



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE**

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - CCS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO  
COMPORTAMENTO – POSNEURO**

**DAVID FILIPE DE SANTANA**

**RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO  
ALTERA A FUNÇÃO MITOCONDRIAL E O ESTRESSE OXIDATIVO NO TRONCO  
ENCEFÁLICO DE FILHOTES MACHOS E FÊMEAS POR DUAS GERAÇÕES**

**RECIFE – PE**

**2016**

**DAVID FILIPE DE SANTANA**

**RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO  
ALTERA A FUNÇÃO MITOCONDRIAL E O ESTRESSE OXIDATIVO NO TRONCO  
ENCEFÁLICO DE FILHOTES MACHOS E FÊMEAS POR DUAS GERAÇÕES**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Neuropsiquiatria e Ciência do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Neurociência.

**ORIENTADORA:**

Prof.<sup>(a)</sup> Dr<sup>a</sup>. Cláudia Jacques Lagranha

Doutora em Fisiologia Humana pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP).

Prof.<sup>(a)</sup> Adjunto III do núcleo de Educação Física da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) do Centro Acadêmico de Vitória (UFPE- CAV).

**COORIENTADORA:**

Prof.<sup>(a)</sup> Dr<sup>a</sup>. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa

Doutora em Ciências Biológicas (Biofísica) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Prof.<sup>(a)</sup> Adjunto I do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco do Centro de Ciências da Saúde (UFPE – CCS).

**RECIFE – PE**

**2016**

Catálogo na Fonte  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- S232r      Santana, David Filipe de.  
Restrição proteica materna durante a gestação e lactação altera a função mitocondrial e o estresse oxidativo no tronco encefálico de filhotes machos e fêmeas por duas gerações / David Filipe de Santana. – 2016.  
133 f.: il.; tab.; 30 cm.
- Orientadora: Cláudia Jacques Lagranha.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento. Recife, 2016.  
Inclui referências, apêndices e anexos.
1. Desnutrição. 2. Estresse oxidativo. 3. Sexo. I. Lagranha, Cláudia Jacques (Orientadora). II. Título.
- 615.8      CDD (23.ed.)      UFPE (CCS2017-311)

**DOUTORAMENTO REALIZADO POR:**

**DAVID FILIPE DE SANTANA**

**TÍTULO DA TESE:**

Restrição proteica materna durante a gestação e lactação altera a função mitocondrial e o estresse oxidativo no tronco encefálico de filhotes machos e fêmeas por duas gerações.

**APROVADO EM: 21/12/2016**

**BANCA EXAMINADORA**

**Dr<sup>a</sup>. CLÁUDIA JACQUES LAGRANHA**

**Instituição:** Prof.<sup>(a)</sup> Adjunto III do Núcleo de Educação Física da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) do Centro Acadêmico de Vitória (UFPE- CAV).

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Dr. JOSÉ LUIZ DE BRITO ALVES**

**Instituição:** Prof. Adjunto I do Departamento de Nutrição da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Dr. MARCELO CAIRRÃO ARAUJO RODRIGUES**

**Instituição:** Prof. Adjunto I do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal da Pernambuco (UFPE).

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Dr<sup>a</sup>. MARIANA PINHEIRO FERNANDES**

**Instituição:** Prof.<sup>(a)</sup> Adjunto IV do Núcleo de Educação Física da Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória (UFPE – CAV).

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Dr. EDUARDO CARVALHO LIRA**

**Instituição:** Prof. Adjunto II do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal da Pernambuco (UFPE).

Assinatura: \_\_\_\_\_

Dedico este trabalho a algumas pessoas que foram essenciais nessa caminhada, em especial a minha vó **Maria das Graças de Santana**, minha mãe **Ana Lúcia de Santana**, meu irmão **Denys Luis de Santana** e minha noiva **Priscila Vanessa Tavares da Silva** por todo zelo, amor, motivação, cuidado, compreensão, dedicação e incentivo antes e durante o desenvolvimento dessa tese. Muito além do título, esse momento é a realização de um sonho e eu dedico a vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe, Ana Lúcia de Santana e a minha vó, Maria das Graças de Santana, por tudo que fizeram para eu chegar até aqui, pelo carinho, zelo, atenção, educação, cuidado, orientação e compreensão nos momentos de ausência e dificuldades. O cuidado de vocês, junto com a humildade e o jeito carinhoso de tratar o próximo me tornaram a pessoa que sou hoje. Vocês são simplesmente a razão para tudo na minha vida; Muito obrigado.

À meu irmão Denys Luiz de Santana, por todo apoio e incentivo na minha caminhada acadêmica;

À minha noiva Priscila Vanessa Tavares da Silva, pela paciência, lealdade, compreensão, acolhimento, dedicação, amor e carinho durante mais esses anos de caminhada. Ter você ao meu lado me deixou mais forte. Sair de uma realidade humilde como saiu e através dos estudos conseguir ingressar em um dos mais respeitados institutos de pesquisas e residência do Brasil só me dar orgulho e me inspira a cada dia. Aos meus sogros, Geraldo e Maria pelo acolhimento em sua casa e pela confiança em mim depositada. TE AMO e meu muito obrigado por tudo;

À minha orientadora, Prof.<sup>(a)</sup> Dr<sup>a</sup>. Cláudia Jacques Lagranha, pela oportunidade de fazer o doutoramento em seu laboratório, por guiar meus passos nesse momento. As chamadas de atenção e orientações quanto ao comportamento e postura que deve ter um aluno de pós-graduação assim como as discussões científicas fazem da senhora uma grande inspiração para qualquer jovem pesquisador. A lucidez de sempre ter a orientação em suas mãos e saber a hora certa de chamar a atenção é brilhante. O quanto a senhora “briga” literalmente pelas condições e estrutura do laboratório visando sempre a produção, o crescimento científico de cada um do grupo mostra o quanto ama e gosta de fazer pesquisa mesmo sem condições é de se admirar. A capacidade de diferenciar o lado pessoal do profissional é singular. O

poder de planejar e se organizar sempre a frente deixando sempre claro aos seus orientandos que o que fazemos hoje refletirá em nosso futuro, nos faz acreditar que vale a pena se entregar em buscar dos nossos objetivos. Sem palavras. Só tenho a agradecer;

À minha co-orientadora, Prof.<sup>(a)</sup> Dr<sup>a</sup>. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa, sinônimo de calma e tranquilidade. Quem lhe conhece logo entende a admiração que todos têm pela sua pessoa. Uma doçura e humildade sem tamanho junto com uma vontade de ajudar a todos mesmo sem condições a torna uma pesquisadora fenomenal e muito rara em nosso meio acadêmico. Mesmo distante sempre que pode se fez presente, procurando ajudar e contribuir de alguma forma para o trabalho. Gostaria de agradecer a oportunidade de tê-la na co-orientação pois seu vasto conhecimento na sua área de atuação é admirável e por isso agradeço pelas suas sempre excelentes contribuições. Meu muito obrigado por mais essa colaboração.

Agradeço muito a uma professora que considero como sendo a minha segunda co-orientadora. A Prof.<sup>(a)</sup> Dr<sup>a</sup>. Mariana Pinheiro Fernandes, pelo apoio, pelas críticas, pelas contribuições tanto na qualificação quanto nas reuniões específicas da tese. Sua sensibilidade com as pessoas e sua dedicação a seu trabalho também é de se admirar e com certeza, tê-la por perto quando, as meninas deixam claro, é um privilégio e por isso vai o meu muito obrigado.

Aos professores da banca de qualificação (Aline Isabel, João Henrique e Mariana Pinheiro). As contribuições de vocês foram muito importantes e nos ajudou bastante na melhoria da tese, principalmente na parte da escrita, além de incluir novos experimentos que serviram para melhor compreender nossa problemática. Logo, fizeram parte diretamente da construção e melhoramento dessa tese. Muito obrigado.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica Geral, Aline Isabel, Anderson Pedroza, Aiany Simões, Cristiane Freitas, Diorginis Ferreira, Gizele Santiago, Luciana Caroline, Maísa Menezes, Rudá Feitosa, Reginaldo Correia, Severina Cássia, Shirley Souza, Talitta Ricarly e Tercya Araujo por deixaram mais leve e atraente os

nossos dias e o ambiente de trabalho, por dividir as preocupações e cobranças assim como suportar juntos os “pequenos momentos” de pressão! A angústia na espera dos pagamentos das bolsas. Vocês que sempre trabalharam de maneira, alegre, harmônica, descontraída, mas para além de tudo com muita responsabilidade e dedicação. Quantos momentos ficarão registrados em nossas memórias? O quanto aprendemos uns com os outros? Esses momentos não têm preço! Levarei comigo características de cada um de vocês e tenho certeza que a recíproca será verdadeira. Gostaria de agradecer por toda colaboração sendo direta ou indiretamente no desenvolvimento da minha tese, pois não tenho nenhuma dúvida que nela contempla um pedaço de cada um de vocês. Gostaria de fazer um agradecimento especial a Diorginis Ferreira meu parceiro, pelo acolhimento no laboratório, as colaborações nos experimentos e nas discussões dos artigos, protocolos e trabalhos em nossa área, pela convivência a cada dia, pelas críticas e elogios que foram cruciais. Você é mais um irmão que levarei para a vida. A você e a todos o meu muito obrigado.

Aos amigos dos outros laboratórios que direta ou indiretamente convivi nesses anos e que com certeza me tornaram uma pessoa melhor. Sem a ajuda de vocês para entrar nos laboratórios, conseguir ração, reagentes e animais de última hora seria mais complicado concluir a tese. Tantos os meus amigos do laboratório da Prof.<sup>(a)</sup> Belmira em nome de Alinny Rosendo, Emerson Alexandre, Gisele Machado e Ricielle Lopes que mesmo distante sempre fizeram presentes. Quanto do laboratório do Prof. João Henrique em nome de Débora Alves, Monique Barros, Sávio Barbosa e Viviane Oliveira que também me ajudaram de alguma forma. Considero vocês muito importante para essa conquista e por isso o meu muito obrigado.

Aos amigos de graduação que levarei para vida, Emília Duarte, Débora Cintia, Bruno Luna, Cristian Alves, Diógenes Moura, Elton Regis, Georgina Matias, Igor Ferraz, Layane Gabrielly e Rodolfo Duarte. Agradeço pelo apoio e pelas palavras de incentivo cada vez que nos encontrávamos. Vocês que por muito tempo foram minha família. Da graduação ficam poucas pessoas e vocês com certeza estão entre elas. Vocês foram ótimos. Agradeço de coração.

Por último e não menos importante, gostaria de dizer que há amigos que levaremos para vida toda por se tornarem irmãos nessa caminhada, como José Luiz e Neto Pacífico. A chama dos nossos sonhos ainda está acesa e cada vez mais forte. Cada momento com vocês aprendi que precisamos abdicar muitas vezes até dos momentos de lazer e com a família para poder obter crescimento e realizar nossos sonhos. Juntos aprendemos que fazer pesquisa no nosso país é bem complicado, mas não impossível. Isso sempre nos fez refletir sobre nosso futuro. Teve momentos que ficamos distantes, mas isso em nenhum momento modificou a nossa amizade. Queria dizer que vocês são para mim fontes de inspiração tanto quanto pessoa quanto profissional. Em cada página e frases dessa tese tem uma parte de cada um de vocês, pois atrás dessa existe uma história de 10 anos de amizade verdadeira, leal, crítica e transparente! Só tenho a agradecer por ter conhecido vocês! Não interessa o que venha adiante, usamos o passado, modificamos o presente e transformamos o futuro e por isso, fizemos história e seremos sempre lembrados. Meu muito obrigado irmãos!

Aos amigos da pós-graduação em especial a Tássia e Camila. Valeu cada momento juntos nessa jornada científica. Mesmo desenvolvendo pesquisas em ambientes diferentes desde o mestrado nunca deixamos de nos falar e dividir as angustias de fazer pesquisa no país com dificuldades em desenvolver nossos trabalhos. Tenho certeza que onde estiverem farão a diferença. Desejo sucesso a vocês. Obrigado.

Aos parentes e amigos que sempre torceram por essa conquista em minha vida.

Meu

muito obrigado!

Aos meus queridos alunos, os quais me mostraram que não faz sentido obter conhecimento sem compartilhá-lo, que podemos libertar pessoas através do conhecimento, podendo com isso dar a oportunidade de obter uma vida melhor; tendo a certeza que aprendi mais do que ensinei. Vocês me mostraram que não adianta nada crescermos academicamente e não humanamente, ganhar em

intelecto e perder em sensibilidade; dando-me a certeza que quando fazemos o que gostamos com dedicação sempre seremos lembrados e teremos sucesso. A vocês o meu muito obrigado.

A todos que fazem parte do programa de pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento.

Obrigado por tudo!

“O que sabemos é uma gota; O que ignoramos é um oceano. Mas o que seria o oceano se não infinitas gotas ?”

“Não sei como o mundo me vê, mas eu me sinto como um garoto brincando na praia, contente em achar aqui e ali, uma pedra mais lisa ou uma concha mais bonita, mas tendo sempre diante de mim, ainda por descobrir, o grande oceano de verdades”

“Se vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”

**Isaac Newton**

## RESUMO

Insultos nutricionais na gestação e lactação estão associados a algumas doenças na vida adulta como hipertensão arterial. Um possível mecanismo é a disfunção mitocondrial, o desequilíbrio no sistema antioxidante e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Entretanto, pouco se sabe se a restrição proteica atinge de forma igual ambos os gêneros por apenas uma geração. O objetivo do nosso trabalho foi testar a hipótese de que a restrição proteica durante a gestação e lactação está associada à disfunção mitocondrial e desequilíbrio oxidativo no tronco encefálico de ratos machos e fêmeas juvenis por mais de uma geração. Utilizamos ratas *Wistar* divididas de acordo com a dieta: Grupo Normoproteico (NP, 17% de proteína), Grupo Hipoproteico (HP, 8% de proteína) na primeira geração (F1), grupo NP e HP que foram reexpostos às respectivas dietas na segunda geração (F2) e os grupos NP e HP não reexpostos as dietas em F2. Após desmame, todos os grupos receberam dieta comercial de biotério (Labina) e o sacrifício foi realizado aos 30 dias de vida (F1 e F2). Avaliamos o consumo de oxigênio, controle respiratório (CR) e a produção de EROs pelas mitocôndrias. Como indicadores de estresse oxidativo, avaliamos a oxidação proteica e a peroxidação lipídica (níveis de malondialdeído-MDA). No sistema antioxidante enzimático avaliamos a atividade: Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione-S-Transferase (GST). No sistema antioxidante não enzimático avaliamos os níveis de Glutathione Reduzida (GSH), Glutathione Oxidada (GSSG) e o estado redox (ER) (GSH/GSSG). Quando comparado os grupos NP e HP nas fêmeas, encontramos diminuição no consumo de oxigênio em F2. Em F2 – Labina foi encontrado aumento no consumo de oxigênio. A produção de EROs aumentou apenas em F2, no entanto apresentou uma diminuição nos níveis de oxidação proteica no grupo experimental. Os níveis de MDA aumentaram em F1 e F2 e diminuiu o nível de oxidação de proteína em F2 – Labina. A atividade da SOD diminuiu em F2 – Labina. A atividade da GST aumentou em F1 e em F2. Os níveis de GSSG aumentaram em F1 e F2 e diminuíram em F2 – Labina. O ER reduziu em F1 e aumentou em F2 – Labina. Em contrapartida, os machos apresentam aumento no consumo de oxigênio pelas mitocôndrias e diminuição em F1 e F2 quando comparado com o grupo HP. A produção de EROs estava aumentada em F1 e em F2. Os níveis de MDA e oxidação de proteína

aumentaram em F1. A catalase e GST diminuíram. Em F2, a atividade da catalase diminuiu. Os níveis de GSH aumentaram apenas em F2 – Labina e os de níveis de GSSG aumentaram em F1 e F2, mas diminuiu em F2 – Labina. No ER encontramos redução em F1 e aumento em F2 – Labina. Logo, observa-se que esse modelo dietético é capaz de alterar a função mitocondrial e o sistema antioxidante em ambos os gêneros por mais de uma geração. Contudo, observa-se que os efeitos da desnutrição afeta de forma diferente os gêneros, o que sugere uma neuroproteção das fêmeas, possivelmente devido aos níveis de estradiol.

**Palavras – Chave:** Desnutrição. Estresse oxidativo. Sexo.

## ABSTRACT

Nutritional insults in gestation and lactation are associated with some diseases in adult life such as high blood pressure. One possible mechanism is mitochondrial dysfunction, imbalance in the antioxidant system and the production of reactive oxygen species (ROS). However, little is known if the protein restriction equally affects both genders for only one generation. The objective of our study was to test the hypothesis that protein restriction during pregnancy and lactation is associated with mitochondrial dysfunction and oxidative imbalance in the brainstem of male and female rats for more than one generation. Used Wistar rats divided according to the diet: Normo protein group (NP, 17% protein), low protein group (LP, 8% protein) in the first generation (F1), NP and HP groups that were reexposed to the respective diets in the second (F2) and the NP and LP groups did not reexposed the diets at F2. After weaning, all groups received commercial diets (Labina) and sacrificed at 30 days of age (F1 and F2). Evaluated oxygen consumption, control respiratory (CR) and ROS production by mitochondria. As indicators of oxidative stress, evaluated protein oxidation and lipid peroxidation (levels of malondialdehyde-MDA). In the enzymatic antioxidant system evaluated the activity: Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione-S-Transferase (GST). In the non-enzymatic antioxidant system we evaluated the levels of Reduced Glutathione (GSH), Oxidized Glutathione (GSSG) and state redox (ER) ( $GSH / GSSG$ ). When comparing the NP and HP groups in females, we found a decrease in oxygen consumption in F2. In F2 - Labina was found an increase in oxygen consumption. The production of ROS increased only in F2, however showed a decrease in protein oxidation levels in the experimental group. MDA levels increased in F1 and F2 and decreased the level of protein oxidation in F2 - Labina. SOD activity decreased in F2 - Labina. GST activity increased in F1 and F2. GSSG levels increased in F1 and F2 and decreased in F2 - Labina. ER reduced in F1 and increased in F2 - Labina. On the other hand, males present an increase in oxygen consumption by mitochondria and a decrease in F1 and F2 when compared to the HP group. Production of ROS was increased in F1 and F2. The levels of MDA and protein oxidation increased in F1. Catalase and GST decreased. In F2, catalase activity decreased. GSH levels increased only in F2 - Labina and those in GSSG levels increased in F1 and F2, but decreased in F2 -

Labina. In the ER we found reduction in F1 and increase in F2 - Labina. Therefore, it is observed that this dietary model is able to alter the mitochondrial function and the antioxidant system in both genders for more than one generation. However, it is observed that the effects of malnutrition differently affect the gender, suggesting a neuroprotection of the females, possibly due to estradiol levels.

