in Regulating Cell Death. **Circ Res**, v. 126, n. 2, p. 280-293, Jan 17 2020.

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

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

_____. Calcium signalling remodelling and disease. **Biochem Soc Trans**, v. 40, n. 2, p. 297-309, Apr 2012.

BEVILACQUA, L.; RAMSEY, J. J.; HAGOPIAN, K.; WEINDRUCH, R.; HARPER, M. E. Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 286, n. 5, p. E852-61, May 2004.

BLOCH, K. V.; KLEIN, C. H.; SZKLO, M.; KUSCHNIR, M. C.; ABREU GDE, A.; BARUFALDI, L. A.; DA VEIGA, G. V.; SCHAAN, B.; DA SILVA, T. L.; DE VASCONCELLOS, M. T.; MORAES, A. J.; BORGES, A. L.; DE OLIVEIRA, A. M.; TAVARES, B. M.; DE OLIVEIRA, C. L.; CUNHA CDE, F.; GIANNINI, D. T.; BELFORT, D. R.; SANTOS, E. L.; DE LEON, E. B.; FUJIMORI, E.; OLIVEIRA, E. R.; MAGLIANO EDA, S.; VASCONCELOS FDE, A.; AZEVEDO, G. D.; BRUNKEN, G. S.; GUIMARAES, I. C.; FARIA NETO, J. R.; OLIVEIRA, J. S.; DE CARVALHO, K. M.; GONCALVES, L. G.; MONTEIRO, M. I.; SANTOS, M. M.; JARDIM, P. C.; FERREIRA, P. A.; MONTENEGRO, R. M., JR.; GURGEL, R. Q.; VIANNA, R. P.; VASCONCELOS, S. M.; GOLDBERG, T. B. ERICA: prevalences of hypertension and obesity in Brazilian adolescents. **Rev Saude Publica**, v. 50 Suppl 1, p. 9s, Feb 2016.

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**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

BRASIL. Vigil Brasil 2019 : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico : estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2019. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis**, 2020.

BRAUTIGAM, C. A.; WYNN, R. M.; CHUANG, J. L.; CHUANG, D. T. Subunit and catalytic component stoichiometries of an in vitro reconstituted human pyruvate dehydrogenase complex. **J Biol Chem**, v. 284, n. 19, p. 13086-98, May 08 2009.

BROCARDO, P. S.; BOEHME, F.; PATTEN, A.; COX, A.; GIL-MOHAPEL, J.; CHRISTIE, B. R. Anxiety- and depression-like behaviors are accompanied by an increase in oxidative stress in a rat model of fetal alcohol spectrum disorders: Protective effects of voluntary physical exercise. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 4, p. 1607-18, Mar 2012.

BROOKES, P. S.; YOON, Y.; ROBOTHAM, J. L.; ANDERS, M. W.; SHEU, S. S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 287, n. 4, p. C817-33, Oct 2004.

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

CARTER, L. G.; LEWIS, K. N.; WILKERSON, D. C.; TOBIA, C. M.; NGO TENLEP, S. Y.; SHRIDAS, P.; GARCIA-CAZARIN, M. L.; WOLFF, G.; ANDRADE, F. H.; CHARNIGO, R. J.; ESSER, K. A.; EGAN, J. M.; DE CABO, R.; PEARSON, K. J. Perinatal exercise improves glucose homeostasis in adult offspring. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 303, n. 8, p. E1061-8, Oct 15 2012.

CARTER, L. G.; QI, N. R.; DE CABO, R.; PEARSON, K. J. Maternal exercise improves insulin sensitivity in mature rat offspring. **Med Sci Sports Exerc**, v. 45, n. 5, p. 832-40, May 2013.

CARVALHO, M. F.; COSTA, M. K. M. E. D.; MUNIZ, G. D. S.; CASTRO, R. M. D.; NASCIMENTO, E. D. Experimental diet based on the foods listed in the Family Budget Survey is more detrimental to growth than to the reflex development of rats. **Revista de Nutrição**, v. 26, p. 28, 2013.

CHAUDHURI, D.; SANCAK, Y.; MOOTHA, V. K.; CLAPHAM, D. E. MCU encodes the pore conducting mitochondrial calcium currents. **Elife**, v. 2, p. e00704, Jun 4 2013.

CONSTABLE, S. H.; FAVIER, R. J.; MCLANE, J. A.; FELL, R. D.; CHEN, M.; HOLLOSZY, J. O. Energy metabolism in contracting rat skeletal muscle: adaptation to exercise training. **Am J Physiol**, v. 253, n. 2 Pt 1, p. C316-22, Aug 1987.

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

CROMPTON, M.; VIRJI, S.; DOYLE, V.; JOHNSON, N.; WARD, J. M. The mitochondrial permeability transition pore. **Biochem Soc Symp**, v. 66, p. 167-79, 1999.

CSORDAS, G.; GOLENAR, T.; SEIFERT, E. L.; KAMER, K. J.; SANCAK, Y.; PEROCCHI, F.; MOFFAT, C.; WEAVER, D.; DE LA FUENTE PEREZ, S.; BOGORAD, R.; KOTELANSKY, V.; ADIJANTO, J.; MOOTHA, V. K.; HAJNOCZKY, G. MICU1 controls both the threshold and cooperative activation of the mitochondrial Ca(2)(+) uniporter. **Cell Metab**, v. 17, n. 6, p. 976-87, Jun 4 2013.