**Keyword:** Undernutrition. Oxidative stress. sex.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Vulnerabilidade do cérebro ao Estresse Oxidativo. .... | 26 |
|-------------------------------------------------------------------------|----|

### CAPÍTULO I (ARTIGO 1).

*No tronco encefálico de ratos fêmeas aos 30 dias de idade em F1, F2 e F2 - Labina.*

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Consumo de oxigênio pelas mitocôndrias.....                                      | 65 |
| <b>Figura 2.</b> Produção de EROs.....                                                            | 66 |
| <b>Figura 3.</b> Peroxidação lipídica e Oxidação de proteínas.....                                | 67 |
| <b>Figura 4.</b> Sistema antioxidante enzimático (Atividade da SOD, CAT e GST).....               | 68 |
| <b>Figura 5.</b> Sistema antioxidante não – enzimático (níveis de GSH e GSSG) e estado redox..... | 69 |

### CAPÍTULO II (ARTIGO 2).

*No tronco encefálico de ratos machos aos 30 dias de idade em F1, F2 e F2 - Labina.*

|                                                                                                   |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 1.</b> Consumo de oxigênio pelas mitocôndrias.....                                      | 97  |
| <b>Figura 2.</b> Produção de EROs.....                                                            | 98  |
| <b>Figura 3.</b> Peroxidação lipídica e Oxidação de proteínas.....                                | 99  |
| <b>Figura 4.</b> Sistema antioxidante enzimático (Atividade da SOD, CAT e GST).....               | 100 |
| <b>Figura 5.</b> Sistema antioxidante não – enzimático (níveis de GSH e GSSG) e estado redox..... | 101 |

### CAPÍTULO III (Resultados Complementares).

*Níveis de Estradiol em ratas em F1*

|                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 1.</b> Níveis de Estradiol em soro de ratas aos 20, 30 e 120 dias de idade em F1 submetidas ou não à restrição proteica perinatal..... | 104 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1.** Principais estudos que correlacionaram restrição proteica e efeitos intergeracionais.....38

**TABELA 2.** Composição da dieta experimental utilizada no período perinatal (Normoproteica e Hipoproteica). Quantidade para 1 Kg de dieta. Descrito por Reeves, 1993.....42

**TABELA 3.** Composição da dieta LABINA (Purina – Presence) utilizada após o desmame.....42

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

|               |                                            |
|---------------|--------------------------------------------|
| <b>ADP</b>    | Adenosina Difosfato                        |
| <b>CAT</b>    | Catalase                                   |
| <b>CCCP</b>   | Carbonil Cianeto 3 – Cloro fenil hidrazina |
| <b>CDNB</b>   | Cloro Dinitrobenzeno                       |
| <b>DCF–DA</b> | Diclorofluorescina Diacetato               |
| <b>DNPH</b>   | Dinitrofenilhidrazina                      |
| <b>DTNB</b>   | Ácido Ditionitrobenzóico                   |
| <b>EDTA</b>   | Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético        |
| <b>ERNs</b>   | Espécies Reativas de Nitrogênio            |
| <b>EROs</b>   | Espécies Reativas de Oxigênio              |
| <b>GDNF</b>   | Fator Neurotrófico Derivado da Glia        |
| <b>GFAP</b>   | Proteína Glial Fibrilar Ácida              |
| <b>GS</b>     | Glutamina Sintetase                        |
| <b>GSH</b>    | Glutathiona Reduzida                       |
| <b>GSSG</b>   | Glutathiona Oxidada                        |
| <b>GST</b>    | Glutathiona-S-Transferase                  |
| <b>HP</b>     | Hipoproteico                               |
| <b>MDA</b>    | Malondialdeído                             |
| <b>NP</b>     | Normoproteico                              |
| <b>NTS</b>    | Núcleo do Trato Solitário                  |
| <b>OVX</b>    | Ovarioectomia                              |

|                 |                                            |
|-----------------|--------------------------------------------|
| <b>OPT</b>      | Ortoftaldeído                              |
| <b>PVN</b>      | Núcleo Paraventricular                     |
| <b>RVLM</b>     | Região Ventrolateral da Medula             |
| <b>SNC</b>      | Sistema Nervoso Central                    |
| <b>SOD</b>      | Superóxido Dismutase                       |
| <b>TBARS</b>    | Substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico |
| <b>TCA</b>      | Ácido Tricloroacético                      |
| <b>6 – OHDA</b> | 6-Hidroxidopamina                          |

## SUMÁRIO

|       |                                                                                                                     |     |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1     | Apresentação                                                                                                        | 20  |
| 2     | INTRODUÇÃO                                                                                                          | 22  |
| 2.1   | <i>Nutrição e Desenvolvimento do Sistema Nervoso</i>                                                                | 22  |
| 2.2   | <i>Ambiente perinatal, Restrição Proteica Materna e alterações bioquímicas e fisiológicas em diferentes tecidos</i> | 22  |
| 2.3   | <i>Estresse oxidativo, Restrição Proteica e Doenças Cardiovasculares</i>                                            | 24  |
| 2.4   | <i>Estresse oxidativo, Restrição Proteica e Doenças Neurológicas</i>                                                | 25  |
| 2.5   | <i>Estrógenos e Sistema Nervoso Central</i>                                                                         | 29  |
| 2.6   | <i>Estresse Oxidativo e Diferença de Gênero</i>                                                                     | 32  |
| 2.7   | <i>Efeitos intergeracionais e Insultos Nutricionais</i>                                                             | 34  |
| 2.8   | <i>Tipos de estudos e de insultos sobre Efeitos Intergeracional</i>                                                 | 35  |
| 3     | HIPÓTESE                                                                                                            | 40  |
| 4     | OBJETIVOS                                                                                                           | 40  |
| 4.1   | <i>Objetivo Geral</i>                                                                                               | 40  |
| 4.2   | <i>Objetivos Específicos</i>                                                                                        | 40  |
| 5     | materiais e métodos                                                                                                 | 41  |
| 5.1   | <i>Animais e Dieta</i>                                                                                              | 41  |
| 5.2   | <i>Processamento do material biológico para análise bioquímica</i>                                                  | 43  |
| 5.3   | <i>Processamento do material biológico para análises mitocondriais</i>                                              | 43  |
| 5.4   | <i>Dosagem de Proteína</i>                                                                                          | 43  |
| 5.5   | <i>Isolamento das mitocôndrias</i>                                                                                  | 43  |
| 5.6   | <i>Medida da capacidade respiratória mitocondrial.</i>                                                              | 44  |
| 5.7   | <i>Avaliação da produção de espécies reativas</i>                                                                   | 44  |
| 5.8   | <i>Quantificação de peroxidação lipídica</i>                                                                        | 44  |
| 5.9   | <i>Níveis de oxidação de proteína</i>                                                                               | 45  |
| 5.10  | <i>Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)</i>                                                                      | 45  |
| 5.11  | <i>Atividade da Catalase (CAT)</i>                                                                                  | 45  |
| 5.12  | <i>Atividade da Glutathione S transferase (GST)</i>                                                                 | 45  |
| 5.13  | <i>Níveis da Glutathione Reduzida (GSH)</i>                                                                         | 46  |
| 5.14  | <i>Níveis da Glutathione Oxidada (GSSG)</i>                                                                         | 46  |
| 5.15  | <i>Níveis de Estradiol</i>                                                                                          | 46  |
| 5.16  | <i>Análise Estatística</i>                                                                                          | 47  |
| 6     | <b>Resultados</b>                                                                                                   | 47  |
| 6.1   | <i>Maternal low-protein diet effect in female brainstem can be observed through generation?</i>                     | 47  |
| 6.2   | <b>UNDERNUTRITION AFFECTS BRAINSTEM'S MITOCHONDRIA THROUGH GENERATION?</b>                                          | 79  |
| 6.3   | <b>Resultado Complementar</b>                                                                                       | 104 |
| 6.3.1 | <b>NÍVEIS DE ESTRADIOL</b>                                                                                          | 104 |
| 7     | CONCLUSÕES                                                                                                          | 105 |
| 7.1   | <b>PERSPECTIVAS</b>                                                                                                 | 106 |
|       | REFERÊNCIAS                                                                                                         | 107 |
|       | APÊNDICE A – RESUMO GRÁFICO DA TESE                                                                                 | 126 |
|       | ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA                                                                                | 127 |

## 1 APRESENTAÇÃO

Evidências mostram que o período perinatal é muito importante para o desenvolvimento do corpo e do sistema nervoso. A ausência ou deficiência de nutrientes nesse período pode estar associada a várias doenças metabólicas como obesidade, diabetes, síndrome metabólica e hipertensão arterial na vida adulta. Atualmente a hipertensão é o fator de risco mais comum associado a doenças cardiovasculares e por isso compreender a relação entre nutrição e aumento da pressão arterial é crucial para elucidar com mais clareza os mecanismos etiológicos dessa patologia.

Estudos experimentais vêm demonstrando que vários fatores estão associados à etiologia da pressão arterial aumentada, tais como aumento da atividade simpática, disfunção renal e fatores hormonais. Além desses fatores, estudos vêm mostrando que disfunção no sistema antioxidante enzimático e não enzimático associado com o aumento na produção e liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs/ERNs) podem também estar relacionados à gênese do aumento da pressão arterial. Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa mostraram que animais submetidos à desnutrição proteica no período perinatal apresenta aumento no estresse oxidativo em corações e tronco encefálico e que esse desequilíbrio oxidativo reflete em aumento da pressão arterial na vida adulta. Entretanto, pouco se sabe se uma má nutrição em proteína durante a gestação e lactação pode afetar diferentemente os gêneros (maior ou menor susceptibilidade à indução de estresse oxidativo em machos e fêmeas) e se os efeitos observados na primeira geração submetida ao insulto nutricional podem ser transferidos para gerações posteriores (p.ex. segunda geração).

Logo, para melhor compreender o estudo, esta tese foi organizada na seguinte sequência: **Introdução** (Fundamentação Teórica); **Objetivos**; **Resultados** (Artigos Científicos); **Conclusões**; **Perspectivas e Referências Bibliográficas**.

A **Introdução** mostra a fundamentação teórica, que nos levou a formular a proposta científica que conduziu esse trabalho de pesquisa. **Objetivos** mostra as análises que realizamos para obter subsídios para responder nossa problemática.

**Artigos Científicos** os quais foram construídos a partir dos resultados obtidos e nos permitiu sugerir que nossa hipótese esta em acordo com que foi proposto. Os resultados foram obtidos no Laboratório de Bioquímica Geral, Molecular e do Exercício da Universidade Federal de Pernambuco no Centro Acadêmico de Vitória (UFPE-CAV). A seção **Conclusões** aborda de forma geral o que concluímos a partir dos resultados obtidos nesta tese. A seção **Perspectivas** discute as possibilidades de novos projetos a partir dos resultados obtidos durante a realização desta pesquisa, propondo elucidar ainda mais os mecanismos envolvidos nas doenças induzidas pela restrição proteica materna durante o período de desenvolvimento embrionário. A seção **Referências Bibliográficas** lista as referências citadas na Introdução, nos Materiais e Métodos e na Discussão da tese.

Esta tese deu origem a 2 artigos originais. O 1º artigo foi intitulado *“Effect of maternal low-protein diet in female brainstem can be observed after generations?”*, o qual será submetido a **Nutrition Neuroscience** (Qualis B1 em Medicina II). Nesse artigo objetivamos investigar os efeitos induzidos pela restrição proteica materna perinatal na função mitocondrial e no balanço oxidativo no tronco encefálico das fêmeas por mais de uma geração.

O 2º artigo foi intitulado *“Undernutrition affects brainstem’s mitochondrial through generation?”* o qual será submetido a **Nutritional Research** (Qualis B1 em Medicina II) e teve como objetivo avaliar o efeito transgeracional em ratos machos induzido pela restrição proteica materna perinatal na função mitocondrial e no estresse oxidativo do tronco encefálico.

## 2 INTRODUÇÃO

### 2.1 *Nutrição e Desenvolvimento do Sistema Nervoso*

O cérebro necessita de uma nutrição adequada para poder ter um bom desenvolvimento, já que nos períodos iniciais da vida (gestação, lactação e primeira infância), o fator nutricional é crucial para sua formação, maturação e desenvolvimento dos componentes e funções do Sistema Nervoso Central (SNC) (PRADO E DEWEY, 2014; NURLIYANA *et al.*, 2016). A nutrição é apontada como o fator não genético mais importante para o desenvolvimento do cérebro e é de fundamental importância na proliferação neuronal (neurônios), proliferação não neurais (astrócitos, oligodentrócitos e micróglia), formação das sinapses (sinaptogênese), crescimento dos axônios (axiogênese) e desenvolvimento da bainha de mielina (mielinização) que ocorrem no período da gestação e lactação. Em adição a esses efeitos a nutrição adequada desempenha um papel fundamental no controle das funções do SNC tais como cognição, comportamento e atividade motora (MORGANE *et al.*, 1993; JOHNSON, 2001; PRADO E DEWEY, 2014).

### 2.2 *Ambiente perinatal, Restrição Proteica Materna e alterações bioquímicas e fisiológicas em diferentes tecidos*

O ambiente intrauterino e pós-natal estão associados ao período mais importante do desenvolvimento do organismo, justamente devido a alta taxa de proliferação e multiplicação celular com uma organogênese altamente acentuada, o que torna esse período extremamente delicado. Estudos sugerem que estresse ambiental nesses períodos pode vir a causar alterações bioquímicas e fisiológicas que em período mais tardios da vida aumentaria a propensão ao desenvolvimento/aparecimento de doenças (LUCAS, 1991). Esse insulto provindo do ambiente pode ser responsável pelo aparecimento tardio de algumas doenças metabólicas como obesidade, diabetes e hipertensão que pode aparecer anos após o insulto estressor, sendo essa hipótese conhecida como Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença ou “*Developmental Origin of Heath and Disease – DOHaD*” (BARKER, 2004; 2005). Um dos principais insultos ambientais associados ao desenvolvimento de doenças é o insulto nutricional que quando presente no período crítico do desenvolvimento está correlacionado a mau

desenvolvimento e formação de vários tecidos, incluindo o cérebro (MORGANE *et al.*, 2002). Um dos maiores marcadores de má nutrição fetal é o baixo peso ao nascer, o qual Winchester e colaboradores (2016), estudando 180 crianças prematuras mostraram uma associação da prematuridade com elevados níveis de cortisol salivar e conseqüentemente uma disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) corroborando com a hipótese do *DOHaD* (WINCHESTER, SULLIVAN *et al.*, 2016). De forma semelhante, Chong e colaboradores, (2012), mostraram que alterações no ambiente intrauterino resultando em baixo peso ao nascer estavam associadas a disfunções cardiovasculares como doença renal e hipertensão arterial em adolescentes que ao nascer pesavam < 2.500 g (CHONG E YOSYPYV, 2012).

Já é bem estabelecido na literatura tanto em humanos quanto em modelos experimentais que uma ingestão nutricional inadequada no período perinatal pode levar as modificações bioquímicas e fisiológicas na vida adulta como: mudança no metabolismo lipídico (HOFFMAN *et al.*, 2000; FRISANCHO, 2003), regulação epigenética (BURDGE, HANSON, *et al.*, 2007), mudança no sistema antioxidante (BONATTO *et al.*, 2006; FEOLI, SIQUEIRA, ALMEIDA, TRAMONTINA, BATTU, *et al.*, 2006; FEOLI, SIQUEIRA, ALMEIDA, TRAMONTINA, VANZELLA, *et al.*, 2006), doenças metabólicas (LAKSHMY, 2013), massa corporal (SINGHAL *et al.*, 2003), desenvolvimento de obesidade abdominal (RAVELLI *et al.*, 1999), mudança no número de glomérulos (PIRES *et al.*, 2006; KAWAMURA *et al.*, 2007; VILLAR-MARTINI *et al.*, 2009), entre outros efeitos.

Além desses efeitos, a nutrição tem um papel crucial na maturação e desenvolvimento do sistema nervoso central. Insultos nutricionais no período crítico do desenvolvimento estão associados a efeitos deletérios no cérebro (MORGANE, MOKLER *et al.*, 2002). Entre os insultos nutricionais no período embrionário, a restrição proteica pode induzir alteração no sistema antioxidante e no estado oxidativo cerebral (BONATTO, POLYDORO *et al.*, 2006; FEOLI, A. M., SIQUEIRA, I. R. *et al.*, 2006), diminuição dos níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), com prejuízo no aprendizado e na memória comportamental (VALADARES E DE SOUSA ALMEIDA, 2005; WANG, L. E XU, 2007) e déficit de atenção (MCGAUGHY *et al.*, 2014), bem como alteração nas atividades eletrofisiológicas de células do hipocampo (RUSHMORE *et al.*, 1998). Além disso, pode alterar a resposta ao medo e a ansiedade (HERNANDES E ALMEIDA, 2003), pode reduzir a ação da serotonina na ingestão

alimentar (LOPES DE SOUZA *et al.*, 2008) e causar prejuízo na neurotransmissão serotoninérgica (HONORIO DE MELO MARTIMIANO *et al.*, 2016).

### 2.3 Estresse oxidativo, Restrição Proteica e Doenças Cardiovasculares

Podemos entender o estresse oxidativo como sendo o desequilíbrio entre o sistema pró-oxidante (aumento na produção de EROs/ERNs) e os mecanismos de defesa antioxidante (enzimático e não enzimático) em favor ao aumento nas concentrações dos agentes pro-oxidantes, os quais podem promover destruição de estruturas celulares, como lipídeos, proteínas e material genético como DNA e RNA (HALLIWELL, B., 2006). Embora essas espécies reativas sejam muito tóxicas, não são totalmente removidas no organismo, pois em concentrações fisiológicas atuam na regulação de inúmeras funções, tais como crescimento celular, transdução de sinal, diferenciação celular, ativação do sistema imunológico, neurogênese entre outras (HALLIWELL, G. A., 2006; BALZER *et al.*, 2015; HAMEED *et al.*, 2015; MANDA-HANDZLIK E DEMKOW, 2015). A ação das EROs/ERNs nas mitocôndrias podem estar associado a um aumento ainda maior da produção dessas espécies reativas em condições patológicas e consequentemente a oxidação das biomoléculas presentes nas mitocôndrias (lipídeos, proteína e material genético) sendo apontado como mecanismo de indução de varias doenças incluindo as doenças cardiovasculares (JOMOVA *et al.*, 2010; JIANG *et al.*, 2016).