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

DAUSSIN, F. N.; RASSENEUR, L.; BOUITBIR, J.; CHARLES, A. L.; DUFOUR, S. P.; GENY, B.; BURELLE, Y.; RICHARD, R. Different timing of changes in mitochondrial functions following endurance training. **Med Sci Sports Exerc**, v. 44, n. 2, p. 217-24, Feb 2012.

DE STEFANI, D.; RAFFAELLO, A.; TEARDO, E.; SZABO, I.; RIZZUTO, R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. **Nature**, v. 476, n. 7360, p. 336-40, Jun 19 2011.

DEPONTE, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 5, p. 3217-66, May 2013.

DI LISA, F.; KALUDERCIC, N.; CARPI, A.; MENABO, R.; GIORGIO, M. Mitochondria and vascular pathology. **Pharmacol Rep**, v. 61, n. 1, p. 123-30, Jan-Feb 2009.

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

DIMAUCO, I.; PARONETTO, M. P.; CAPOROSSI, D. Exercise, redox homeostasis and the epigenetic landscape. **Redox Biology**, v. 35, p. 101477, 2020/08/01 / 2020.

ECLARINAL, J. D.; ZHU, S.; BAKER, M. S.; PIYARATHNA, D. B.; COARFA, C.; FIOROTTO, M. L.; WATERLAND, R. A. Maternal exercise during pregnancy promotes physical activity in adult offspring. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 30, n. 7, p. 2541-2548, 2016.

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

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

FALCAO-TEBAS, F.; MARIN, E. C.; KUANG, J.; BISHOP, D. J.; MCCONELL, G. K. Maternal exercise attenuates the lower skeletal muscle glucose uptake and insulin secretion caused by paternal obesity in female adult rat offspring. **J Physiol**, v. 598, n. 19, p. 4251-4270, Oct 2020.

FERREIRA; LIU, Y.; FERNANDES, M. P.; LAGRANHA, C. J. Perinatal low-protein diet alters brainstem antioxidant metabolism in adult offspring. **Nutr Neurosci**, v. 19, n. 8, p. 369-375, Oct 2016.

FERREIRA, D. J.; DA SILVA PEDROZA, A. A.; BRAZ, G. R.; DA SILVA-FILHO, R. C.; LIMA, T. A.; FERNANDES, M. P.; DOI, S. Q.; LAGRANHA, C. J. Mitochondrial bioenergetics and oxidative status disruption in brainstem of weaned rats: Immediate response to maternal protein restriction. **Brain Res**, v. 1642, p. 553-61, Jul 01 2016.

FERRO CAVALCANTE, T. C.; LIMA DA SILVA, J. M.; DA MARCELINO DA SILVA, A. A.; MUNIZ, G. S.; DA LUZ NETO, L. M.; LOPES DE SOUZA, S.; MANHAES DE CASTRO, R.; FERRAZ, K. M.; DO NASCIMENTO, E. Effects of a westernized diet on the reflexes and physical maturation of male rat offspring during the perinatal period. **Lipids**, v. 48, n. 11, p. 1157-68, Nov 2013.

FIGUEIRA, T. R.; BARROS, M. H.; CAMARGO, A. A.; CASTILHO, R. F.; FERREIRA, J. C.; 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. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 16, p. 2029-74, Jun 01 2013.

FISHER-WELLMAN, K. H.; GILLIAM, L. A.; LIN, C. T.; CATHEY, B. L.; LARK, D. S.; NEUFER, P. D. Mitochondrial glutathione depletion reveals a novel role for the pyruvate dehydrogenase complex as a key H₂O₂-emitting source under conditions of nutrient overload. **Free Radic Biol Med**, v. 65, p. 1201-8, Dec 2013.

GALLOWAY, C. A.; LEE, H.; BROOKES, P. S.; YOON, Y. Decreasing mitochondrial fission alleviates hepatic steatosis in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 307, n. 6, p. G632-G641, 2014.

GARLAND, T., JR.; SCHUTZ, H.; CHAPPELL, M. A.; KEENEY, B. K.; MEEK, T. H.; COPES, L. E.; ACOSTA, W.; DRENOWATZ, C.; MACIEL, R. C.; VAN DIJK, G.; KOTZ, C. M.; EISENMANN, J. C. The biological control of voluntary exercise, spontaneous physical activity and daily energy expenditure in relation to obesity: human and rodent perspectives. **J Exp Biol**, v. 214, n. Pt 2, p. 206-29, Jan 15 2011.

GEBHARDT, R.; MATZ-SOJA, M. Liver zonation: Novel aspects of its regulation and its impact on homeostasis. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 26, p. 8491-504, Jul 14 2014.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. **Pediatr Res**, v. 56, n. 3, p. 311-7, Sep 2004.

GODFREY, K. M.; INSKIP, H. M.; HANSON, M. A. The long-term effects of prenatal development on growth and metabolism. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 29, n. 3, p. 257-265, 2011.

GRAY, M. W.; BURGER, G.; LANG, B. F. Mitochondrial evolution. **Science**, v. 283, n. 5407, p. 1476-81, Mar 05 1999.

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

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

HALESTRAP, A. P. Mitochondrial calcium in health and disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1787, n. 11, p. 1289-90, Nov 2009.