Estudos prévios já mostraram que restrição proteica tanto no período pré-natal quanto no pós natal pode induzir aumento da pressão arterial média (OLIVEIRA *et al.*, 2004; DE BRITO ALVES *et al.*, 2014), como também aumento de frequência cardíaca e um ligeiro aumento na resposta pressórica e bradicárdica com ativação quimiorreflexa (PENITENTE *et al.*, 2007). Além de induzir disfunção mitocondrial e estresse oxidativo em coração de ratos aos 100 dias de vida (NASCIMENTO *et al.*, 2014). Corroborando com esses dados, De Brito Alves, (2014) além de encontrar várias alterações nos animais que sofreram restrição em parâmetros bioquímicos (□ albumina, □ proteínas totais, □ globulina, □ uréia e □ creatinina) bem como □ peso corporal e comprimento tanto em ratos machos aos 30 quanto aos 90 dias de vida, observaram também aumento de frequência respiratória basal e ventilação aos 30 dias e aumento da frequência respiratória e da pressão arterial aos 90 dias de vida (DE BRITO ALVES, NOGUEIRA *et al.*, 2014).

Está bem claro que esse modelo de insulto nutricional é capaz de alterar as funções cardiovasculares, contudo, pouco se conhece sobre os mecanismos bioquímicas e moleculares que explicam essas alterações. Barros e colaboradores, (2015) estudando ratos adultos cujas mães foram submetidas a uma dieta baixa em proteína (8% de proteína) durante a gestação e lactação, verificou aumento no tônus simpático cardiovascular nesses animais o que pode está associado ao aumento da pressão arterial na vida adulta desses animais (BARROS, DE BRITO ALVES *et al.*, 2015).

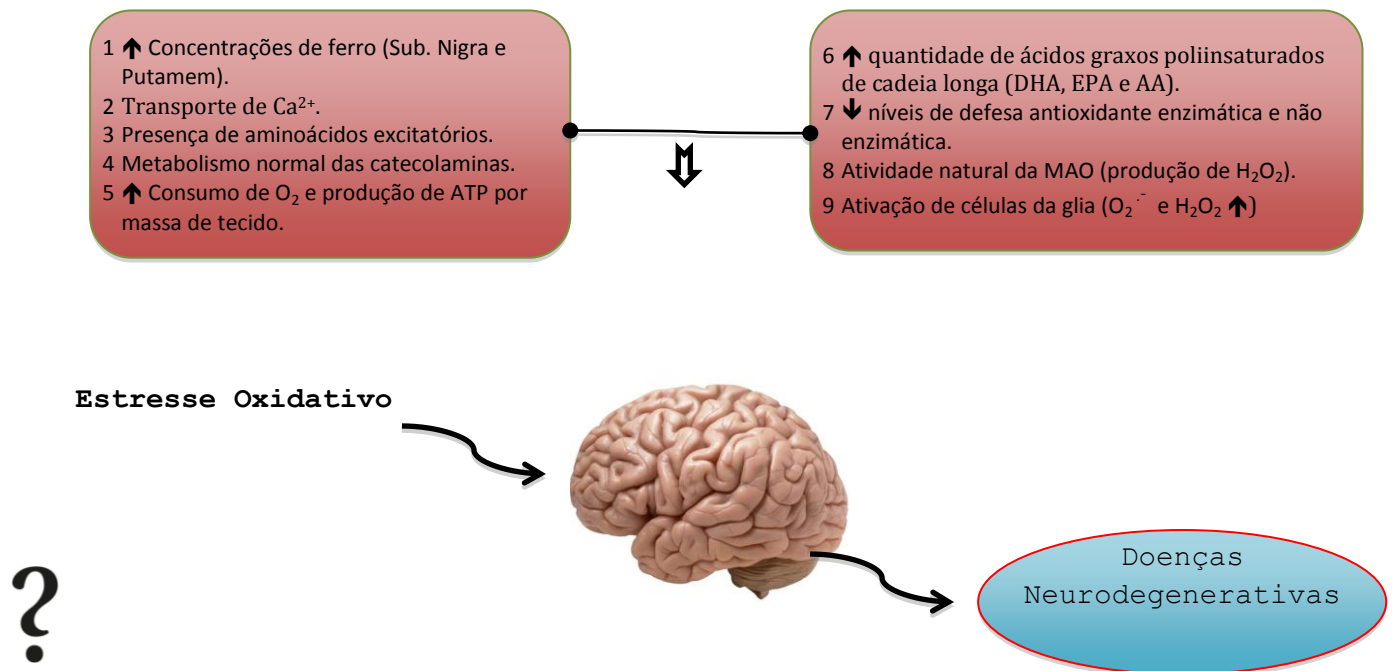
#### 2.4 Estresse oxidativo, Restrição Proteica e Doenças Neurológicas

Embora todos os tecidos do corpo estejam vulneráveis a sofrer lesão oxidativa, o sistema nervoso por vários motivos é extremamente sensível ao metabolismo oxidativo e consequentemente pelos efeitos maléficos que o estresse oxidativo pode causar nesse tecido (HALLIWELL, B., 2006; ISLAM, 2016).

Entre os fatores associados ao estresse oxidativo no tecido neural é fato que as células neurais são altamente dependentes do consumo de oxigênio, o qual é usado quase que exclusivamente para manter a atividade dos neurônios e isso significa que os mesmos dependem totalmente da eficiência mitocondrial para a sua sobrevivência (AMES, 2000; ERECINSKA *et al.*, 2004).

Todavia, elétrons podem vazar da cadeia transportadora de elétrons e produzir EROs que podem lesionar as biomoléculas inclusive da própria mitocôndria gerando uma maior produção de EROs e assim um ciclo oxidativo que caso não seja regulado pelo sistema antioxidante pode levar ao estresse oxidativo (HALLIWELL, B., 2006). Vários outros fatores estão associados à vulnerabilidade neural ao estresse oxidativo como: presença de aminoácidos excitotóxicos, níveis de cálcio, oxidação dos neurotransmissores, níveis de ferro, ácidos graxos de cadeias poliinsaturadas que são muito susceptíveis ao ataque de EROs/ERNs e consequentemente dano neural (SPENCER *et al.*, 1998; KUDIN *et al.*, 2005; WARD *et al.*, 2014; DI NUNZIO *et al.*, 2016) . Com isso o cérebro é extremamente sensível à lesão oxidativa e vários fatores estão correlacionados, como ilustrados na **figura 1** abaixo.

**Figura 1.** Fatores associados à vulnerabilidade cerebral ao estresse oxidativo. (Halliwell e Gutteridge, 1999. Adaptado).



Estudos tanto em humanos quanto em modelos experimentais mostram como um dos principais mecanismos moleculares associados a doenças neurodegenerativas o aumento de estresse oxidativo atrelado à disfunção mitocondrial (RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 2013; OKAZAWA *et al.*, 2014), causando a injúria cerebral (HIEBERT *et al.*, 2015; KILBAUGH *et al.*, 2015), epilepsia (PEARSON *et al.*, 2015; FOLBERGROVA *et al.*, 2016), Alzheimer (FRIEDLAND-LEUNER *et al.*, 2014; SWOMLEY E BUTTERFIELD, 2015), Esquizofrenia (FAIZI *et al.*, 2014; RAJASEKARAN *et al.*, 2015), Esclerose lateral amiotrófica devido deficiência gênica na Superóxido Dismutase 1 (SOD1) (CARRI *et al.*, 2015; PALOMO E MANFREDI, 2015).

Nesse contexto vários estudos vêm mostrando que além de ser os possíveis mecanismos indutores de doenças neurodegenerativas, a disfunção mitocondrial associadas a níveis aumentados de EROs/ERNs, e o estresse oxidativo podem explicar a patogênese da hipertensão com origem no SNC, já que inervações de entrada e saída nessa região parece ser modulada pelos níveis dessas espécies reativas e o estresse oxidativo gerado nesse tecido (KISHI *et al.*, 2004; ZIMMERMAN *et al.*, 2004; KIMURA *et al.*, 2005; PETERSON *et al.*, 2006; HIROOKA, 2008; CHAN E CHAN, 2012; 2013b).

Está cada vez mais evidente que a etiologia da hipertensão arterial a nível central apresenta um aumento da produção de EROs e ERNs (CHAN *et al.*, 2005; CHAN E CHAN, 2013b). Chan *et al.*, (2005) demonstraram que o aumento de espécies reativas de oxigênio induzido por disfunção mitocondrial ou por aumento da atividade da NADPH oxidase, em conjunto com a diminuição da ação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no bulbo contribuía com o estresse oxidativo crônico nessa região, levando a um aumento do tônus vasomotor simpático e a hipertensão. Em outro estudo, Chan e Chan (2013a) relatam que elevados níveis de angiotensina II no cérebro aumenta as concentrações dos ânions superóxido no bulbo e este aumento de ânion superóxido está associado ao aumento da pressão arterial induzida por angiotensina II, a qual também apresenta uma hiperativação do sistema nervoso simpático.

Além do tronco encefálico, outros núcleos e regiões também estão associados ao controle de pressão arterial a nível central (núcleos hipotalâmicos), logo, um desequilíbrio no sistema antioxidante nesses núcleos pode desregular os níveis pressóricos. Corroborando com essa afirmação, Yuan e colaboradores, (2013) estudando ratos machos adultos espontaneamente hipertensos verificaram que quando foram submetidos a um tratamento através da transfecção do gene da SOD1 no núcleo paraventricular desses animais, observou-se 4 semanas após a transfecção, uma diminuição significativa da pressão arterial, atividade simpática e níveis de angiotensina II (YUAN, ZHANG *et al.*, 2013).

Cardoso e colaboradores, (2006) investigando em ratos adultos não anestesiados os mecanismos associados ao estresse oxidativo mediado pela injeção de  $H_2O_2$  no IV ventrículo, observaram que o nível aumentado de  $H_2O_2$  é capaz de ativar os sistemas simpático e parassimpático por mecanismos diferentes. Associado a essa observação, verificaram também que o tratamento com um antioxidante (N-Acetil-Cisteína) (NAC) diminuiu a resposta pressórica nesses animais (MAXIMO CARDOSO, DE ALMEIDA COLOMBARI *et al.*, 2006). Não apenas o tratamento com a NAC regula a pressão arterial a nível central, pois estudando porcos tratados com nitrato orgânico, Zanzinger e Czachurski, verificaram diminuição da pressão arterial, da frequência cardíaca e da atividade do tônus simpático (ZANZINGER E CZACHURSKI, 2000).

No modelo de restrição proteica materna perinatal, em estudos separados, pesquisadores mostraram o aumento do tônus simpático em ratos machos juvenis e aumento da pressão arterial em ratos adultos, o que está associado a um aumento da produção de espécies reativas e alteração na função mitocondrial, além de indução de estresse oxidativo (DE BRITO ALVES, NOGUEIRA *et al.*, 2014; BARROS, DE BRITO ALVES *et al.*, 2015; FERREIRA, D. J. *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo e o desequilíbrio no sistema antioxidante no cérebro, já estão bem evidenciados em ratos onde as mães sofreram uma restrição proteica no período crítico do desenvolvimento. Feoli e colaboradores (2006) verificaram em animais aos 60 dias de vida, aumento de peroxidação lipídica em cerebelo e córtex, assim como diminuição da atividade da catalase nesses animais (FEOLI, A. M., SIQUEIRA, I. R. *et al.*, 2006). Em um estudo adicional, esse grupo de autores sugere que esse efeito da restrição proteica possa ser explicado pelos níveis diminuídos de glutathione e captação de aminoácido excitatório como o glutamato no córtex e no hipocampo (FEOLI, A. M., SIQUEIRA, I. *et al.*, 2006), o que estaria associado a um aumento da reatividade glial ao nascer no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo indicando uma astrogliose (FEOLI *et al.*, 2008). Logo, a restrição proteica materna nos filhotes no ambiente pós-natal é capaz de alterar tanto o estado redox no hipocampo (BONATTO *et al.*, 2005) quanto marcadores oxidativos no córtex e cerebelo (BONATTO, POLYDORO *et al.*, 2006).

Além dos mecanismos periféricos que controlam as funções cardíacas, Esler (2010a) mostra que pelo menos 50% das causas da hipertensão arterial é a nível central e não periférico, ou seja, a hipertensão neurogênica acomete quase metade dos hipertensos, o que torna ainda mais importante compreender a via central de controle da pressão arterial (ESLER, 2010a). Isso se explica devido à existência de vários núcleos específicos na região do tronco encefálico que são responsáveis pelo controle da atividade circulatória, ou seja, aferências neurais oriundas do sistema nervoso autônomo especificamente o sistema nervoso simpático sobre áreas que apresentam um papel crucial no controle das atividades cardiovasculares (frequência cardíaca e pressão arterial) como o Núcleo do Trato Solitário (NTS), Núcleo Retrotrapezóide e Região Vento Lateral da Medula (RVLM) e esses núcleos fazem da região do tronco encefálico uma rota chave no controle da pressão arterial

e das funções cardiorrespiratórias (GUYENET, 2006; GUYENET, BAYLISS, *et al.*, 2008; SPYER E GOURINE, 2009; MARINA *et al.*, 2015).

Ferreira e colaboradores, estudando o tronco encefálico de machos adultos onde as mães foram submetidas à dieta pobre em proteína (8% de proteína) durante a gestação e lactação mostraram que nessa região do SNC os animais desnutridos apresentaram aumento de peroxidação lipídica, redução na atividade enzimática da SOD, CAT, GPx, GST, GR e Glicose -6-fosfato Desidrogenase (G6PDH), GSH, GSSG e consequentemente diminuição no estado redox (GSH/GSSG) (Ferreira *et al.* 2015). Estudos adicionais desse mesmo grupo de autores mostraram que a desnutrição proteica perinatal induzia diminuição do quociente respiratório, potencial elétrico de membrana mitocondrial e o aumento da produção de EROS/ERNs; esses autores sugerem que a disfunção mitocondrial em conjunto com o desequilíbrio oxidativo pode ser o mecanismo propulsor para o aparecimento de doenças induzidas pela restrição proteica perinatal (FERREIRA, D. S. *et al.*, 2015; FERREIRA, D. J., DA SILVA PEDROZA *et al.*, 2016). Contudo, pouco se conhece se esses efeitos oxidativos podem ser alterados em mais de uma geração e se acomete de forma igual machos e fêmeas.

## 2.5 Estrógenos e Sistema Nervoso Central

Durante o período reprodutivo, as fêmeas produzem hormônios importantes para o desenvolvimento das características sexuais secundárias e reprodutivas. Entre os hormônios femininos, atualmente, um número crescente de artigos vem destacando a importância dos estrogênios em inúmeras ações protetoras. A terminologia estrogênio é dada para um grupo de hormônios esteroidais, importantes no controle do ciclo reprodutivo. Os três principais estrogênios são estrona (E1), 17- $\beta$ -estradiol (E2) e o estriol (E3), que se diferenciam entre si de acordo com o número de grupamento hidroxila ou cetona (RYAN, 1982). O 17- $\beta$ -estradiol é o estrogênio predominante durante os anos reprodutivos, tanto em termos de níveis séricos absolutos como em termos de atividade estrogênica, 60-80% do estrogênio circulante nas mulheres pré-menopausa é produzido pelos ovários, durante a gravidez pode ser secretado pela placenta muito embora outros órgãos também tenham esse papel e a ação desse hormônio também depende de vários fatores (NELSON E BULUN, 2001).

Alguns estrogênios podem ser produzidos em pequenas quantidades por alguns tecidos periféricos como, por exemplo, fígado, glândula adrenal, glândulas mamárias e mesmo o tecido adiposo e na peri- e menopausa, ocorre uma grande redução na produção de estrogênios e consequente inabilidade responsiva à gonadotropina, ao hormônio folículo-estimulante (FSH) e ao hormônio luteinizante (LH) (FRIEDLANDER E JONES, 2002). Com isso a produção extra-glandular dos estrogênios se torna, predominante, sendo que o principal estrogênio plasmático verificado nesse período é a estrona, entretanto esse hormônio é menos potente que o 17- $\beta$ -estradiol (NELSON E BULUN, 2001).

Apesar dos relatos do papel protetor dos estrogênios em tecidos cardíacos, estudos a respeito da função dos mesmos em algumas regiões específicas do cérebro ainda são escassos, como é o caso das regiões do tronco encefálico onde o papel dos estrogênios ainda é pouco discutido. Grupos de neurônios localizados no tronco encefálico, especificamente, em regiões do bulbo (Núcleo do Trato Solitário-NTS e região rostro-ventro-lateral do bulbo-RVLM) constituem um sítio importante para o controle do sistema cardiovascular, pois, têm sido apontados como principais áreas no controle da atividade simpática e estão diretamente envolvidas na recepção dos sinais aferentes provenientes dos barorreceptores arteriais e quimiorreceptores centrais e periféricos (MIFFLIN, 1992; CIRIELLO *et al.*, 1994; COLOMBARI *et al.*, 1996; MACHADO *et al.*, 1997; GUYENET, 2006; GUYENET, BAYLISS *et al.*, 2008; GUYENET *et al.*, 2010).

Como relatado anteriormente, a região do tronco encefálico sofre influencia direta da função/disfunção mitocondrial e do estresse oxidativo, dessa forma é tentador especular que os estrogênios podem atuar como uma possível ferramenta terapêutica para combater o estresse oxidativo induzido pelo insulto nutricional. Corroborando com essa nossa hipótese, Bellanti *et al.* (2013) demonstrou que o estrogênio tem um papel importante na regulação do equilíbrio redox pelo aumento da expressão das enzimas antioxidantes e restauramento da capacidade antioxidante total em mulheres após a reposição de estrogênios (BELLANTI *et al.*, 2013).

Esses hormônios de fato são muito importantes para a neuroproteção e seus mecanismos podem estar associados à modulação na função mitocondrial por várias

vias, sendo não apenas a nível neural, mas também nas células gliais (SIMPKINS E DYKENS, 2008; AREVALO *et al.*, 2010). Essa modulação pelo estrógeno parece estar associada a diminuição da incidência das doenças neurodegenerativas e hipertensão arterial (PIETRANERA *et al.*, 2015), pois em ratos espontaneamente hipertensos o E2 induziu neuroproteção com aumento de BDNF e diminuição de GFAP na região do hipocampo (PIETRANERA *et al.*, 2014).

Nesse contexto, o E2 pode desempenhar efeitos consideráveis, atuando como um agente neuroprotetor por estimular efeitos antioxidantes. De Marinis, *et al.* (2013) demonstrou que o E2 exerce efeito protetor contra o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), reduzindo a apoptose nas células do neuroblastoma do hipocampo e aumentando a expressão de neuroglobina (NGB) em cultura primária de astrócitos corticais, além de induzir proteção contra o estresse oxidativo, eliminando EROs e controlando a inflamação (DE MARINIS *et al.*, 2013). Corroborando com esse efeito protetor do E2, Patki *et al.* (2013), em um estudo com hipocampo, em ratas com deficiência de E2 através da ovariectomia (OVX), observou um aumento do estresse oxidativo, associado ao aumento da pressão arterial, comportamento de ansiedade, deficiência de aprendizagem e memória. As ratas OVX apresentaram nível de estresse oxidativo, significativamente maior do que em relação ao grupo controle (com níveis normais de E2), avaliados pelos níveis de isoprostanos e também de carbonilação. Na avaliação da pressão arterial, verificaram aumento tanto na pressão sistólica como na diastólica o grupo OVX (Patki *et al.* 2013). Avaliando também o hipocampo de ratas OVX, onde duas semanas após a ovariectomia foi injetado 2 µL de β amiloide 25-35 (A-β25-35), Bernal-Mondragón, *et al.* (2013) percebeu que o estresse oxidativo gerado pela administração de A-β25-35 é suficiente para produzir um prejuízo olfativo, mas que esse efeito pode ser evitado com a administração do E2 antes e depois da injeção de A-β25-35 sugerindo uma utilização do estradiol para o tratamento do Alzheimer. Os autores sugeriram que o efeito protetor do estradiol é mediado pela modulação positiva da bioenergética mitocondrial do cérebro se tornando assim importante meio de tratamento para o Alzheimer (BERNAL-MONDRAGON *et al.*, 2013).

Em um estudo experimental com Parkinson, Misiak, *et al.* (2010) constataram que os neurônios mesencefálicos de machos são mais vulneráveis do que os neurônios de fêmeas ao 6-OHDA (6-hidroxidopamina), uma neurotoxina que destrói

terminais catecolaminérgicos utilizado em modelo experimental de doença de Parkinson. Além disso, os machos apresentaram de 1,5 a 2 vezes mais células apoptóticas e necróticas do que as células do sexo feminino. Em adição a essas observações, os autores verificaram que as mitocôndrias do sexo masculino produziam mais EROs do que, as mitocôndrias do sexo feminino. Quando os autores trataram essas células com E2, não observaram mais diferenças nos níveis de EROs. Os autores concluíram que os mecanismos subjacentes a essa maior vulnerabilidade de neurônios do sexo masculino em relação ao feminino pode ser devido a níveis mais elevados de EROs que em conjunto com uma regulação diferenciada da transcrição do gene mitocondrial, pode levar a uma redução na atividade da cadeia respiratória e aos baixos níveis de ATP observados nos machos em comparação com as fêmeas (MISIĄK *et al.*, 2010). Em outro estudo associado ao Parkinson, Campos, *et al.* (2012), tratou com E2 por 10 dias antes da indução do Parkinson usando 6-OHDA e verificaram que o E2 impediu a perda de neurônios dopaminérgicos induzida pelo 6-OHDA tanto na substância negra como no corpo estriado, e provocou um aumento dos níveis de proteína GDNF em ambas as áreas. Os autores concluíram que o E2 estimula o GDNF, fator neurotrófico derivado de células da glia que promovem a sobrevivência e diferenciação de neurônios dopaminérgicos em cultura (CAMPOS *et al.*, 2012).

De acordo com esse estudo, Martins *et al.* (2012), observou que ratas OVX com 5 ou 10 meses de idade apresentavam elevados níveis de estresse oxidativo no estriado, córtex, hipocampo e cerebelo; e que quando estas eram tratadas com estradiol, os níveis de estresse oxidativo reduzia para níveis iguais ou até inferior os valores controle (MARTINS *et al.*, 2012).

## 2.6 Estresse Oxidativo e Diferença de Gênero

O estresse oxidativo está muito associado à disfunção mitocondrial e como já foi discutido mais acima está intimamente relacionado ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (ISLAM, 2016). Muito embora o aumento de EROs/ERNs esteja ligado a essas doenças, a incidência é bem menor nas fêmeas quando comparada aos machos (BALDERESCHI *et al.*, 2000). Em uma meta – análise, Hirsch e colaboradores verificaram que a maioria dos artigos incluídos no estudo demonstraram que a incidência na doença de Parkinson é maior em homens que em

mulheres em todos os grupos etários e que essa diferença só é significativa entre 60 – 69 e 70 – 79 anos de idade (HIRSCH *et al.*, 2016).

Essa menor incidência de doenças neurológicas nas fêmeas provavelmente ocorra devido a menores níveis de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial no sexo feminino quando comparado ao masculino; como mostrou Guevara e colaboradores (2009), avaliando o sistema antioxidante e mitocondrial de cérebros de ratos aos 24 meses de vida, verificou-se uma diminuição de oxidação de proteínas totais, proteína mitocondrial e peroxidação lipídica nas fêmeas, bem como aumento da atividade da citrato sintase, aumento de consumo de oxigênio nos estados 3 e 4 assim como o aumento da UCP – 4 e UCP-5 quando comparado aos machos (GUEVARA, SANTANDREU *et al.*, 2009). Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa avaliando o papel da idade no sistema antioxidante e mitocondrial de cérebro de ratos de 6, 12, 18 e 24 meses de idade mostraram que o estresse oxidativo de fato acumula com o envelhecimento, com o aumento da atividade da cadeia transportadora de elétrons e falência do sistema antioxidante e embora esse efeito seja acentuado com a idade acontece de forma mais branda nas fêmeas quando comparado aos machos (GUEVARA *et al.*, 2011).

Borras e colaboradores, utilizando mitocôndrias isoladas de camundongos aos 120 dias de idade demonstrou que as mitocôndrias de fêmeas apresentam um dano ao DNA mitocondrial 4 vezes menor quando comparadas nos machos e isso pode ser explicado pelo fato dele ter encontrado uma expressão gênica para algumas enzimas antioxidantes (SOD e GPx) bem maior nas fêmeas que os machos (BORRAS *et al.*, 2003). Avaliando cérebros de ratos juvenis Chen, (2011) verificou aumento na GPx e na Glutamato – Cisteína Ligase (GCL) que é uma enzima chave na síntese da glutathione quando comprado ao machos. Esses dados sugeriram que as fêmeas teriam maior proteção devido ao aumento da atividade dessas enzimas (CHEN, Ji *et al.*, 2011).

Estudos vêm demonstrando que um dos principais fatores que pode explicar a diferença sexual no desenvolvimento de doenças com base na neuroproteção é fator hormonal e logo a presença dos hormônios sexuais poderia proteger o sistema nervoso e o déficit desses hormônios aumentaria a vulnerabilidade do tecido neural à lesão e ao aparecimento de doenças (YAO *et al.*, 2011; YAO *et al.*, 2012; SIDDIQUI

*et al.*, 2016). Os hormônios ovarianos como estrógeno e a progesterona têm um papel neuroprotetor e regula o estresse oxidativo bem como o metabolismo mitocondrial, como observado por Irwin e colaboradores (2008), onde utilizando mitocôndrias isoladas de cérebro de fêmeas adultas ovariectomizadas suplementadas com estrógeno (E2) e progesterona (P4), verificaram que tanto a reposição com E2 ou com P4 separadamente era capaz de aumentar a capacidade respiratória mitocondrial com aumento na expressão do complexo IV mitocondrial e da SOD, assim como no consumo de oxigênio nos estados 3 e 4 e diminuição da produção de EROs e peroxidação lipídica. Agindo em conjunto (E2+P4), embora tenha efeito protetor, a magnitude da resposta é diminuída, ou seja, a reposição hormonal foi capaz de induzir alteração no metabolismo mitocondrial, bem como no sistema antioxidante enzimático o que atenua o estresse oxidativo e possíveis danos ao sistema nervoso (IRWIN, YAO *et al.*, 2008).

## *2.7 Efeitos intergeracionais e Insultos Nutricionais*

Estudos vêm mostrando que insultos do tipo nutricional, hormonal, toxinas, estresse e ambiente adverso, tanto no início quanto no decorrer da vida, podem ser encontrados em gerações subsequentes que não foram expostas a nenhum tipo de insulto (BALE, 2014; 2015). Logo, quando a mãe (geração F0) é exposta ao insulto, o útero também sofrerá o insulto podendo afetar com isso o desenvolvimento da primeira geração (F1), devido às modificações moleculares e bioquímicas nas células germinativas do feto, podendo também afetar a segunda geração (F2) ou terceira geração (F3), sendo esse fenômeno denominado efeito de transgeracional (SZYF, 2015). Segundo, Heard e Mastiensen (2014) quando F0 e F1 são expostos ao insulto e a transmissão dos efeitos desse insulto esta presente em F1 e F2 é denominado efeito intergeracional, sendo apenas após a geração F2 e suas subsequentes gerações que se denomina de efeito de transmissão transgeracional (HEARD E MARTIENSSSEN, 2014).

Contudo, quando esses efeitos se desenvolvem na prole sem uma reexposição ao insulto, ou seja, se a mãe não sofrer mais o insulto inicial ou outro tipo de insulto no decorrer da vida, mas mesmo assim as gerações subsequentes apresentam as alterações induzidas pelo insulto original, o efeito é conhecido como transgeracional verdadeiro (JIRTLE E SKINNER, 2007; SKINNER, 2008). Em contra

partida, quando ocorrem várias exposições maternas aos insultos, tanto o insulto inicial como os diferentes tipos de insultos, esse efeito é denominado como efeito transgeracional de reexposição (BALE, 2015).

## 2.8 Tipos de estudos e de insultos sobre Efeitos Intergeracional

Em humanos são escassos os estudos transgeracionais, devido o longo tempo para obter os resultados, assim como, o registro dos dados por mais de uma geração torna os estudos longitudinais em humanos um tanto difícil, muito embora um dos primeiros estudos transgeracionais em humanos foi realizado com netos de mulheres que foram expostas a restrição calórica-proteica durante a fome holandesa (período de 1944 – 1945), onde se observou uma maior adiposidade corporal nos netos onde as avós passaram fome do que nos netos do grupo controle (BROWN E SUSSEK, 2008; PAINTER *et al.*, 2008). De forma similar, Kaati *et al.*, (2002; 2007) mostraram que os netos cuja as avós tiveram alimentação em abundância na infância, apresentavam na segunda geração uma maior probabilidade de desenvolver diabetes tipo 2 em meninas de 8 a 10 anos e meninos de 9 aos 12 anos de idade.

A maioria dos estudos que se conhece sobre efeitos transgeracionais foi realizada em modelos animais desde os mais antigos (ZAMENHOF *et al.*, 1971; BEACH *et al.*, 1982) aos mais recentes (BALE, 2014; VICKERS, 2014). Atualmente existem diversos modelos que visam investigar as alterações entre gerações com modelos de glicocorticoides (BUCHWALD *et al.*, 2012), exposição a drogas psicoativas (LAM *et al.*, 2000; SLAMBEROVA *et al.*, 2005), modelo vascular (ANDERSON, C. M. *et al.*, 2006; ANDERSON, C. M. *et al.*, 2009), entre outros (MAHSOUDI *et al.*, 2007). Utilizando cobaia tratadas com glicocorticoides, Crudo *et al.*, (2012) mostrou que esse tratamento aumenta a metilação de DNA no fígado em F2.

Contudo, os estudos mais comuns para investigar os efeitos transgeracionais são os que utilizam os modelos dietéticos com ênfase na restrição calórica (JIMENEZ-CHILLARON *et al.*, 2009) e dietas hiperlipídicas (HARRISON E LANGLEY-EVANS, 2009). Utilizando um modelo de crescimento intrauterino restrito, com uma diminuição do suprimento sanguíneo devido ao clampeamento arterial, Chernoff e colaboradores, (2009) mostraram diminuição na viabilidade das células germinativas e também o

peso da prole em F1. Um modelo muito utilizado também é o modelo de obesidade ou dieta hiperlipídica, como mostrado por King *et al.*, (2013) que avaliando camundongos machos e fêmeas por duas gerações verificaram aumento de peso em ambos os sexos na primeira geração e diminuição do peso nas fêmeas além de diminuição do colesterol nos machos de segunda geração. Em modelo de obesidade, Dunn e Bale (2011), demonstraram aumento no comprimento e peso de machos e fêmeas e resistência a insulina nas três gerações subsequentes de machos.

Estudos que utilizam modelo de desnutrição proteica demonstraram diversos efeitos transgeracionais como em Zamenhof e colaboradores que utilizaram uma restrição durante a gestação e verificou uma diminuição no número de células cerebrais em F2 (ZAMENHOF, VAN MARTHENS *et al.*, 1971). Martin e colaboradores utilizando uma restrição no período perinatal em ratos demonstraram baixo peso corporal em F1 e alto peso corporal e resistência a insulina em F2 (MARTIN *et al.*, 2000).

Zambrano e colaboradores (ZAMBRANO *et al.*, 2005), estudando ratos adultos que sofreram restrição proteica no período da gestação, lactação ou em ambos por mais de uma geração verificaram que o grupo de fêmeas que sofreu restrição durante a gestação e lactação e o grupo que sofreu só na lactação da primeira geração (F1) tiveram um peso corporal, ingestão alimentar e sensibilidade à insulina menor quando comparados a seus grupos controles. Já na segunda geração (F2) tanto as fêmeas quanto os machos mostraram resistência à insulina (ZAMBRANO, MARTINEZ-SAMAYOA *et al.*, 2005). Em 2004 Benyshek e colaboradores utilizando um modelo de mães que sofreram restrição no período perinatal verificaram na prole ao nascer uma diminuição do peso em F1 e aumento do peso em ratos machos F2 (BENYSHEK *et al.*, 2004).

Burdge e colaboradores utilizando uma restrição proteica na gestação e lactação demonstraram em ratos machos uma diminuição do receptor para glicocorticoides e aumento na expressão de RNA para a enzima Fosfenolpiruvato carboxilase (PEPC) (BURDGE, SLATER-JEFFERIES, *et al.*, 2007). Tanto em 2006 quanto em 2008, Benyshek e colaboradores utilizando a prole de ratas que sofreram desnutrição proteica verificaram resistência à insulina por duas gerações F1 e F2

(BENYSHEK *et al.*, 2006; BENYSHEK *et al.*, 2008). Bertram e colaboradores utilizando um modelo de restrição proteica em cobaias verificaram alteração no sistema neuroendócrino (aumento na atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal) e aumento nos níveis de cortisol em F1 e F2 (BERTRAM *et al.*, 2008).

Em outro estudo com restrição proteica severa durante a gestação e lactação em ratos Wistar, Pinheiro e colaboradores, demonstraram aumento de resistência à insulina em F1 e F2 e aumento de glicemia e hiperinsulinemia em F2 (PINHEIRO *et al.*, 2008). Submetendo ratas a restrição proteica durante a gestação, Torrens e colaboradores verificaram aumento de pressão arterial sistólica em F2 em machos e fêmeas (TORRENS *et al.*, 2008). Por sua vez, Harrison e Langley – Evans utilizando o modelo de restrição proteica durante a gestação (9% de caseína) verificou aumento de pressão arterial em F1 e F2 além da diminuição do número de néfrons em F2 (HARRISON E LANGLEY-EVANS, 2009). Carone e colaboradores utilizando também um modelo de restrição proteica (11% de proteína) em camundongos na gestação encontraram alterações na expressão gênica do SREBP, que atua como regulador chave do metabolismo de colesterol, por duas gerações (CARONE *et al.*, 2010).

Utilizando um modelo de desnutrição severa (5% de proteína) em ratos, Frantz e colaboradores demonstraram diminuição nos níveis de insulina e no número de células beta pancreáticas por três gerações (FRANTZ *et al.*, 2011). Estudando camundongos submetidos a uma restrição proteica severa durante a gestação, Peixoto-Silva e colaboradores, encontraram uma diminuição no peso, aumento nos níveis de colesterol, leptina e resistência à insulina além de aumento no número de células betas pancreáticas (PEIXOTO-SILVA *et al.*, 2011). Os estudos relacionados à restrição proteica e os efeitos intergeracionais estão resumidos na **tabela 1** abaixo.

**Tabela 1.** Estudos relacionados à restrição proteica, geração, espécies e principais resultados encontrados.

| % proteína                   | Geração     | Espécies       | Efeitos                                                                                                                                                                       | Sexo | Autor                                             |
|------------------------------|-------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|---------------------------------------------------|
| 8 % (gestação)               | F1, F2 e F3 | Sprague Dawley | □ Número de células cerebrais em F2.                                                                                                                                          | M    | (ZAMENHOF, VAN MARTHENS <i>et al.</i> , 1971)     |
| 8 % (gestação e lactação)    | F1 e F2     | Sprague Dawley | □ Peso corporal em F1 e □ peso corporal e resistência a insulina nos animais hipernutridos em F2.                                                                             | M    | (MARTIN, JOHNSTON <i>et al.</i> , 2000)           |
| 10 % (gestação e lactação)   | F1 e F2     | Sprague Dawley | □ Peso, ingestão alimentar □ da resistência a insulina em F1 e □ resistência a insulina em F2.                                                                                | M/F  | (ZAMBRANO, MARTINEZ-SAMAYOA <i>et al.</i> , 2005) |
| 8 % (gestação e lactação)    | F1 e F2     | Sprague Dawley | □ Peso dos animais desnutridos e □ hipernutridos machos em F1 e □ peso do animais desnutridos e □ hipernutridos em F2. □ resistência a insulina nos hipernutridos em F1 e F2. | M/F  | (BENYSHEK, JOHNSTON <i>et al.</i> , 2004)         |
| 9 % (gestação e lactação)    | F1 e F2     | Wistar         | □ metilação do GR <sup>+</sup> e □ expressão de RNA para a PEPC <sup>#</sup> em F1/F2. (Fígado)                                                                               | M    | (BURDGE, SLATER-JEFFERIES <i>et al.</i> , 2007)   |
| 8 % (gestação e lactação)    | F1, F2 e F3 | Sprague Dawley | □□ resistência a insulina em F1 e F2.                                                                                                                                         | M/F  | (BENYSHEK, JOHNSTON <i>et al.</i> , 2006)         |
| 8 % (gestação e lactação)    | F1, F2 e F3 | Sprague Dawley | □□ resistência a insulina em F1 e F2                                                                                                                                          | M/F  | (BENYSHEK, JOHNSTON <i>et al.</i> , 2008)         |
| 10 % (gestação)              | F1 e F2     | Wistar         | □□ Pressão arterial em F1 e F2. □ níveis de cortisol e □ atividade do eixo HPA                                                                                                | M/F  | (BERTRAM, KHAN <i>et al.</i> , 2008)              |
| 5 % (gestação e/ou lactação) | F1 e F2     | Wistar         | □ Glicemia e resistência a insulina. □ Glicemia, hiperinsulinemia e resistência em F2.                                                                                        | M/F  | (PINHEIRO, SALVUCCI <i>et al.</i> , 2008)         |
| 9 % (gestação)               | F1 e F2     | Wistar         | □ pressão arterial em F2.                                                                                                                                                     | M/F  | (TORRENS, POSTON <i>et al.</i> , 2008)            |
| 9 % (gestação)               | F1, F2 e F3 | Wistar         | □ pressão arterial em F1 e F2 e □ número de néfrons em F2.                                                                                                                    | M/F  | (HARRISON E LANGLEY-EVANS, 2009)                  |
| 9 % (gestação)               | F1 e F2     | Camundongo     | □ expressão genes responsáveis pelo metabolismo de lipídios. □ colesterol em F1 e F2.                                                                                         | M/F  | (CARONE, FAUQUIER <i>et al.</i> , 2010)           |

|                |             |            |                                                                                                                   |     |                                              |
|----------------|-------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------------------------------------------|
| 5 % (gestação) | F1, F2 e F3 | Camundongo | □ Níveis de insulina e das células beta do pâncreas em F1, F2 e F3.                                               | M   | (FRANTZ, AGUILA <i>et al.</i> , 2011)        |
| 5 % (gestação) | F1 e F2     | Camundongo | □ Massa corporal em F1. □ Leptina, colesterol, resistência a insulina, número de células pancreáticas em F1 e F2. | M/F | (PEIXOTO-SILVA, FRANTZ <i>et al.</i> , 2011) |

Em conjunto com os dados da literatura e nossa linha de pesquisa, construímos nossa hipótese.