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

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

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

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

HAMILTON, J.; BRUSTOVETSKY, T.; RYSTED, J. E.; LIN, Z.; USACHEV, Y. M.; BRUSTOVETSKY, N. Deletion of mitochondrial calcium uniporter incompletely inhibits calcium uptake and induction of the permeability transition pore in brain mitochondria. **J Biol Chem**, v. 293, n. 40, p. 15652-15663, Oct 5 2018.

HAN, D.; JOHNSON, H. S.; RAO, M. P.; MARTIN, G.; SANCHETI, H.; SILKWOOD, K. H.; DECKER, C. W.; NGUYEN, K. T.; CASIAN, J. G.; CADENAS, E.; KAPLOWITZ, N. Mitochondrial remodeling in the liver following chronic alcohol feeding to rats. **Free Radic Biol Med**, v. 102, p. 100-110, Jan 2017.

HARRIS, J. E.; BAER, L. A.; STANFORD, K. I. Maternal Exercise Improves the Metabolic Health of Adult Offspring. **Trends Endocrinol Metab**, v. 29, n. 3, p. 164-177, Mar 2018.

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

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

IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares - Análise da disponibilidade Domiciliar de Alimentos e do Estado Nutricional no Brasil. p. 76, 2004.

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

KASPER, P.; BREUER, S.; HOFFMANN, T.; VOHLEN, C.; JANOSCHEK, R.; SCHMITZ, L.; APPEL, S.; FINK, G.; HUNSELER, C.; QUAAS, A.; DEMIR, M.; LANG, S.; STEFFEN, H. M.; MARTIN, A.; SCHRAMM, C.; BURGER, M.; MAHABIR, E.; GOESER, T.; DOTSCHE, J.; HUCKLENBRUCH-ROTHER, E.; BAE-GARTZ, I. Maternal Exercise Mediates Hepatic Metabolic Programming via Activation of AMPK-PGC1alpha Axis in the Offspring of Obese Mothers. **Cells**, v. 10, n. 5, May 19 2021.

KORS, L.; RAMPANELLI, E.; STOKMAN, G.; BUTTER, L. M.; HELD, N. M.; CLAESSEN, N.; LARSEN, P. W. B.; VERHEIJ, J.; ZUURBIER, C. J.; LIEBISCH, G.; SCHMITZ, G.; GIRARDIN, S. E.; FLORQUIN, S.; HOUTKOOPER, R. H.; LEEMANS, J. C. Deletion of NLRX1 increases fatty acid metabolism and prevents diet-induced hepatic steatosis and metabolic syndrome. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1864, n. 5, Part A, p. 1883-1895, 2018/05/01/ 2018.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett**, v. 495, n. 1-2, p. 12-5, Apr 20 2001.

KOWALTOWSKI, A. J.; DE SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radic Biol Med**, v. 47, n. 4, p. 333-43, Aug 15 2009.

LAKER, R. C.; LILLARD, T. S.; OKUTSU, M.; ZHANG, M.; HOEHN, K. L.; CONNELLY, J. J.; YAN, Z. Exercise prevents maternal high-fat diet-induced hypermethylation of the Pgc-1 α gene and age-dependent metabolic dysfunction in the offspring. **Diabetes**, v. 63, n. 5, p. 1605-11, May 2014.

LEANDRO, C. G.; FIDALGO, M.; BENTO-SANTOS, A.; FALCAO-TEBAS, F.; VASCONCELOS, D.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; CARPINELLI, A. R.; HIRABARA, S. M.; CURI, R. Maternal moderate physical training during pregnancy attenuates the effects of a low-protein diet on the impaired secretion of insulin in rats: potential role for compensation of insulin resistance and preventing gestational diabetes mellitus. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 805418, 2012.

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

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

M AKHAVAN, M.; MILADI-GORJI, H.; EMAMI-ABARGHOIE, M.; SAFARI, M.; SADIGHI-MOGHADDAM, B.; A VAFAEI, A.; RASHIDY-POUR, A. Maternal Voluntary Exercise during Pregnancy Enhances the Spatial Learning Acquisition but not the Retention of Memory in Rat Pups via a TrkB-mediated Mechanism: The Role of Hippocampal BDNF Expression. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 16, n. 9, p. 955-961, 2013.

MALETH, J.; HEGYI, P. Ca $^{2+}$ toxicity and mitochondrial damage in acute pancreatitis: translational overview. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 371, n. 1700, Aug 05 2016.

MALLILANKARAMAN, K.; CARDENAS, C.; DOONAN, P. J.; CHANDRAMOORTHY, H. C.; IRRINKI, K. M.; GOLENAR, T.; CSORDAS, G.; MADIREDDI, P.; YANG, J.; MULLER, M.; MILLER, R.; KOLESAR, J. E.; MOLGO, J.; KAUFMAN, B.; HAJNOCZKY, G.; FOSKETT, J. K.; MADESH, M. MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca(2+) uptake that regulates cellular metabolism. **Nat Cell Biol**, v. 17, n. 7, p. 953, Jul 2015.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol**, v. 62, n. 4A, p. 609-14, Nov 2002.

MARGULIS, L. Recombination of non-chromosomal genes in Chlamydomonas: assortment of mitochondria and chloroplasts? **J Theor Biol**, v. 26, n. 2, p. 337-42, Feb 1970.