### 3 HIPÓTESE

Restrição proteica materna no período crítico do desenvolvimento é capaz de alterar a função mitocondrial e o balanço oxidativo no tronco encefálico de ratos machos e fêmeas por mais de uma geração.

### 4 OBJETIVOS

#### 4.1 *Objetivo Geral*

Investigar a influência da restrição proteica materna durante a gestação e lactação na capacidade mitocondrial e no balanço oxidativo no tronco encefálico de filhotes machos e fêmeas por duas gerações.

#### 4.2 *Objetivos Específicos*

Avaliar no tronco encefálico de ratos jovens machos e fêmeas:

- ✓ A capacidade respiratória mitocondrial;
- ✓ A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS);
- ✓ Os níveis de peroxidação lipídica;
- ✓ Os níveis de oxidação de proteínas;
- ✓ A atividade das enzimas antioxidantes a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-s-transferase (GST).
- ✓ Os níveis de glutathione reduzida (GSH);
- ✓ Os níveis de glutathione oxidada (GSSG);
- ✓ A razão GSH/GSSG.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Animais e Dieta

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* provenientes da colônia do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco. As progenitoras (n=32) pesando entre 220-250g foram abrigadas no biotério Centro Acadêmico de Vitória (CAV), sob condições padrão de temperatura, iluminação e umidade com água e ração comercial de biotério *ad libitum* (VAN ZUTPHEN, 1993). Foram submetidos períodos alternados e regulares de luz e escuridão (12/12 horas) e um período de adaptação de 15 dias para sincronizar o ciclo circadiano. Após a adaptação, as ratas quando em período estral, foram acasaladas na proporção 2 fêmeas para 1 macho. A prenhez foi diagnosticada pela identificação de espermatozóides nas lâminas do esfregaço vaginal (MARCONDES *et al.*, 2002). Metade dos animais nascidos a partir do 1º acasalamento (geração F1) após atingir a idade reprodutiva (aproximadamente 75 dias de vida) foram acasalados para obtenção da 2ª geração (geração F2). O restante da geração F1 foi utilizado para as análises aos 30 dias de vida. Da mesma forma os animais da segunda geração (F2) foram decapitados para as análises aos 30 dias.

A manipulação e os cuidados com os animais seguiram as recomendações do COBEA e aprovação do Comitê de Ética em Estudos com Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. O estudo foi aprovado pelo número do processo 23076.018417/2013-73 (Anexo I). As ratas prenhas foram divididas em grupos experimentais de acordo com a dieta fornecida: Normoproteico (NP, 17% de proteína) e Hipoproteico (HP, 8% de proteína) (**Tabela 2**). Na lactação, as ratas continuaram recebendo as respectivas dietas (Normo e Hipo) e após o desmame (21 dias de idade), os filhotes receberam dieta comercial de biotério (**Tabela 3**).

**Tabela 2:** Composição de dieta experimental isocalórica com diferentes teores de proteína.

| Ingredientes                   | Quantidade* |           |
|--------------------------------|-------------|-----------|
|                                | 8 %         | 17%       |
| Caseína                        | 94,12 g     | 200,0 g   |
| Mix Vitamínico                 | 10,0 g      | 10,0 g    |
| Mix Mineral                    | 35,0 g      | 35,0 g    |
| Celulose                       | 50,0 g      | 50,0 g    |
| Bitartarato de Colina          | 2,5 g       | 2,5 g     |
| DL-Metionina                   | 3,0 g       | 3,0 g     |
| Óleo de Soja                   | 76,0 ml     | 76,0 ml   |
| Amido de Milho                 | 503,4 g     | 397,486 g |
| Amido Dextrinizado             | 132,0 g     | 132,0 g   |
| Sacarose                       | 100,0 g     | 100,0 g   |
| THBT (antioxidante de gordura) | 0,014 g     | 0,014 g   |

\*Quantidade para 1 kg de dieta. Descrito por Reeves, (REEVES *et al.*, 1993)

**Tabela 3:** Composição da dieta LABINA (Purina Brasil) Utilizada após o desmame.

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

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

## 5.2 Processamento do material biológico para análise bioquímica

Os troncos encefálicos foram homogeneizados em tampão de extração (Tris base 100 mM, pH 7,5; EDTA 10 mM; contendo um coquetel de inibidores de protease). Para quantificação proteica e posteriores avaliações, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm, a 4° C, por 10 minutos e os sobrenadantes foram utilizados no período de uma semana.

## 5.3 Processamento do material biológico para análises mitocondriais

Aos 30 dias de vida, os animais de primeira (F1) e segunda (F2) geração foram decaptados por guilhotina e foi dissecado do encéfalo o tronco encefálico em aproximadamente 60 segundos sobre uma cama de gelo. O tecido foi homogeneizado em homogeneizador IKA modelo RW 20 D S32 com uma rotação de aproximadamente 200 r.p.m. A homogeneização foi realizada dentro do gelo em um recipiente contendo o tronco encefálico dos animais e 2 ml de tampão de isolamento para mitocôndria gelado composto por Manitol (225 mM), Sacarose (75 mM), Hepes (4 mM), EGTA (0,5 mM) e Taurina (2 mM) com o pH do tampão equilibrado para 7.2.(LAGRANHA *et al.*, 2010).

## 5.4 Dosagem de Proteína

Após o isolamento, as amostras foram usadas para a quantificação das proteínas totais determinada pela técnica de Bradford que utiliza o corante de Coomassie brilliant blue (BRADFORD, 1976). A quantificação foi feita através de uma proteína padrão como Albumina do Soro Bovina (BSA) em uma concentração de 2mg/1ml. Esse método é baseado na interação entre o corante e as macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. Essa reação é fortemente absorvida em um comprimento de onda de 595 nm no espectrofômetro.

## 5.5 Isolamento das mitocôndrias

As mitocôndrias foram isoladas de tronco encefálico de ratos machos e fêmeas F1 e F2, controles e submetidos à desnutrição, utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial, segundo Anderson e Sims (ANDERSON, M. F. E SIMS,

2000) onde as amostras sofreram a 1° centrifugação a 4.000 rpm, a 4° C, por 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido para então fazer a 2° centrifugação a 13.000 r.p.m. por 10 minutos. Logo após a 2° centrifugação, o pellet é ressuspenso em aproximadamente 100 µl tampão de respiração (descrito abaixo) e as mitocôndrias foram usadas para as seguintes análises: capacidade respiratória mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio.

#### 5.6 *Medida da capacidade respiratória mitocondrial.*

O consumo de oxigênio das mitocôndrias do tronco encefálico (500µg) de ratos de ambos os gêneros foi medido polarograficamente utilizando-se um eletrodo do tipo Clark conectado a um oxímetro (Hansatech Instruments) a temperatura de 28°C, em uma câmara de vidro fechada, termostatizada e equipada com agitador magnético (LAGRANHA, DESCHAMPS *et al.*, 2010). Foi utilizado o tampão de respiração contendo KCl (120 mM), Hepes (4 mM), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5 mM) e BSA a 0,2% e foi utilizado como substrato do complexo I o glutamato (10 mM) e o malato (2 mM) com o pH do tampão equilibrado para 7.2 – 7.4.

#### 5.7 *Avaliação da produção de espécies reativas*

A produção de espécies reativas pelas mitocôndrias isoladas foi medidas fluorimetricamente através do probe 2',7'- Diclorofluorescina Diacetato (DCF-DA) (5 mM), previamente descrito por LeBel *et al.*, (1992). A análise foi feita em placa de Elisa de 96 poços, utilizando o tampão de respiração pH 7.2 contendo KCl (120 mM), Hepes (4 mM), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5 mM) e BSA a 0,2% e os substratos: glutamato (10 mM), o malato (2 mM). Os resultados foram expressos em % em comparação ao controle do dia.

#### 5.8 *Quantificação de peroxidação lipídica*

Para verificar a peroxidação lipídica utilizamos a reação com ácido tiobarbitúrico (TBA) que é uma técnica colorimétrica de acordo com Buege e Aust (1978). Um dos produtos da lipoperoxidação é o malondialdeído (MDA) que quando reage com o TBA forma uma solução rosa que é indicativo de da formação de substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico. A reação aconteceu colocando a amostra (300µg) em tampão Tris-HCl 10 mM em um pH 7.4 com TBA a 0,73% e

o ácido tricloroacético (TCA) a 30% que foi lido em cubeta em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados foram expressos em % em comparação ao controle do dia.

#### *5.9 Níveis de oxidação de proteína*

A oxidação de proteína foi avaliada pelos níveis de carbonilas de acordo com Reznick e Packer (REZNICK E PACKER, 1994). A reação foi feita com a amostra (300µg) junto com o ácido tricloroacético (TCA) a 30%, Denitrofenildridrazina (DNPH) a 10 mM e cloridato de guanidina a 6M. A guanidina foi diluída em ácido clorídrico a 2,5 N. A reação foi realizada em cubeta de quartzo de 1 ml em espectrofotômetro de 370 nm. Os resultados foram expressos em % em comparação ao controle do dia. Os resultados foram quantificados usando o coeficiente de extinção do DNPH (22.000 M).

#### *5.10 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)*

A atividade da SOD foi avaliada através do método de auto-oxidação da adrenalina (15 mM) descrito por Misra & Fridovich (MISRA E FRIDOVICH, 1972) em tampão de carbonato (50 mM) pH 10.2, EDTA (5 mM). A adrenalina foi dissolvida em tampão e ácido acético a 0,5%. A reação foi verificada em cubeta de quartzo de 1 ml em espectrofotômetro a 480 nm durante 3 minutos (leituras a cada 30 segundos). Os resultados foram expressos em % em comparação ao controle do dia.

#### *5.11 Atividade da Catalase (CAT)*

A atividade da catalase foi avaliada como descrito previamente por Aebi (AEBI, 1984). A reação aconteceu pela decomposição do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 300 mM por 3 minutos (leituras a cada 30 segundos) em um tampão fosfato (50 mM) e pH 7,0. A leitura foi feita em cubeta de quartzo em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 240 nm. Os resultados foram expressos em % em comparação ao controle do dia.

#### *5.12 Atividade da Glutathione S transferase (GST)*

A atividade da GST foi avaliada de acordo com Habig (HABIG, PABST E JAKOBY, 1974). A reação foi feita com a amostra, tampão fosfato de potássio (100 mM) em um pH levemente ácido (6,5), EDTA (1 mM), glutathiona reduzida (60 mM) e a leitura foi feita em cubeta de quartzo de 1 ml no espectrofotômetro por 1 minuto a um comprimento de onda de 340 nm. Os resultados foram expressos em % em comparação ao controle do dia.

#### 5.13 Níveis da Glutathiona Reduzida (GSH)

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) foram verificados segundo o método de Hissin e Hilf (1976). A reação é feita com o tampão de ensaio (Tris base 50 mM, pH 8,0; EDTA 5 mM), amostra (300µg) e Ortoftaldeído (OPT) (1 mg/ 1 ml de metanol). A leitura foi feita no espectrofluorímetro em um comprimento de onda 350 nm and 420 nm, excitação e emissão respectivamente. Foi feito uma curva de GSH entre 0,5 até 12,0 µM. Os resultados foram expressos em µM/ mg proteína.

#### 5.14 Níveis da Glutathiona Oxidada (GSSG)

Os níveis de glutathiona oxidada (GSSG) foram avaliados segundo o método de Hissin e Hilf (1976). A reação é feita com o tampão de ensaio (hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N, NEM(N-Etilmaleimida) a 40 mM, amostra (300µg) e Ortoftaldeído (OPT) (1 mg/ 1 ml de metanol). A leitura foi feita no espectrofluorímetro em um comprimento de onda 350 nm and 420 nm, excitação e emissão respectivamente. Foi feito uma curva de GSSG entre 0,4 até 12,0 µM. Os resultados foram expressos em µM/ mg proteína. Avaliamos o estado redox pela razão de GSH/GSSG segundo o método de Hissin e Hilf (HISSIN E HILF, 1976).

#### 5.15 Níveis de Estradiol

Os níveis de Estradiol foram analisados no soro através do *kit de Elisa Interkit*. O kit contém: Placa com 96 poços, calibradores (0, 30 100, 300, 1000 pg/mL – 0.5 mL cada), Anticorpo (1x 7mL), conjugado (1x 12mL), controles 1 e 2 – 0.5 mL cada, substrato (1x 11mL), solução de bloqueio (1x 11mL) e solução de lavagem (10x concentrado – 1x 100 mL). As amostras foram descongeladas completamente e ficaram em temperatura ambiente antes do teste. Utilizamos 25

µl de cada amostra em cada poço. A leitura foi feita a 450 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em pg/mL.

#### 5.16 Análise Estatística

A construção do banco de dados e as análises estatísticas foram desenvolvidas no programa Excel (versão 2007, Microsoft, USA) e Graphpad Prisma 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), respectivamente. Para determinação de normalidade da amostra foram utilizados os testes de normalidade *Kolmogorov-Smirnov* e *Shapiro-Wilk*. Diferenças entre grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p \leq 0,05$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). A comparação entre os dados do grupo normoprotéico (NP) e hipoproteico (HP) foi realizado pelo teste “t” de Student não pareado. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 *Maternal low-protein diet effect in female brainstem can be observed through generation?*

Esses resultados correspondem aos efeitos de uma restrição proteica no período crítico do desenvolvimento em tronco encefálico de ratas fêmeas juvenis na primeira geração e com reexposição ou não ao insulto nutricional na segunda geração.

**Artigo 1** – Artigo a ser submetido na Revista Nutritional Neuroscience

**Fator de Impacto:** 2.6

**Qualis:** B1 (Medicina II)

**Maternal low-protein diet effect in female brainstem can be observed through generation?**

David Filipe Santana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry, Federal University of Pernambuco-CAV, Vitoria de Santo Antao, Pernambuco, Brazil.

Running Title: Effects transgeracional in the brain of female rats malnourished

**#Mailing address:**

Claudia Jacques Lagranha

Rua Alto do Reservatório, s/n – CEP: 55608-680 – Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte – Bela Vista – Vitória de Santo Antão, PE – Brasil.

Fone/Fax: (00 55 81) 35233351 **E-mail:** lagranha@hotmail.com

**The authors declare that has none conflict of interest.**

## ABSTRACT

Previous observations in animals and humans showed that insults in critical period of development can be associated with diseases in adult life. It has been shown in brainstem that diet poor in protein induce the mitochondrial dysfunction, increased of lipid peroxidation and oxidative imbalance in adult males. Little is known about such effects of protein restriction for more than one generation and in females. Therefore, the present study aims to evaluate the effect of a diet poor in protein during brain developmental period on mitochondrial function and oxidative balance in the brainstem from females for more than one generation. Wistar offspring were divided into six groups according mothers' diets: control (NP, 17 % of protein) and low-protein (LP, 8 % of protein) groups in the first (F1), control (NP, 17 % of protein) and low-protein (LP, 8 % of protein) groups in the second (F2) and control (NP, 17 % of protein) and low-protein (LP, 8 % of protein) groups that received commercial chow (Labina, Purina) in second generation (F2 Labina). After weaning, all groups received commercial chow until sacrifice at the 30<sup>th</sup> day in F1 and F2. It was found increase in production of Reactive Species (ROS) in LP-group in F2, decrease in mitochondrial oxygen consumption and Respiratory Control (RCR). The RCR also decrease in LP-group in F2 Labina. It was found an increase in lipid peroxidation in LP-group in F1 and F2 Labina, but a decrease in protein oxidation in F2-Labina. The redox state was found decreased in F1 and F2 Labina. The findings suggest that in the first generation LP diet does not induce mitochondrial dysfunction, but induces alteration in lipid peroxidation with modulation in enzymatic antioxidant system. Also our data suggest that in the second generation nutritional insult can be observed and when the second generation is submitted to the re-exposure to the nutritional insult the effects are greater than in the first generation.

**Key Words:** Transgenerational effects; Maternal low-protein diet; Mitochondrial; Brainstem; Female.

## Introduction

Nutritional insults during critical period of development it's one of the most studied factor associated with neurological pathogenesis (BONATTO, POLYDORO *et al.*, 2006; FEOLI, A. M., SIQUEIRA, I. *et al.*, 2006; FEOLI, LEITE *et al.*, 2008). Maternal low-protein diet during the vulnerable period of the brain development may cause serious injuries, affecting several biological process in brain (GRESSENS *et al.*, 1997) such as phosphorylation of synaptic membrane proteins (SINGH E SHANKAR, 1999), neuronal connections and neurotransmitter systems(MORGANE, MOKLER *et al.*, 2002; NAYAK E CHATTERJEE, 2003; DUTRA-TAVARES *et al.*, 2015). Recently, data from our laboratory, evaluating the effect of maternal low-protein diet on brainstem showed that in male offsprings with 22 and 100 days of age shows mitochondrial dysfunction, increases in oxidative stress biomarkers and reduction on antioxidant defense in both enzymatic and non-enzymatic system (FERREIRA, D. S., LIU *et al.*, 2015; FERREIRA, D. J., DA SILVA PEDROZA *et al.*, 2016).

Additionally, de Brito Alves *et al.*, using the same experimental model of protein restriction showed an increase in arterial blood pressure in adult offsprings (at 90 d of age)(DE BRITO ALVES, NOGUEIRA *et al.*, 2014). Barros *et al.*, have shown in juvenile rats that perinatal protein restriction increases sympathetic tone (BARROS, DE BRITO ALVES *et al.*, 2015). Although the controversy about the mechanisms involved in hypertension, studies have suggested that more than 50% of hypertension begins in disorder in central nervous system (CNS), wherein the nucleus located in the brainstem such as rostral ventrolateral medulla (RVLM) and nucleus of the solitary tract (NTS) regulate the blood pressure (GUYENET, 2006; ESLER, 2010a; GUYENET, STORNETTA *et al.*, 2010; KUMAGAI *et al.*, 2012). Studies have shown, that an increase in reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RN) species followed by oxidative stress in

RVLM and/or NTS are close related to the hypertension (WANG, G. *et al.*, 2004; ESCOBALES E CRESPO, 2005; PETERSON, SHARMA *et al.*, 2006; NISHIHARA *et al.*, 2012; CHAN E CHAN, 2013b; a; MARINA, ANG *et al.*, 2015).