MARGULIS, M. S.; ROZENTAL, R. L.; SONDORE, A. A.; KRYLOV, I. K.; ANDREIMAN, L. A. [Biochemical and morphologic changes during the removal of the liver for extracorporeal perfusion]. **Vestn Khir Im I I Grek**, v. 105, n. 10, p. 30-4, Oct 1970.

MAZZOLI, A.; CRESCENZO, R.; CIGLIANO, L.; SPAGNUOLO, M. S.; CANCELLIERE, R.; GATTO, C.; IOSSA, S. Early Hepatic Oxidative Stress and Mitochondrial Changes Following Western Diet in Middle Aged Rats. **Nutrients**, v. 11, n. 11, Nov 5 2019.

MEJIA, E. M.; HATCH, G. M. Mitochondrial phospholipids: role in mitochondrial function. **J Bioenerg Biomembr**, v. 48, n. 2, p. 99-112, Apr 2016.

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

MELOV, S.; RAVENSCROFT, J.; MALIK, S.; GILL, M. S.; WALKER, D. W.; CLAYTON, P. E.; WALLACE, D. C.; MALFROY, B.; DOCTROW, S. R.; LITHGOW, G. J. Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1567-9, Sep 01 2000.

MINXUAN, X.; SUN, Y.; DAI, X.; ZHAN, J.; LONG, T.; XIONG, M.; LI, H.; KUANG, Q.; TANG, T.; QIN, Y.; CHENXU, G.; JUN, T. Fisetin attenuates high fat diet-triggered hepatic lipid accumulation: A mechanism involving liver inflammation overload associated TACE/TNF- α pathway. **Journal of Functional Foods**, v. 53, p. 7-21, 2019/02/01/ 2019.

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

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

MUNIZ, G. D. S. Influência dos níveis de atividade física voluntária das mães sobre a glicemina e ingestão alimentar e a plasticidade fenotípica de filhotes durante o período de crescimento e desenvolvimento. 2013.

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

NICHOLLS, D.; AKERMAN, K. Mitochondrial calcium transport. **Biochim Biophys Acta**, v. 683, n. 1, p. 57-88, Sep 1 1982.

NOEMAN, S. A.; HAMOODA, H. E.; BAALASH, A. A. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. **Diabetol Metab Syndr**, v. 3, n. 1, p. 17, Aug 03 2011.

ORR, A. L.; QUINLAN, C. L.; PEREVOSHCHIKOVA, I. V.; BRAND, M. D. A refined analysis of superoxide production by mitochondrial sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase. **J Biol Chem**, v. 287, n. 51, p. 42921-35, Dec 14 2012.

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

PARNPIANSIL, P.; JUTAPAKDEEGUL, N.; CHENTANEZ, T.; KOTCHABHAKDI, N. Exercise during pregnancy increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor mRNA expression and spatial learning in neonatal rat pup. **Neurosci Lett**, v. 352, n. 1, p. 45-8, Nov 27 2003.

PATRON, M.; CHECCHETTO, V.; RAFFAELLO, A.; TEARDO, E.; VECELLIO REANE, D.; MANTOAN, M.; GRANATIERO, V.; SZABO, I.; DE STEFANI, D.; RIZZUTO, R. MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca²⁺ uniporter by exerting opposite effects on MCU activity. **Mol Cell**, v. 53, n. 5, p. 726-37, Mar 6 2014.

PAUPE, V.; PRUDENT, J. New insights into the role of mitochondrial calcium homeostasis in cell migration. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 500, n. 1, p. 75-86, May 27 2018.

PFANNER, N.; WARSCHIED, B.; WIEDEMANN, N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 20, n. 5, p. 267-284, May 2019.

POWER, M. L.; SCHULKIN, J. Maternal regulation of offspring development in mammals is an ancient adaptation tied to lactation. **Appl Transl Genom**, v. 2, p. 55-63, Dec 1 2013.

POWERS, S. K.; SEN, C. K. Part IV • Chapter 10 - Physiological antioxidants and exercise training. In: SEN, C. K.;PACKER, L., et al (Ed.). **Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise**. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2000. p.221-242.

PUTTI, R.; SICA, R.; MIGLIACCIO, V.; LIONETTI, L. Diet impact on mitochondrial bioenergetics and dynamics. **Frontiers in physiology**, v. 6, p. 109-109, 2015.

QUILES, J. L.; HUERTAS, J. R.; MAÑAS, M.; OCHOA, J. J.; BATTINO, M.; MATAIX, J. Dietary fat type and regular exercise affect mitochondrial composition and function depending on specific tissue in the rat. **J Bioenerg Biomembr**, v. 33, n. 2, p. 127-34, Apr 2001.

QUINLAN, C. L.; ORR, A. L.; PEREVOSHCHIKOVA, I. V.; TREBERG, J. R.; ACKRELL, B. A.; BRAND, M. D. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. **J Biol Chem**, v. 287, n. 32, p. 27255-64, Aug 03 2012.

RAFFAELLO, A.; DE STEFANI, D.; SABBADIN, D.; TEARDO, E.; MERLI, G.; PICARD, A.; CHECCHETTO, V.; MORO, S.; SZABO, I.; RIZZUTO, R. The mitochondrial calcium uniporter is a multimer that can include a dominant-negative pore-forming subunit. **EMBO J**, v. 32, n. 17, p. 2362-76, Aug 28 2013.

RECTOR, R. S.; THYFAULT, J. P.; MORRIS, R. T.; LAYE, M. J.; BORENGASSER, S. J.; BOOTH, F. W.; IBDAH, J. A. Daily exercise increases hepatic fatty acid oxidation and prevents steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 294, n. 3, p. G619-26, Mar 2008.

RECTOR, R. S.; UPTERGROVE, G. M.; MORRIS, E. M.; BORENGASSER, S. J.; LAUGHLIN, M. H.; BOOTH, F. W.; THYFAULT, J. P.; IBDAH, J. A. Daily exercise vs. caloric restriction for prevention of nonalcoholic fatty liver disease in the OLETF rat model. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 300, n. 5, p. G874-83, May 2011.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic Biol Med**, v. 49, n. 11, p. 1603-16, Dec 01 2010.

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

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

SANCAK, Y.; MARKHARD, A. L.; KITAMI, T.; KOVACS-BOGDAN, E.; KAMER, K. J.; UDESHI, N. D.; CARR, S. A.; CHAUDHURI, D.; CLAPHAM, D. E.; LI, A. A.; CALVO, S. E.;

GOLDBERGER, O.; MOOTHA, V. K. EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex. **Science**, v. 342, n. 6164, p. 1379-82, Dec 13 2013.

SANTANA MUNIZ, G.; BESERRA, R.; DA SILVA GDE, P.; FRAGOSO, J.; LIRA ADE, O.; NASCIMENTO, E.; MANHAES DE CASTRO, R.; LEANDRO, C. G. Active maternal phenotype is established before breeding and leads offspring to align growth trajectory outcomes and reflex ontogeny. **Physiol Behav**, v. 129, p. 1-10, Apr 22 2014.

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

SANTOS-ALVES, E.; MARQUES-ALEIXO, I.; RIZO-ROCA, D.; TORRELLA, J. R.; OLIVEIRA, P. J.; MAGALHAES, J.; ASCENSAO, A. Exercise modulates liver cellular and mitochondrial proteins related to quality control signaling. **Life Sci**, v. 135, p. 124-30, Aug 15 2015.

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

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

SENA, L. A.; CHANDEL, N. S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. **Mol Cell**, v. 48, n. 2, p. 158-67, Oct 26 2012.

SHELDON, R. D.; NICOLE BLAIZE, A.; FLETCHER, J. A.; PEARSON, K. J.; DONKIN, S. S.; NEWCOMER, S. C.; RECTOR, R. S. Gestational exercise protects adult male offspring from high-fat diet-induced hepatic steatosis. **J Hepatol**, v. 64, n. 1, p. 171-8, Jan 2016.

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

STANFORD, K. I.; LEE, M. Y.; GETCHELL, K. M.; SO, K.; HIRSHMAN, M. F.; GOODYEAR, L. J. Exercise before and during pregnancy prevents the deleterious effects of maternal high-fat feeding on metabolic health of male offspring. **Diabetes**, v. 64, n. 2, p. 427-33, Feb 2015.

STANFORD, K. I.; TAKAHASHI, H.; SO, K.; ALVES-WAGNER, A. B.; PRINCE, N. B.; LEHNIG, A. C.; GETCHELL, K. M.; LEE, M. Y.; HIRSHMAN, M. F.; GOODYEAR, L. J. Maternal Exercise Improves Glucose Tolerance in Female Offspring. *v. 66, n. 8, p. 2124-2136, Aug 2017.*

STANTON, R. C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life*, v. 64, n. 5, p. 362-9, May 2012.

STAROV, A. A.; FISKUM, G.; CHINOPoulos, C.; LORENZO, B. J.; BROWNE, S. E.; PATEL, M. S.; BEAL, M. F. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci*, v. 24, n. 36, p. 7779-88, Sep 08 2004.

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

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

TIPTON, K. F.; BOYCE, S.; O'SULLIVAN, J.; DAVEY, G. P.; HEALY, J. Monoamine oxidases: certainties and uncertainties. *Curr Med Chem*, v. 11, n. 15, p. 1965-82, Aug 2004.

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.; PAOLOCCI, N. Playing with cardiac "redox switches": the "HNO way" to modulate cardiac function. *Antioxid Redox Signal*, v. 14, n. 9, p. 1687-98, May 01 2011.

TONINELLO, A.; SALVI, M.; PIETRANGELI, P.; MONDOVI, B. Biogenic amines and apoptosis: minireview article. *Amino Acids*, v. 26, n. 4, p. 339-43, Jul 2004.

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

TRETTTER, L.; TAKACS, K.; HEGEDUS, V.; ADAM-VIZI, V. Characteristics of alpha-glycerophosphate-evoked H₂O₂ generation in brain mitochondria. *J Neurochem*, v. 100, n. 3, p. 650-63, Feb 2007.

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

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

YAMAMOTO, T.; OHKUWA, T.; ITOH, H.; SATO, Y.; NAOI, M. Effect of gender differences and voluntary exercise on antioxidant capacity in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 132, n. 4, p. 437-444, 2002/08/01/ 2002.

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

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

ZANATTA, A.; MOURA, A. P.; TONIN, A. M.; KNEBEL, L. A.; GRINGS, M.; LOBATO, V. A.; RIBEIRO, C. A.; DUTRA-FILHO, C. S.; LEIPNITZ, G.; WAJNER, M. Neurochemical evidence that the metabolites accumulating in 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency induce oxidative damage in cerebral cortex of young rats. **Cell Mol Neurobiol**, v. 33, n. 1, p. 137-46, Jan 2013.