One possible mechanism attributed to developmental plasticity studies is the evidence that the modulations in intra-uterine environment can be passed through of generations from mother (F0) to daughter (F1) and/or successive generations (F2, F3, F4...)(ZAMBRANO, MARTINEZ-SAMAYOA *et al.*, 2005). Many mechanisms have been suggested to mediate transgenerational effects, such as tissue remodeling, feto-placental endocrine exchange, and epigenetic mechanisms (GODFREY, 2002; LILLYCROP *et al.*, 2005; HEARD E MARTIENSSEN, 2014). Recent study evaluating the transgenerational effect of protein malnutrition demonstrated that mitochondrial transcription factor A (i.e mtTFA) and number of mitochondrial DNA were significantly reduced in fetal pancreas, while nuclear and mitochondrial oxidative stress biomarker (i.e. 8-oxo-deoxy guanine) were significantly increased in female F2 (HANAFI *et al.*, 2016). Previous studies have shown that elevated concentrations of ROS can lead damage mitochondrial either at or near the site of their formation, which could damage biomolecules (i.e lipids, proteins and/or DNA) with consequent disruption in mitochondrial function (GIULIVI *et al.*, 1995; IDE *et al.*, 2001) (AYE *et al.*, 1995; AKSENOV *et al.*, 2001).

Beside the recent paper associating the transgeneration effect on the mitochondrial dynamics, it is not totally clear whether the maternal low-protein diet effect during perinatal period can be transmitted through successive generation and how function mitochondria and oxidative status are affected. Thus, in the present study, we aimed test the hypothesis that protein restriction during gestation and lactation alter the mitochondrial respiration and oxidative balance in female's

brainstem at 30 days old in two consecutive generations (i.e F1 and F2).

## **Material and Methods**

### *Ethical Standards*

Experiments were carried out in accordance with the National Institutes of Health guide for animal experimentation (NIH Publications N<sup>o</sup>. 80-23, revised 1978) and endorsed by the Ethical Committee of the Biological Science Center of the Federal University of Pernambuco (N<sup>o</sup> 23076.018417/2013-73)

### *Experimental Groups and Diet:*

#### *F1 Offspring*

Female rats at 90 days were mated (two females for one male) and on the first day of pregnancy, determined through the spermatozoa presence in the vaginal smear, they were divided into two groups in accord to dietary manipulations. Mothers (F0) were fed with diets, based on 17% protein (normo-protein) or 8% protein (low-protein), both with the same energetic value as previously described by Nascimento *et al.*, (2014) and 24h after birth, the litters were standardized to eight pups (F1). The litters were maintained on their respective diets until weaning (21 d of age) when started to receive laboratory chow (Labina; Purina Agriband) until complete 30 days of life when was sacrificed for experimental procedure. They were selected 3 pups each litter to prevent litter effect.

#### *F2 Offspring*

Mating F1 males and females at 70-90 days of age, generated F2 offspring, always taking care for the parents do not have any relationship. During gestation and lactation period, we divided the parents (F1) in two groups, F2 offspring with or

without maternal low-protein diet re-exposure. The offsprings compose the following groups of F2 offspring: 1) NP-F2: pups from mothers and fathers that received normoprotein diet during developmental and mating period; 2) LP-F2 (pups from mothers and fathers that received low-protein diet during developmental and mating period; 3) NP-F2 labina: pups from mothers and fathers that received normoprotein diet during developmental and diet commercial chow during mating period; 4) LP-F2 labina: pups from mothers and fathers that received low-protein diet during developmental and diet commercial chow during mating period. The litters were maintained on their respective diet until weaning (21 d of age) when started to receive laboratory chow (Labina; Purina Agriband) until complete 30 days of life. They were selected 3 pups each litter to prevent litter effect.

#### *Preparation of mitochondria*

After the brainstems were removed, they were immediately minced and homogenized, using a potter-Elvehjem pestle and glass tube connected to a digital homogenizer IKA<sup>®</sup> RW 20, in an ice-cold mitochondrial isolation buffer containing 225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 4 mM HEPES, 2 mM Taurine and 0.5 mM EGTA, pH 7.4. Subsequently, the samples were centrifuged at 4°C for 5 min at 4.000 RPM, the supernatants were collected and centrifuged once more at 4°C for 10 min at 13.000 RPM. After the last centrifugation, the pellets were re-suspended in the respiration buffer (RB) consisting of 120 mM KCl, 4 mM HEPES, 5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0.2% BSA (w/v), pH 7.4. The mitochondria were kept on ice during the assay (LAGRANHA, DESCHAMPS *et al.*, 2010)

### *Measurement of mitochondrial respiration*

Mitochondria were incubated in RB (1 mg protein/mL) in a 600 SL chamber connected to a Clark-type oxygen electrode (Hansatech Instruments, Pentney King's Lynn, UK) at 28°C. The mitochondrial respiration was assessed using Complex I substrates (10 mM glutamate/0.4 mM malate) and the mitochondrial phosphorylation started with 0.8 mM ADP (NASCIMENTO, FREITAS *et al.*, 2014; FERREIRA, D. J., DA SILVA PEDROZA *et al.*, 2016).

### *Measurement of RS production*

The RS production was assessed by the dihydrodichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) method (FERREIRA, D. J., DA SILVA PEDROZA *et al.*, 2016). Briefly, 0.1 mg of mitochondria was incubated in RB with complex I substrates, as described in the mitochondrial respiration section, followed by the addition of 5 µM H<sub>2</sub>DCF-DA, which in the presence of reactive species forms a fluorescent product at 485 nm excitation and 530 nm emission. The reaction was followed by gentle shaking for 8 min in FLUOstar OMEGA (BMG Labtech, USA) at 28°C. The results were expressed in units of fluorescence of DCF formation.

### *Sample preparation for oxidative stress and antioxidant analyses*

After frozen at 20°C, brainstems from NP and LP rats were immersed in cold buffer containing 50 mM TRIS and 1mM EDTA, pH 7.4, with the addition of 1 mM sodium orthovanadate and 200-µg/mL phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF). Then they were homogenized with digital homogenizer IKA® RW 20 using a potter-Elvehjem pestle and glass tube on ice for no more than 1 minute. Homogenates were centrifuged at 4.000 RPM for 10 min at 4°C and the protein used for oxidative status analyses after determination of protein concentration using the Bradford method and

read at a wavelength of 595nm absorption at room temperature (RT) (BRADFORD, 1976).

#### *Evaluation of Lipid Peroxidation*

Lipid peroxidation was analyzed using malondialdehyde (MDA) levels as previously published (BUEGE E AUST, 1978). Three hundred µg of protein was sequentially mixed to 30% (w/v) Trichloroacetic acid (TCA) and 10 mM TRIS buffer at 30°C, pH 7.4. This mixture was centrifuged at 1.700 RPM for 10 min and the supernatant was boiled for 15 min with 0.73% (w/v) thiobarbituric acid. The pink pigment yielded then was measured at 535nm absorption at RT and the results were expressed in % compared to control.

#### *Determination of Protein Oxidation*

The protein oxidation was assessed using the procedures highlighted by Reznick and Packer (REZNICK E PACKER, 1994). With the samples on ice, 30% (w/v) TCA was added to the sample and then centrifuged for 14 min at 4.000 RPM. The pellet was re-suspended in 10 mM 2,4dinitrophenylhydrazine and immediately incubated in a dark-room for 1h with agitation every 15min. Samples were washed and centrifuged three times in ethyl/acetate buffer and the final pellet was re-suspended in 6M guanidine hydrochloride, incubated for 30 min at 37°C and the absorbance read at 370 nm. The results were expressed in % compared to control.

#### *Measurement of superoxide dismutase (SOD) activity*

SOD determination was performed in accordance with the protocol developed by Misra and Fridovich (MISRA E FRIDOVICH, 1972). In brief, three hundred µg of protein were added to 0.05 M Carbonate buffer with 0.1 mM EDTA, pH 10.2. The

reaction was started with 150 mM epinephrine and the SOD activity was determined by adrenaline auto-oxidation inhibition at 30°C. The decrease in absorbance was followed for 1.5 min at 480 nm at RT and the results were expressed in % compared to control.

#### *Measurement of Catalase (CAT) activity*

The CAT activity was performed as previously described by Aebi (AEBI, 1984). Briefly, 0.3 M hydrogen peroxide and three hundred µg of protein were added to a 50 mM phosphate buffer, pH 7.0 at 20°C and the absorption decay was monitored for 3 min at 240 nm. The results were expressed in % compared to control.

#### *Measurement of Glutathione-S-transferase (GST) activity*

GST activity was measured as described previously by Habig *et al.*, (HABIG, PABST E JAKOBY, 1974; HABIG E JAKOBY, 1981). Three hundred µg of protein was incubated in a 0.1 M phosphate buffer, pH 6.5 containing 1mM EDTA at 30°C and the assay started with the addition of 1 mM 1 chloro-2,4-dinitrobenzene and 1 mM GSH. The formation of 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione was monitored through the absorbance at 340 nm and the results were expressed in % compared to control.

#### *Measurement of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG)*

To assess GSH levels, the samples were firstly diluted in a 0.1 M phosphate buffer containing 5 mM EDTA, pH 8.0. Then, an aliquot from the diluted sample was incubated with o-Phthaldialdehyde (OPT) at RT for exactly 15 min. Fluorescence intensities measured at 420 nm and excitation at 350 nm were compared with a standard curve of known concentrations of GSH. To determine GSSG levels, the samples were incubated with 0.04 M N-ethylmaleimide for 30 min in RT followed by

addition of 0.1M NaOH. When this mixture was ready, the same steps of the GSH assay were followed to determine the GSSG levels. The Redox State was determined by the ratio of GSH/GSSG as previously described (HISSIN E HILF, 1976). The results were expressed in GSH and/or GSSG levels ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein).

**Note:** All reagents used were obtained from Sigma

### *Statistics*

All values are expressed as means  $\pm$  SEM. Once the data were tested for normal distribution, unpaired Student *t* test was used to assess the differences between groups. Comparisons were considered statistically significant at  $p \leq 0.05$  and statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6.0<sup>®</sup> software (GraphPad Software, Inc.).

## **Results**

### **Mitochondrial Respiration**

The oxygen consumption ( $\eta\text{mol O}_2/\text{min}/\text{mg}$  protein) of the brainstem mitochondria was differently modulated by protein restriction through the generations, (F1 and F2). When we evaluated oxygen consumption in F1 animals, exposed or not to nutritional insult, no differences were found between the NP and LP in the conditions assessed: Basal ( $10.5 \pm 0.6$  vs  $9.6 \pm 0.7$ ), ADP-Stimulation ( $27.1 \pm 3.2$  vs  $28.7 \pm 2.1$ ), Resting ( $4.9 \pm 0.6$  vs  $5.0 \pm 0.4$ ) and Uncoupling ( $12.6 \pm 2.2$  vs  $13.2 \pm 2.3$ ) (**Figure 1A**). The respiratory control (RCR) also did not changed between NP and LP-group ( $6.5 \pm 0.4$  vs  $5.5 \pm 0.2$ ) (**Figure 1a**).

F2 animals, even after nutritional insult re-exposure, did not present differences in oxygen consumption in the basal state (NP:  $3.9 \pm 0.4$  vs LP:  $4.4 \pm 0.4$ )

and resting (NP:  $7.7 \pm 0.6$  vs LP:  $5.8 \pm 1.2$ ) (**Figure 1B**). However, when those animals were stimulated with ADP, the low-protein animals were not able to increase their  $O_2$  consumption as the same as the NP group (NP:  $3.9 \pm 0.4$  to  $28.9 \pm 1.9$  and LP:  $4.4 \pm 0.4$  to  $17.2 \pm 1.0$ ,  $p < 0.01$ ). The lower  $O_2$  consumption in F2 LP animals was also verified in the uncoupling situation ( $27.2 \pm 1.2$  vs  $16.2 \pm 1.5$ ,  $p < 0.01$ ) (**Figure 1 B**). The large difference between  $O_2$  consumption in ADP-stimulated condition was followed by a decrease in the respiratory control ratio in the F2 LP animals, leading, therefore, to the reduction in the RCR ( $8.6 \pm 0.9$  vs  $3.5 \pm 0.2$ ,  $p < 0.05$ ) (**Figure 1b**).

In animals that were not re-exposed to nutritional insult (F2 labina), differences were found between groups in the basal ( $9.3 \pm 1.1$  vs  $24.9 \pm 1.9$ ,  $p < 0.05$ ), but not in ADP-Stimulation ( $40.9 \pm 4.7$  vs  $56.2 \pm 5.8$ ) and Resting states ( $6.3 \pm 0.5$  vs  $5.3 \pm 0.4$ ) (**Figure 1C**). The RCR, otherwise, showed to be decreased in the animals that had their grandparents exposed to protein restriction ( $6.0 \pm 1.2$  vs  $3.2 \pm 0.3$ ,  $p < 0.05$ ) (**Figure 1c**).

## ROS production

It seems that protein restriction does not modulate mitochondria function of young female rats in the 1<sup>st</sup> generation. Our data showed that ROS production (NP:  $2.8 \pm 0.31$  vs LP:  $2.3 \pm 0.4$ ) (**Figure 2A**) was not modulated by maternal protein restriction in F1. At the 2<sup>nd</sup> generation (F2), the re-exposure to the nutritional insult enhanced the mitochondrial parameters evaluated by increased the ROS production (NP:  $9.8 \pm 1.7$  vs LP:  $42.0 \pm 7.1$ ,  $p < 0.01$ ) (**Figure 2B**).

When F2 animals were not re-exposed to protein restriction, received laboratory chow instead of casein 8%, the mitochondrial parameters were likely

modulated in the female rats. The ROS production was markedly decreased in LP animals (NP:  $13.3 \pm 0.8$  vs LP:  $7.7 \pm 1.5$ ,  $p < 0.01$ ) (**Figure 2C**).

### **Biomarkers of oxidative damage**

As oxidative biomarkers, we evaluated indicatives of lipid and protein oxidation into brainstem of female pups that had their parents insulted, or not, by a protein restriction during gestational and lactation period. Whilst the oxidation of proteins has been decreased only without re-exposed F2 (NP:  $100.0 \pm 12.2$  vs  $58.7 \pm 6.7$ ; Carbonyl content relative to control,  $p < 0.05$ ) and not in F1 (NP:  $100.0 \pm 9.7$  vs  $107.8 \pm 13.1$ ; Carbonyl content relative to control) and in re-exposed F2 (NP:  $100.0 \pm 9.1$  vs  $73.4 \pm 9.5$ ; Carbonyl content relative to control) (**Figure 3B, D and F**), the lipid oxidation was fading through generations. In the first generation, LP animals had a markedly increase in lipid oxidation, over 200%, (NP:  $100.0 \pm 3.1$  vs  $321.8 \pm 22.2$ ; MDA levels relative to control,  $p < 0.01$ ) (**Figure 3A**). In the second generation, although less expressive, the animals re-exposed to nutritional insult still had higher levels of lipid peroxidation than NP group. (NP:  $100.0 \pm 13.8$  vs LP:  $173.7 \pm 20.9$ ; MDA levels relative to control,  $p < 0.05$ ) (**Figure 3C**), while the LP animals without re-exposure showed similar results of the NP (NP:  $100.0 \pm 21.9$  vs LP:  $82.5 \pm 6.3$ ; MDA levels relative to control) (**Figure 3E**).

### **Antioxidant Enzymatic System**

When the antioxidant enzymatic system was evaluated in the female brainstems, we observed an increase only in GST activity at F1 and F2 group. Additional to a decrease in SOD activity at F2-Labina (**Figure 4**).

### **Non-enzymatic System**

The non-enzymatic system involves basically vitamins and intracellular thiols, which is mainly represented by glutathione reduced (GSH). In this context, we evaluated the GSH levels, its oxidized form (GSSG) and the ratio between them (GSH/GSSG). Although the GSH levels had not changed throughout the study (**Figure 5 A, D and G**), the increase in glutathione oxidized in the first generation led to a decrease (56%,  $p < 0.01$ ) in the redox state (**Figures 5B and 5C**). On the other hand, LP animals that were not re-exposed to the protein restriction, had its redox state augmented (**Figure 5I**) by decreasing the GSSG levels (55.6%,  $p < 0.05$ ) (**Figure 5H**).

## Discussion

Various factors are relevant to growth and brain function and the nutrition if inadequate is one of the principal non-genetic factors that can affect the brain development in early life (MORGANE, MOKLER *et al.*, 2002; PRADO E DEWEY, 2014). Previous experiments model it has demonstrated that nutritional insults are associated with impaired in various areas of brain development and dysfunction mitochondrial, which may relates to increased production of reactive of oxygen species (FEOLI, A. M., SIQUEIRA, I. R. *et al.*, 2006; TATLI *et al.*, 2007; FERREIRA, D. S., LIU *et al.*, 2015). In the present study, we evaluate whether a protein restriction in the period pre and pos natal it is able to induced mitochondrial alterations that can is associated with increased ROS and oxidative imbalance from brainstem juveniles females rats.

Studies has shown that mitochondrial deficiency and oxidative stress although they are not the only factor are one of the most important behind the etiology of neurodegenerative diseases as Parkinson's disease, Alzheimer's and amyotrophic

lateral sclerosis (HATTORI, 2004; REALE *et al.*, 2012; TROULINAKI E BANO, 2012; SACCON *et al.*, 2013; EHINGER *et al.*, 2015; INDO *et al.*, 2015; REQUEJO-AGUILAR E BOLANOS, 2016), which seems associated energy demand and oxidative metabolism in the brain, activity of antioxidant system and respiration capacity mitochondrial (HAYLETT *et al.*, 2016; PAHRUDIN ARROZI *et al.*, 2016) and increased ROS production in the brain as consequence of redox imbalance (CHINTA E ANDERSEN, 2008).

In the study, we investigated if the brainstem of females animals that receiving diet poor in protein during the gestation and lactation has increased production of ROS for more generation. We verified increase in ROS production only in animals re-exposed to the insult (**Figure 2**). Feoli *et al.*, (2006), studying brain areas (cerebellum, cortex and hippocampus) of rats to 60 days age that receiving diet poor in protein (7% of casein), not found increased levels of ROS in animals experimental, in any region studied, associated with no difference in the system enzymatic that is responsible for combating high levels of ROS (activity of enzyme superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase) (FEOLI, A. M., SIQUEIRA, I. R. *et al.*, 2006).