ANEXO

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 Recife PE Brasil
phones: (55 81) 2126 6840 | 2126 6351
fax: (55 81) 2126 6350
www.cob.ufpe.br

Recife, 01 de setembro de 2017.

Ofício nº 88/17

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

Para: Prof.^a Mariana Pinheiro Fernandes

Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte

Centro Acadêmico da Vitória

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.017125/2017-47

Certificamos que a proposta intitulada “**Efeito da atividade física voluntária materna sobre o metabolismo e a bioenergética mitocondrial no fígado de filhotes de ratos submetidos a uma dieta ‘ocidentalizada’ pós-desmame: estudo de marcadores epigenéticos de enzimas envolvidas no ciclo glicose-ácido graxo**”, registrada com o nº 23076.017125/2017-47, sob a responsabilidade de Prof.^a Mariana Pinheiro Fernandes - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 30/08/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/09/2017 a 01/03/2020
Espécie/linhagem/raça	Ratos heterogênicos Wistar
Nº de animais	64
Peso/Idade	220-260g / 85-95 dias
Sexo	Machos (52) e fêmeas (12)
Origem	Biotério do CAV-UFPE

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPÉ 1801584

ANEXO B – Publicações

Anexo B I – Publicação na temática da tese

 **frontiers**
in Endocrinology

ORIGINAL RESEARCH
published: 27 November 2020
doi: 10.3389/fendo.2020.598922



Aerobic Exercise Training Exerts Beneficial Effects Upon Oxidative Metabolism and Non-Enzymatic Antioxidant Defense in the Liver of Leptin Deficiency Mice

Matheus Santos de Souza Fernandes¹, Lucas de Lucena de Simões e Silva¹,
Márcia Saldanha Kubrusy², Tatita Ricaly Lopes de Arruda Lima³,
Cynthia Rodrigues Müller⁴, Anna Laura Vacave Amâncio⁴, Mariana Pinheiro Fernandes⁵,
Bruno Cogliati⁶, José Tadeu Stefanò⁶, Cláudia Jacques Lagranha⁶,
Fabiana S. Evangelista⁶ and Cláudia P. Oliveira^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:
Karine Clement,
Grenoble University, France

Reviewed by:
Yi Wang,
Duke Heart and Diabetes Institute,
Durham, NC, United States;
Zhenqiang Tang,
Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, United States

***Correspondence:**
Claudia P. Oliveira,
cpoliveira@uol.com.br

Specialty section:
This article was submitted to
Endocrinology, a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 10 August 2020
Accepted: 22 October 2020
Published: 27 November 2020

Citation:
Fernandes MSt, Silva LSS, Müller CR,
Lima ALV, Amâncio LA, Pinheiro MF, et al. Aerobic Exercise Training Exerts Beneficial Effects Upon Oxidative Metabolism and Non-Enzymatic Antioxidant Defense in the Liver of Leptin Deficiency Mice. *Frontiers in Endocrinology*. 2020;11:598922. doi: 10.3389/fendo.2020.598922

1 Laboratório de Gastroenterologia Clínica e Experimental (LGA-07), Division of Clinical Gastroenterology and Hepatology, Hospital das Clínicas (HCFMRP), Department of Gastroenterology, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ² Laboratório de Transplante e Cirurgia do Fígado (LTF-07), Hospital das Clínicas (HCFMRP), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ³ Federal University of Paraná, Academic Center of Work, Pontevedra, Brazil; ⁴ Department of Experimental Pathophysiology, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁵ Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁶ School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common forms of liver disease, which is associated with several etiological factors, including stress and dysfunction in oxidative metabolism. However, studies showed that aerobic exercise training (AET) can combat the oxidative stress (OS) and improves mitochondrial functionality in the NAFLD. To test the hypothesis that AET improves oxidative metabolism and antioxidant defense in the liver of *ob/ob* mice. Male *ob/ob* mice with eight weeks old were separated into two groups: the sedentary group (S), n=7, and the trained group (T), n=7. The T mice were submitted to an 8-week protocol of AET at 60% of the maximum velocity achieved in the running capacity test. Before AET, no difference was observed in running test between the groups ($S=10.4 \pm 0.7$ min vs. $T=13 \pm 0.47$ min). However, after AET, the running capacity was increased in the T group (12.8 ± 0.87 min) compared to the S group (7.2 ± 0.63 min). In skeletal muscle, the T group (26.91 ± 1.12 U/mg of protein) showed higher citrate synthase activity compared with the S group (19.28 ± 0.88 U/mg of protein) ($p < 0.0001$). In the analysis of BW evolution, significant reductions were seen in the T group as of the fourth week when compared to the S group. In addition, food intake was not significantly different between the groups. Significant increases were observed in the activity of enzymes citrate synthase ($p < 0.004$) and β -HAD ($p < 0.01$) as well as in $PGC-1\alpha$ gene expression ($p < 0.002$) in the liver of T group. The levels of TBARs and carbonyls, as well as SOD, CAT and GST were not different between the groups. However, in the nonenzymatic antioxidant system, we found that the T group had

Anexo B II – Publicação na temática da tese

ARTICLE IN PRESS

Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases (xxxx) xxx, xxx
Available online at www.sciencedirect.com

Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases
journal homepage: www.elsevier.com/locate/nmcd