Studies show that due to the oxidative metabolism of the brain is very vulnerable to injury due to increased levels of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS), which is associated with oxidative stress (ZANZINGER, 2002; HALLIWELL, B., 2006). Our results showed increased lipid peroxidation in the brainstem of females in both the first generation and the second generation (re-exposed a dietary restriction). Previous results of our laboratory showed, using the same dietary model, increase in malondialdehyde MDA levels in the brainstem of male rats with 100 days of age (FERREIRA, D. S., LIU *et al.*, 2015). The increase in the production of ROS this region should be associated with the damage in lipid

membranes, as in models with increased ROS level as showed by Nishihara *et al.*, (2012) using the model spontaneous hypertensive rats found high (MDA) levels in rostral ventrolateral medulla (RVLM), the region most important in the modulation of sympathetic activity and blood pressure control (NISHIHARA, HIROOKA *et al.*, 2012).

On the enzymatic antioxidant system, our findings show a decreased in the superoxide dismutase activity in the group of animals without re-exposure to protein restriction. Our result corroborates with the work that found a great decrease in SOD activity studying the hippocampus and cerebellum of male rats at 21 days, that suffered protein restriction (8% casein) comparing with normal diet (BONATTO, POLYDORO *et al.*, 2005; BONATTO, POLYDORO *et al.*, 2006). In an experimental model similar to our, showed decrease of SOD in the brainstem of rats males at 100 days (FERREIRA, D. S., LIU *et al.*, 2015). Studying cortex and cerebellum of rats that suffered protein restriction on postnatal period up to 60 days, Tatli *et al.*, (2007) found decrease in the activity of SOD (TATLI, GUZEL *et al.*, 2007). Genetic factors may be associated to SOD decrease, as verified by Partadiredja *et al.*, (2005) that showed a deficit in the expression of Cu/Zn-SOD in cerebellum of malnourished mice (PARTADIREDDJA, SIMPSON *et al.*, 2005). However, the decrease in SOD activity in the group that was not re-exposed the diet is consistent with the decrease in the production of ROS found in the same group of animals.

We found no difference in catalase activity, contradicting other studies that observed decrease in the activity of this enzyme, which can be explained by the analyzed region, the gender of the animals and the experimental model used (BONATTO, POLYDORO *et al.*, 2006; FEOLI, A. M., SIQUEIRA, I. R. *et al.*, 2006; TATLI, GUZEL *et al.*, 2007). The activity of glutathione transferase enzyme (GST) was increased in the brainstem of first and second generations only of female rats.

Studies previous of our laboratory studying males to 100 days of life both in heart (NASCIMENTO, FREITAS *et al.*, 2014) and brainstem (FERREIRA, D. S., LIU *et al.*, 2015) showed decreased in the activity of GST compared to the control group. The GST it plays an important role in neuroprotection against oxidative stress in models of neurodegenerative diseases (SMEYNE E SMEYNE, 2013; MAZZETTI *et al.*, 2015).

When evaluating the non-enzymatic antioxidant system we found no difference in the levels of GSH in the first and second generations of animals that have been exposed and re-exposed to perinatal protein restriction. However, the oxidized glutathione (GSSG) levels were increased in the brainstem of females exposed and re-exposed to low protein diet compared to control and decreased in the group without re-exposure. The redox state (GSH/GSSG) decreased in animals exposed to low-protein diet and increased in the not re-exposed animals.

Glutathione is a major endogenous antioxidant, a ubiquitous thiol tripeptide that is synthesized using, glutamate, cysteine, and glycine, provides protection from oxidative stress-induced damage through the reduction of ROS. GSH acts alone or in concert with other enzymes to reduce superoxide radicals, hydroxyl radicals, and peroxynitrites (DRINGEN, 2000; DRINGEN *et al.*, 2000). In the system nervous (SN), the levels of GSH is an important mediator of oxidative stress and when oxidized becomes glutathione disulfide or oxidized (GSSG) which it is also an important marker of brain injury or oxidative stress (GU *et al.*, 2015).

Analyzing heart of adult male that were submitted to a diet poor in protein during the gestation and lactation was found a decrease in the redox state and increase in GSSG levels (NASCIMENTO, FREITAS *et al.*, 2014). Using the same

experimental model Ferreira *et al.*, (2015), showed a reduction of the redox state in the brainstem of male rats at 100 days (FERREIRA, D. S., LIU *et al.*, 2015).

Taken together, our results show that the group of females who were not exposed to restriction protein are less vulnerable to oxidative stress. Although insults in early life can affect mitochondrial function, studies have demonstrated that sub-lethal doses of several insults (i.e. ischemia-reperfusion, hypoxia, caloric restriction), could trigger several signaling cascade that confer protection against the lethal dose of the insult (DIRNAGL *et al.*, 2003; MERGENTHALER E DIRNAGL, 2011). Studies have focused on understanding the role of mitochondria in cerebral preconditioning (DAVE *et al.*, 2001; RAVATI *et al.*, 2001; LONG *et al.*, 2002; DIRNAGL E MEISEL, 2008).

Our data suggest that a restriction of protein during the pregnancy and lactation it is able to induce changes in mitochondrial respiration for more than one generation in brainstem of female juvenis. Diet changes the oxygen consumption and we believe that it is associated with increased lipid peroxidation and changes in non-enzymatic antioxidant enzyme system and the redox states in brainstem of females for more than a generation even though there is preconditioning in females who have not suffered the re-exposure.

However, other studies should be conducted to better understand other antioxidant factors, enzymatic and non-enzymatic, that can explain the possible changes behind some diseases involved with mitochondrial dysfunction and inadequate nutrition.

# FIGURES

Figure 1

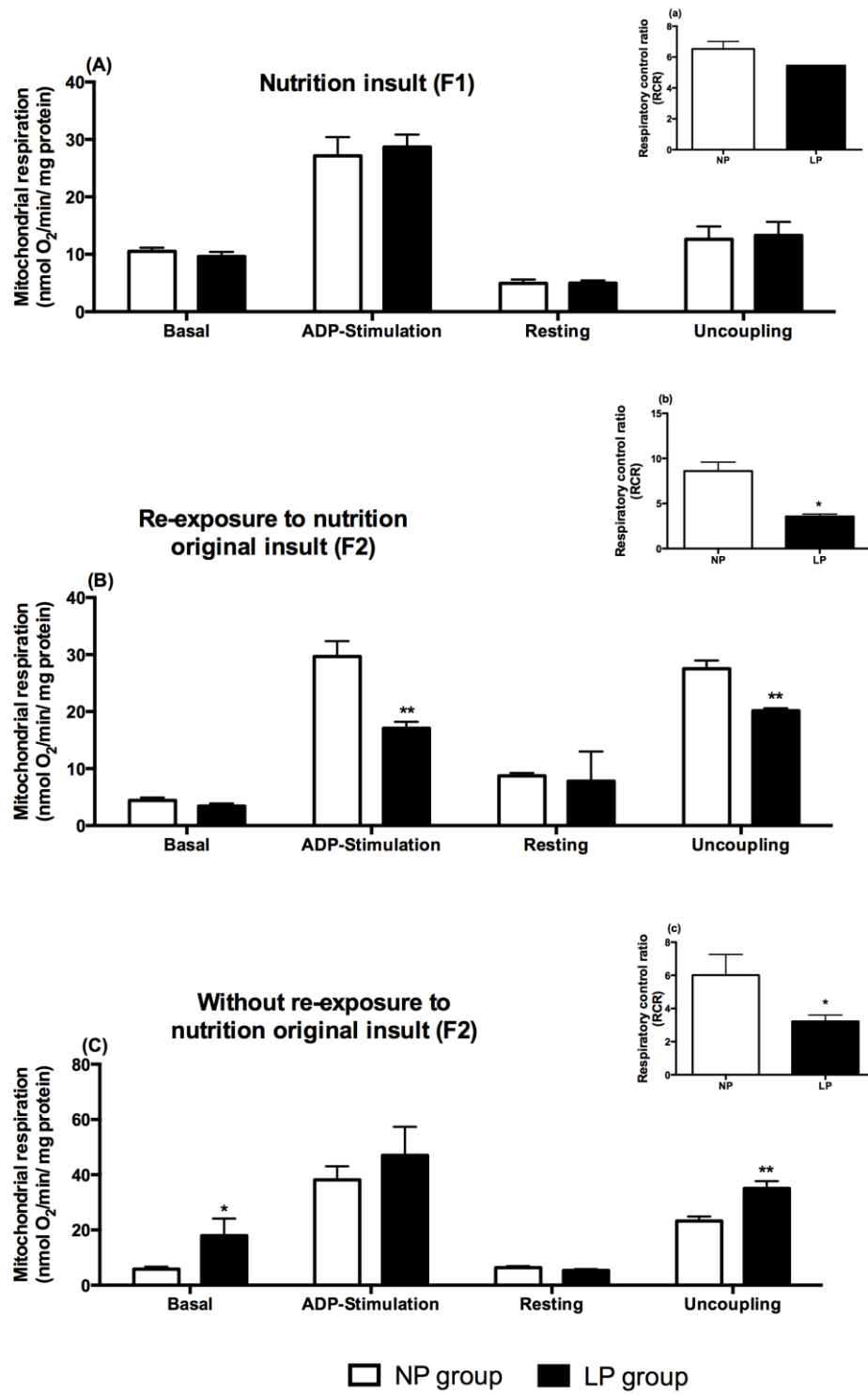
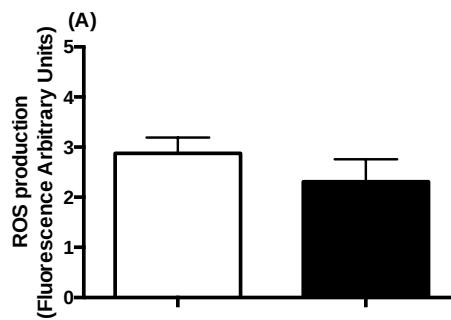
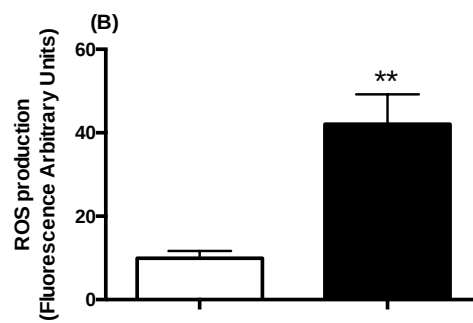
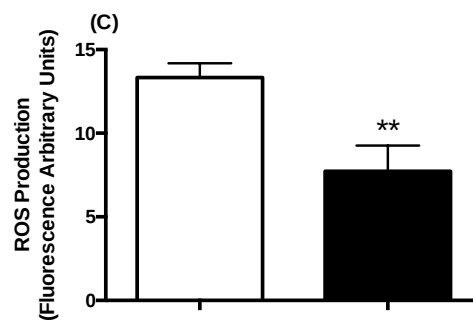


Figure 2

**Nutrition insult (F1)****Re-exposure to nutrition original insult (F2)****Without re-exposure to nutrition original insult (F2)**

□ NP group    ■ LP group

Figure 3

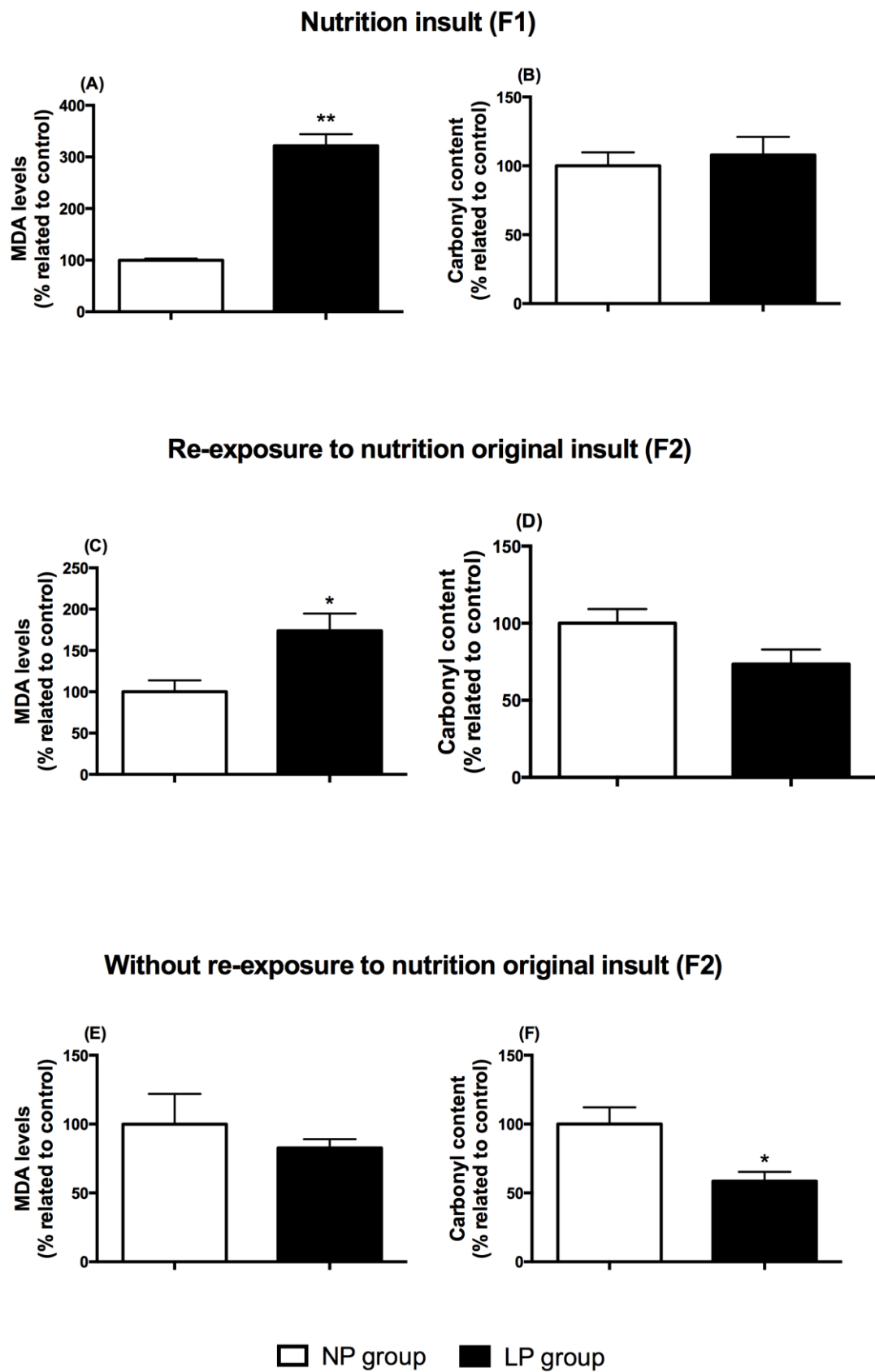


Figure 4

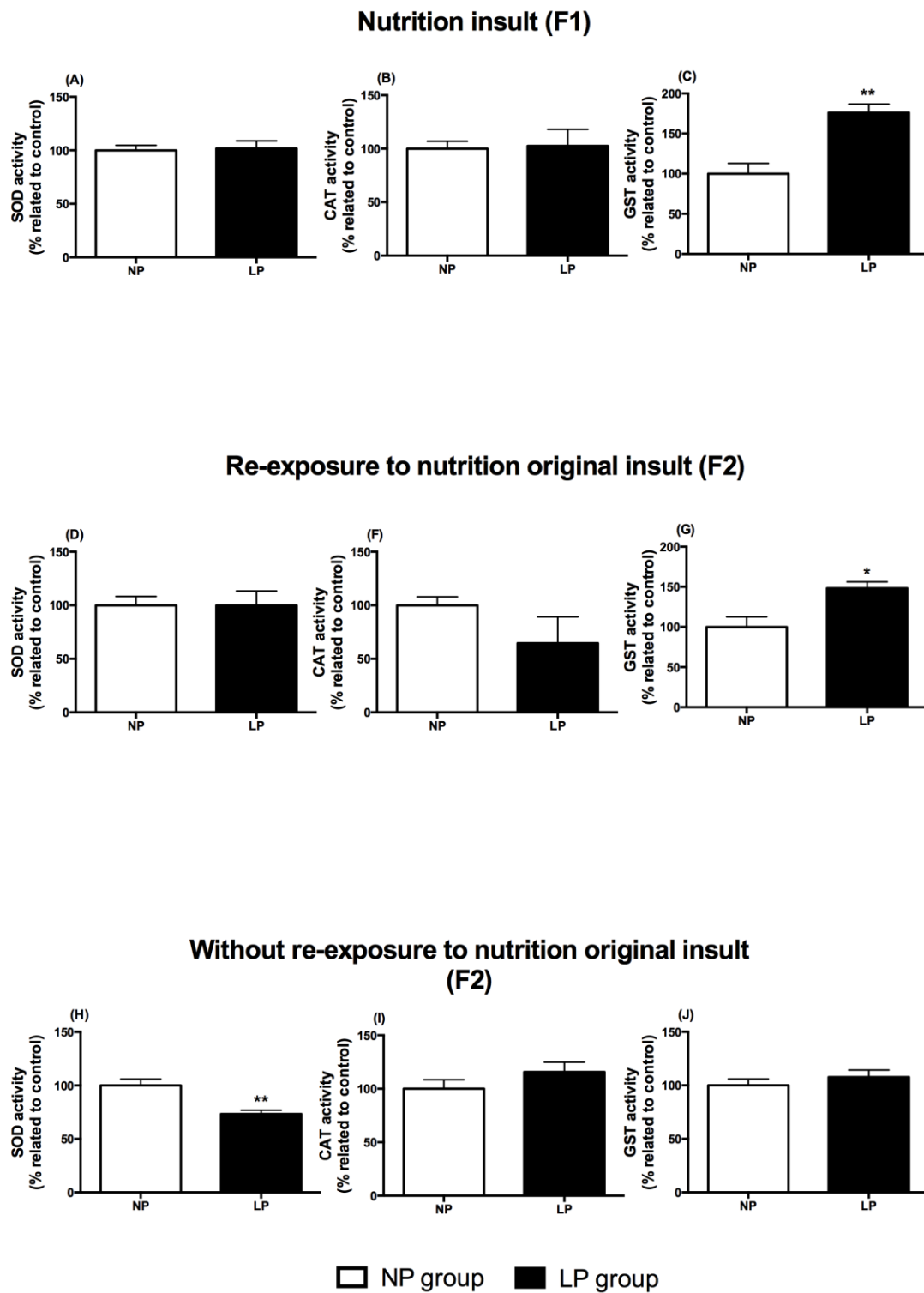
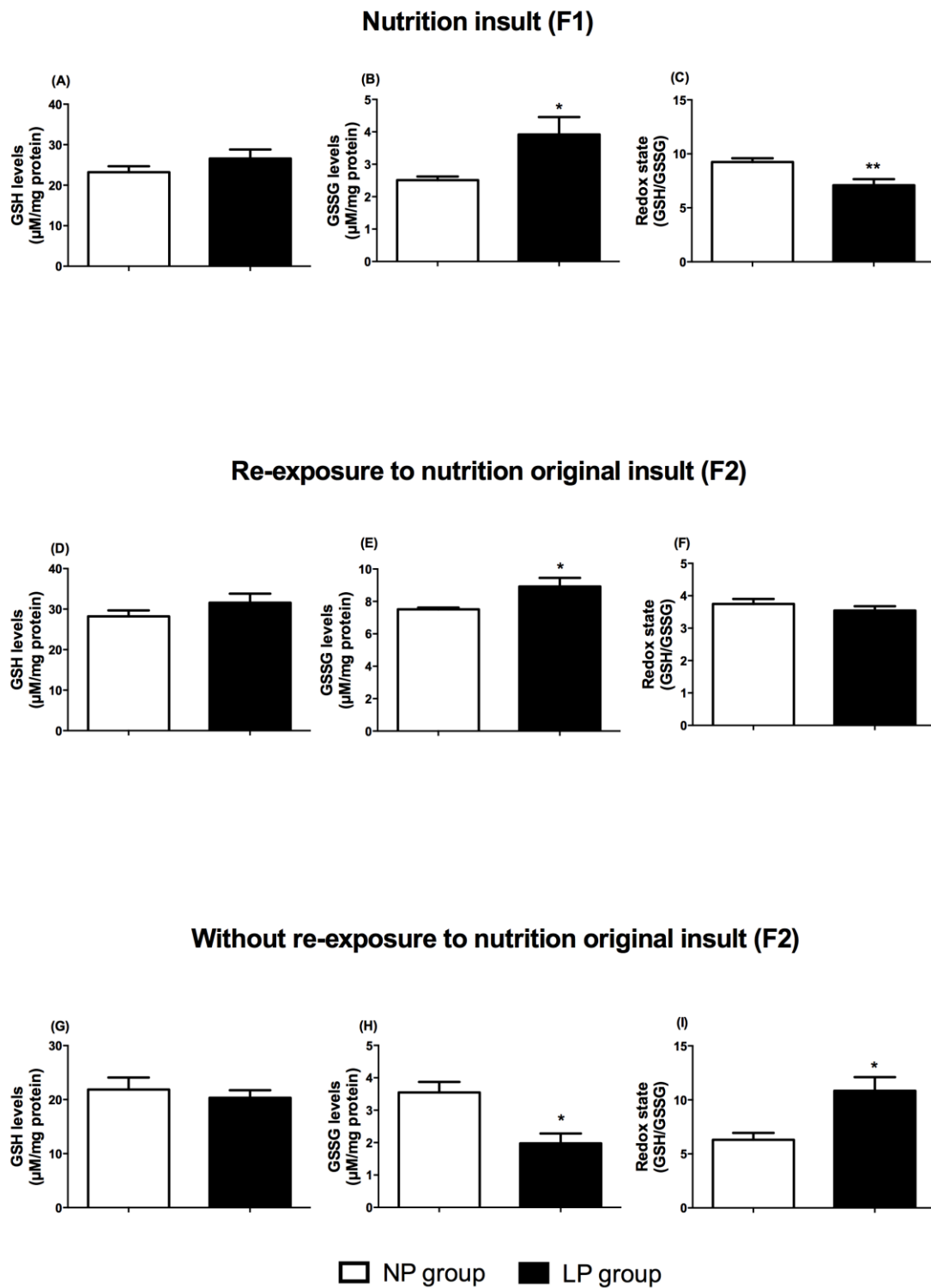