Moderate offspring exercise offsets the harmful effects of maternal protein deprivation on mitochondrial function and oxidative balance by modulating sirtuins

Anderson Apolonio Silva Pedroza ^a, Elenilson M. Bernardo ^a, Allifer R. Pereira ^b,
Severina Cassia Andrade Silva ^c, Talitta A. Lima ^b, Cristiane de Moura Freitas ^b,
José Carlos da Silva Junior ^c, Dayane A. Gomes ^c, Diorginis S. Ferreira ^d,
Claudia J. Lagranha ^{a,b,*}

^a Biochemistry and Physiology Graduate Program, Federal University of Paraná, Brazil, Brazil
^b Laboratory of Biochemistry and Nutritional Biochemistry, Department of Physical Sciences and Sports Sciences, UFSC, Federal University of Paraná, Brazil
^c Nutrigenomics and Behavior Science Graduate Program, Federal University of Paraná-UFPR, Brazil, Paraná, Brazil
^d College of Biological Ethics, Federal University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

Received 10 July 2020; revised in revised form 20 December 2020; accepted 8 January 2021
Handling Editor: A. Sarti
Available online ■ ■ ■

KEYWORDS
Maternal low-protein diet;
Childhood exercise;
Heart;
Oxidative stress;
Epigenetic

Abstract Background and aims: It has been demonstrated that maternal low protein during development induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the heart. Moderate-intensity exercise in early life, conversely, increases the overall cardiac health. Thus, we hypothesize that moderate-intensity exercise performed during young age could ameliorate the deleterious effect of maternal protein deprivation on cardiac mitochondria. Methods: We used pregnant rats fed with a low-protein diet (15% casein) or a normal diet (20% casein) during gestation and lactation period followed by an offspring treadmill moderate physical training. Pregnant rats were divided into two groups: normal nutrition receiving 17% of casein in the diet and undernutrition receiving a low-protein diet (8% casein). At 30 days of age, the male offspring were further subdivided into sedentary (NS and LS) or exercised (NT and LT) groups. Treadmill exercise was performed as follows: 4 weeks, 5 days/week, 60 min/day at 50% of maximal running capacity. Our results showed that a low-protein diet decreases oxidative metabolism and mitochondrial function associated with higher oxidative stress. In contrast, exercise rescues mitochondrial capacity and prevents the increase in the levels of malondialdehyde and carbonyl protein and 3-dehydroacetylamin levels, reducing thus the deleterious effect of protein restriction. Conclusion: Our findings show that moderate-day exercise during a young age acts as a therapeutic intervention opposing the harmful effects of a maternal diet restricted in protein.

© 2021 The Italian Diabetes Society, the Italian Society for the Study of Atherosclerosis, the Italian Society of Human Nutrition and the Department of Clinical Medicine and Surgery, Federico II University. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author: Rua Álvaro da Ribeiro, 01975-000 – Núcleo de Educação Pós-Graduação do Experiente – Bela Vista – Vitória da Santo Antão, PE – Brazil. Phone/fax: (010) 55 811 3523335.
E-mail address: lagranha@ufsc.br (C.J. Lagranha).

https://doi.org/10.1016/j.nmcd.2020.08.008
0967-6568/\$ - see front matter © 2021 The Italian Diabetes Society, the Italian Society for the Study of Atherosclerosis, the Italian Society of Human Nutrition and the Department of Clinical Medicine and Surgery, Federico II University. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Anexo B III – Publicação de artigo com colaboração

Ecotoxicology and Environmental Safety 219 (2021) 112337



Impact of environmental mercury exposure on the blood cells oxidative status of fishermen living around Mundau lagoon in Maceió – Alagoas (AL), Brazil

Reginaldo Silva-Filho^{a,b}, Nereson Santos^a, Mayara Costa Santos^c, Abner Nunes^c, Raphael Pinto^d, Chiara Marinho^d, Talitta Lima^d, Mariana P. Fernandes^e, José Carinhanha C. Santos^{b,c,f}, Ana Catarina R. Leite^{a,c,g}

^a Laboratory of Biostatistics, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil

^b Laboratory of Instrumentation and Developments in Analytical Chemistry, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil

^c Research Group of Organic and Chemical Toxicity, Federal University of Alagoas, Maceió AL, Brazil

^d Catholic University Católica, Brazil, Brazil

^e Laboratory of Biochemistry and Enzyme Biochemistry, Academic Center of Pharmacy, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

^f Laboratory of Biostatistics, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

^g Laboratory of Biostatistics

ARTICLE INFO

Edited by: Paul Riley

Keywords

Aquatic environment exposure

Antioxidant systems

Blood cells

Oxidative stress

Mercury toxicity

ABSTRACT

Mercury in the aquatic environment can lead to exposure of the human population and is a known toxic metal due to its capacity for accumulation in organs. We aimed to evaluate the mercury levels in the blood and urine of fishermen and correlate it with the level of oxidative stress in blood cells. We show in this case-control study that the fishermen of the exposed group (n=66) of Mundau Lagoon (Maceió - Alagoas, Brazil) have higher concentrations of total mercury in the blood ($0.73\text{--}4.39 \mu\text{g L}^{-1}$) and urine ($0.430\text{--}1.62 \mu\text{g L}^{-1}$) than the total mercury concentrations in blood ($0.29\text{--}17.30 \mu\text{g L}^{-1}$) and urine ($0.150\text{--}2.10 \mu\text{g L}^{-1}$) of the control group. In the blood cells of fishermen, there was a significant increase in the high level of lipid peroxidation (151%) and protein oxidation (41.0%), and the erythrocytes presented increased lipid peroxidation (151%) and protein oxidation (41.0%) and a decrease in total thiol (26.9%), GSH and the REDOX state (16.9%). The activity of antioxidant enzymes (SOD, GPx, and GST) was also reduced in the exposed group by 25.9%, 23.9%, and 19.0%, respectively. Furthermore, iron content uptake was higher in the exposed group (40.0%), and the mean erythrocyte presented increased membrane fluidity (15.6%) compared to the control group (10.0%). These results suggest that mercury in the blood of fishermen can be responsible for causing impairments in the oxidative status of blood cells and is probably the cause of the reduction in oxygen uptake capacity and damage to the membranes of erythrocytes.

1. Introduction

Mercury (Hg) is a toxic element that is released into the environment by natural sources and through human anthropic activities (industrial, mining, and burning of fossil fuels). In contact with the environment, inorganic mercury can be transformed into its organic form methyl mercury, one of the most toxic. The organic form of mercury can accumulate in fish, mollusks, crustaceans, and other organisms that are consumed by humans, thus leading to contamination. After food

digestion, the methyl mercury-containing esters in the body, and the mercurial can be absorbed and distributed to various tissues (Hoogendoorn et al., 2019; Rafati-Rahimzadeh et al., 2014).

Contamination by mercury has been related to diseases, including cancer, cardiovascular disease, stroke, liver fibrosis, and damage to the immune system and neurological disturbances, which could be related to oxidative stress, and it can bind to hemoglobin and other proteins in erythrocytes in the blood (Ao et al., 2019; Gyaneshwari et al., 2019; Joice et al., 2014; Saini et al., 2014).

* Corresponding author.

E-mail addresses: joses@ufpe.br (J.C.C. Santos), ana.leite@ufpe.br (A.C.R. Leite).

^a ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-9626-5122>

^b ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-3426-2327>

^c ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-3426-2327>

^d ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-3426-2327>

^e ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-3426-2327>

^f ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-3426-2327>

^g ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-3426-2327>

^{Received 27 October 2020; Received in revised form 6 May 2021; Accepted 10 May 2021}

^{Available online 21 May 2021}

^{© 2021 Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).}

Anexo B IV – Publicação de Capítulo de livro



CAPÍTULO 8 62

ATIVIDADE FÍSICA MATERNA PODE MODULAR O BALANÇO OXIDATIVO E METABOLISMO DA PROLE SUBMETIDA A INSULTOS NUTRICIONAIS?

José Winglinson de Oliveira Santos

Letícia da Silva Pachêco

Talitta Ricarly Lopes de Arruda Lima

Mariana Pinheiro Fernandes

DOI 10.22533/at.ed.4212015058

CAPÍTULO 8

ATIVIDADE FÍSICA MATERNA PODE MODULAR O BALANÇO OXIDATIVO E METABOLISMO DA PROLE SUBMETIDA A INSULTOS NUTRICIONAIS?

Data de Submissão: 13/03/2020

Data de aceite: 05/05/2020

José Winglinson de Oliveira Santos
Universidade Federal de Pernambuco, Centro
Acadêmico de Vitória – UPE/CAV, Departamento
de Educação Física e Ciências do Esporte
Vitória de Santo Antônio – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/8450353008016834>

Letícia da Silva Pachêco
Universidade Federal de Pernambuco, Centro
Acadêmico de Vitória – UPE/CAV, Departamento
de Nutrição
Vitória de Santo Antônio – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/169904293168668>

Talitta Ricarly Lopes de Arruda Lima
Universidade Federal de Pernambuco, Centro
Acadêmico de Vitória – UPE/CAV, Departamento
de Nutrição
Vitória de Santo Antônio – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/0949273947392786>

Mariana Pinheiro Fernandes
Universidade Federal de Pernambuco, Centro
Acadêmico de Vitória – UPE/CAV, Departamento
de Educação Física e Ciências do Esporte
Vitória de Santo Antônio – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/4587022635759957>

RESUMO: A prevalência do sobrepeso e obesidade tem aumentado nos últimos anos e a literatura científica vem demonstrando que isso

pode estar atrelado a exposição a um ambiente de escassez nutricional ou a um ambiente obesogênico durante períodos precoces da vida podendo acarretar em repercuções negativas ao organismo durante o seu crescimento e desenvolvimento. A atividade física materna tem sido vista como um importante mecanismo de intervenção no surgimento de doenças metabólicas na vida adulta, sendo capaz de minimizar efeitos decorrentes da exposição a um ambiente desequilibrado nutricionalmente promovendo importantes modulações em biomarcadores de estresse oxidativo, no sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático, além de promover modulações em genes do metabolismo..

PALAVRAS-CHAVE: Bioenergética, estresse oxidativo, nutrição, programação fetal

**CAN MATERNAL PHYSICAL ACTIVITY
MODULATES THE OXIDATIVE BALANCE
AND METABOLISM OF THE OFFSPRING
SUBJECTED TO NUTRITIONAL INSULTS?**

ABSTRACT: The prevalence of overweight and obesity has increased in recent years and the scientific literature has shown that this may be linked to exposure to environment of nutritional scarcity or to obesogenic environment during early periods of life, which can result in negative repercussions to the body during