Figure 5



## Figure Legends

**Figure 1.** Mitochondrial oxygen consumption in brainstem from 30 day-old females rats that received a low-protein diet throughout perinatal period. (A) First generation (F1), (B) second generation F2 (with re-exposed to the nutritional insult) and (C) F2 (without re-exposed to the insult). White bars represent normo-protein group (NP) and black bars represent low-protein group (LP) (n = 6–10 rats per group). Values are means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  is the difference between diet.

**Figure 2.** The production of reactive oxygen (ROS) species from 30 day-old females rats that received a low-protein diet throughout perinatal period. (A) Production of ROS in F1; (B) Production of ROS in F2 (with re-exposed to the nutritional insult); (C) Production of ROS in F2 (without re-exposed to the nutritional insult). White bars represent normo-protein group (NP) and black bars represent low-protein group (LP) (n = 6–10 rats per group). Values are means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  is the difference between diet.

**Figure 3.** Biomarkers of oxidative stress from 30 day-old females rats that received a low-protein diet throughout perinatal period. (A) Levels of lipid peroxidation and (B) protein oxidation in F1. (C) Levels of lipid peroxidation and (D) protein oxidation in F2 (with re-exposed to the nutritional insult). (E) Levels of lipid peroxidation and (F) protein oxidation in F2 (without re-exposed to the nutritional insult). White bars represent normo-protein group (NP) and black bars represent low-protein group (LP) (n = 6–10 rats per group). Values are means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  is the difference between diet.

**Figure 4.** Effects of perinatal low-protein diet on enzymatic antioxidant activities from 30 day-old females rats that received a low-protein diet throughout perinatal period.

(A) Superoxide dismutase (SOD), (B) Catalase (CAT), (C) glutathione-S-transferase (GST) in brainstem from female at 30 days of life in F1. (D) SOD, (E) CAT and (F) GST in F2 (re-exposed to the nutritional insult) and (G) SOD, (H) CAT and (I) GST in F2 (without re-exposed to the nutritional insult). White bars represent normo-protein group (NP) and black bars represent low-protein group (LP) (n = 6–10 rats per group). Values are means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  is the difference between diet.

**Figure 5.** Effects of maternal low-protein diet on redox state from 30 day-old females rats that received a low-protein diet throughout perinatal period. (A) redox state in F1, (B) redox state in F2 (with re-exposed to the nutritional insult) and (C) in F2 (without re-exposed to the nutritional insult). White bars represent normo-protein group (NP) and black bars represent low-protein group (LP) (n = 6–10 rats per group). Values are means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  is the difference between diet.

## References

- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, **105**, 121-126.
- Aksenov, M.Y., Aksenova, M.V., Butterfield, D.A., Geddes, J.W. & Markesbery, W.R. (2001) Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, **103**, 373-383.
- Aye, M.T., Palmer, D.S., Giulivi, A. & Hashemi, S. (1995) Effect of filtration of platelet concentrates on the accumulation of cytokines and platelet release factors during storage. *Transfusion*, **35**, 117-124.
- Barros, M.A., De Brito Alves, J.L., Nogueira, V.O., Wanderley, A.G. & Costa-Silva, J.H. (2015) Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, **25**, 123-130.
- Bonatto, F., Polydoro, M., Andrades, M.E., Conte da Frota, M.L., Jr., Dal-Pizzol, F., Rotta, L.N., Souza, D.O., Perry, M.L. & Fonseca Moreira, J.C. (2006) Effects of maternal protein malnutrition on oxidative markers in the young rat cortex and cerebellum. *Neurosci Lett*, **406**, 281-284.
- Bonatto, F., Polydoro, M., Andrades, M.E., da Frota Junior, M.L., Dal-Pizzol, F., Rotta, L.N., Souza, D.O., Perry, M.L. & Moreira, J.C. (2005) Effect of protein malnutrition on redox state of the hippocampus of rat. *Brain Res*, **1042**, 17-22.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Buege, J.A. & Aust, S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, **52**, 302-310.
- Chan, S.H. & Chan, J.Y. (2013a) Angiotensin-generated reactive oxygen species in brain and pathogenesis of cardiovascular diseases. *Antioxid Redox Signal*, **19**, 1074-1084.
- Chan, S.H. & Chan, J.Y. (2013b) Brain Stem NOS and ROS in Neural Mechanisms of Hypertension. *Antioxid Redox Signal*.
- Chinta, S.J. & Andersen, J.K. (2008) Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*, **1780**, 1362-1367.
- Dave, K.R., Saul, I., Busto, R., Ginsberg, M.D., Sick, T.J. & Perez-Pinzon, M.A. (2001) Ischemic preconditioning preserves mitochondrial function after global cerebral ischemia in rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab*, **21**, 1401-1410.

- de Brito Alves, J.L., Nogueira, V.O., de Oliveira, G.B., da Silva, G.S., Wanderley, A.G., Leandro, C.G. & Costa-Silva, J.H. (2014) Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. *Br J Nutr*, **111**, 606-615.
- Dirnagl, U. & Meisel, A. (2008) Endogenous neuroprotection: mitochondria as gateways to cerebral preconditioning? *Neuropharmacology*, **55**, 334-344.
- Dirnagl, U., Simon, R.P. & Hallenbeck, J.M. (2003) Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci*, **26**, 248-254.
- Dringen, R. (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in neurobiology*, **62**, 649-671.
- Dringen, R., Gutterer, J.M. & Hirrlinger, J. (2000) Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem*, **267**, 4912-4916.
- Dutra-Tavares, A.C., Manhaes, A.C., Silva, J.O., Nunes-Freitas, A.L., Conceicao, E.P., Moura, E.G., Lisboa, P.C., Filgueiras, C.C., Abreu-Villaca, Y. & Ribeiro-Carvalho, A. (2015) Locomotor response to acute nicotine in adolescent mice is altered by maternal undernutrition during lactation. *Int J Dev Neurosci*, **47**, 278-285.
- Ehinger, J.K., Morota, S., Hansson, M.J., Paul, G. & Elmer, E. (2015) Mitochondrial dysfunction in blood cells from amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurol*, **262**, 1493-1503.
- Escobales, N. & Crespo, M.J. (2005) Oxidative-nitrosative stress in hypertension. *Curr Vasc Pharmacol*, **3**, 231-246.
- Esler, M. (2010) The 2009 Carl Ludwig Lecture: Pathophysiology of the human sympathetic nervous system in cardiovascular diseases: the transition from mechanisms to medical management. *J Appl Physiol (1985)*, **108**, 227-237.
- Feldkamp, T., Kribben, A., Roeser, N.F., Ostrowski, T. & Weinberg, J.M. (2007) Alleviation of fatty acid and hypoxia-reoxygenation-induced proximal tubule deenergization by ADP/ATP carrier inhibition and glutamate. *Am J Physiol Renal Physiol*, **292**, F1606-1616.
- Feoli, A.M., Leite, M.C., Tramontina, A.C., Tramontina, F., Posser, T., Rodrigues, L., Swarowsky, A., Quincozes-Santos, A., Leal, R.B., Gottfried, C., Perry, M.L. & Goncalves, C.A. (2008) Developmental changes in content of glial marker proteins in rats exposed to protein malnutrition. *Brain Res*, **1187**, 33-41.
- Feoli, A.M., Siqueira, I., Almeida, L.M., Tramontina, A.C., Battu, C., Wofchuk, S.T., Gottfried, C., Perry, M.L. & Goncalves, C.A. (2006a) Brain glutathione content

and glutamate uptake are reduced in rats exposed to pre- and postnatal protein malnutrition. *J Nutr*, **136**, 2357-2361.

- Feoli, A.M., Siqueira, I.R., Almeida, L., Tramontina, A.C., Vanzella, C., Sbaraini, S., Schweigert, I.D., Netto, C.A., Perry, M.L. & Goncalves, C.A. (2006b) Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. *Nutrition*, **22**, 160-165.
- 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. (2016) Mitochondrial bioenergetics and oxidative status disruption in brainstem of weaned rats: Immediate response to maternal protein restriction. *Brain Res*.
- Ferreira, D.S., Liu, Y., Fernandes, M.P. & Lagranha, C.J. (2015) Perinatal low-protein diet alters brainstem antioxidant metabolism in adult offspring. *Nutr Neurosci*.
- Giulivi, C., Boveris, A. & Cadenas, E. (1995) Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys*, **316**, 909-916.
- Godfrey, K.M. (2002) The role of the placenta in fetal programming-a review. *Placenta*, **23 Suppl A**, S20-27.
- Gressens, P., Muaku, S.M., Besse, L., Nsegbe, E., Gallego, J., Delpech, B., Gaultier, C., Evrard, P., Ketelslegers, J.M. & Maiter, D. (1997) Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. *Brain Res Dev Brain Res*, **103**, 21-35.
- Grotto, D., Santa Maria, L.D., Boeira, S., Valentini, J., Charao, M.F., Moro, A.M., Nascimento, P.C., Pomblum, V.J. & Garcia, S.C. (2007) Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J Pharm Biomed Anal*, **43**, 619-624.
- Gu, F., Chauhan, V. & Chauhan, A. (2015) Glutathione redox imbalance in brain disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **18**, 89-95.
- Guyenet, P.G. (2006) The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci*, **7**, 335-346.
- Guyenet, P.G., Stornetta, R.L. & Bayliss, D.A. (2010) Central respiratory chemoreception. *J Comp Neurol*, **518**, 3883-3906.
- Habig, W.H. & Jakoby, W.B. (1981) Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol*, **77**, 218-231.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. & Jakoby, W.B. (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, **249**, 7130-7139.

- Halliwell, B. (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*, **97**, 1634-1658.
- Hanafi, M.Y., Saleh, M.M., Saad, M.I., Abdelkhalek, T.M. & Kamel, M.A. (2016) Transgenerational effects of obesity and malnourishment on diabetes risk in F2 generation. *Mol Cell Biochem*, **412**, 269-280.
- Hattori, N. (2004) [Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease: from mitochondrial dysfunctions to familial Parkinson's disease]. *Rinsho Shinkeigaku*, **44**, 241-262.
- Haylett, W., Swart, C., van der Westhuizen, F., van Dyk, H., van der Merwe, L., van der Merwe, C., Loos, B., Carr, J., Kinneer, C. & Bardien, S. (2016) Altered Mitochondrial Respiration and Other Features of Mitochondrial Function in Parkin-Mutant Fibroblasts from Parkinson's Disease Patients. *Parkinsons Dis*, **2016**, 1819209.
- Heard, E. & Martienssen, R.A. (2014) Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell*, **157**, 95-109.
- Hissin, P.J. & Hilf, R. (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*, **74**, 214-226.
- Ide, T., Tsutsui, H., Hayashidani, S., Kang, D., Suematsu, N., Nakamura, K., Utsumi, H., Hamasaki, N. & Takeshita, A. (2001) Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res*, **88**, 529-535.
- Indo, H.P., Yen, H.C., Nakanishi, I., Matsumoto, K., Tamura, M., Nagano, Y., Matsui, H., Gusev, O., Cornette, R., Okuda, T., Minamiyama, Y., Ichikawa, H., Suenaga, S., Oki, M., Sato, T., Ozawa, T., Clair, D.K. & Majima, H.J. (2015) A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *J Clin Biochem Nutr*, **56**, 1-7.
- Kumagai, H., Oshima, N., Matsuura, T., Iigaya, K., Imai, M., Onimaru, H., Sakata, K., Osaka, M., Onami, T., Takimoto, C., Kamayachi, T., Itoh, H. & Saruta, T. (2012) Importance of rostral ventrolateral medulla neurons in determining efferent sympathetic nerve activity and blood pressure. *Hypertens Res*, **35**, 132-141.
- Lagranha, C.J., Deschamps, A., Aponte, A., Steenbergen, C. & Murphy, E. (2010) Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. *Circ Res*, **106**, 1681-1691.
- Lillicrop, K.A., Phillips, E.S., Jackson, A.A., Hanson, M.A. & Burdge, G.C. (2005) Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid

- supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr*, **135**, 1382-1386.
- Long, P., Nguyen, Q., Thurow, C. & Broderick, T.L. (2002) Caloric restriction restores the cardioprotective effect of preconditioning in the rat heart. *Mech Ageing Dev*, **123**, 1411-1413.
- Marina, N., Ang, R., Machhada, A., Kasymov, V., Karagiannis, A., Hosford, P.S., Mosienko, V., Teschemacher, A.G., Vihko, P., Paton, J.F., Kasparov, S. & Gourine, A.V. (2015) Brainstem hypoxia contributes to the development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, **65**, 775-783.
- Mazzetti, A.P., Fiorile, M.C., Primavera, A. & Lo Bello, M. (2015) Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. *Neurochem Int*, **82**, 10-18.
- Mergenthaler, P. & Dirnagl, U. (2011) Protective conditioning of the brain: expressway or roadblock? *J Physiol*, **589**, 4147-4155.
- Misra, H.P. & Fridovich, I. (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, **247**, 3170-3175.
- Morgane, P.J., Mokler, D.J. & Galler, J.R. (2002) Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev*, **26**, 471-483.
- Nascimento, L., Freitas, C.M., Silva-Filho, R., Leite, A.C., Silva, A.B., da Silva, A.I., Ferreira, D.S., Pedroza, A.A., Maia, M.B., Fernandes, M.P. & Lagranha, C. (2014) The effect of maternal low-protein diet on the heart of adult offspring: role of mitochondria and oxidative stress. *Appl Physiol Nutr Metab*, **39**, 880-887.
- Nayak, P. & Chatterjee, A.K. (2003) Dietary protein restriction causes modification in aluminum-induced alteration in glutamate and GABA system of rat brain. *BMC Neurosci*, **4**, 4.
- Nishihara, M., Hirooka, Y., Matsukawa, R., Kishi, T. & Sunagawa, K. (2012) Oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla modulates excitatory and inhibitory inputs in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, **30**, 97-106.
- Pahrudin Arrozi, A., Wan Ngah, W.Z., Mohd Yusof, Y.A., Damanhuri, H. & Makpol, S. (2016) Antioxidant modulation in restoring mitochondrial function in neurodegeneration. *Int J Neurosci*, 1-43.
- Pandey, K.B. & Rizvi, S.I. (2010) Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxid Med Cell Longev*, **3**, 2-12.

- Partadiredja, G., Simpson, R. & Bedi, K.S. (2005) The effects of pre-weaning undernutrition on the expression levels of free radical deactivating enzymes in the mouse brain. *Nutr Neurosci*, **8**, 183-193.
- Peterson, J.R., Sharma, R.V. & Davisson, R.L. (2006) Reactive oxygen species in the neuropathogenesis of hypertension. *Curr Hypertens Rep*, **8**, 232-241.
- Prado, E.L. & Dewey, K.G. (2014) Nutrition and brain development in early life. *Nutr Rev*, **72**, 267-284.
- Ravati, A., Ahlemeyer, B., Becker, A., Klumpp, S. & Krieglstein, J. (2001) Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species and activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *J Neurochem*, **78**, 909-919.
- Reale, M., Pesce, M., Priyadarshini, M., Kamal, M.A. & Patruno, A. (2012) Mitochondria as an easy target to oxidative stress events in Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, **11**, 430-438.
- Requejo-Aguilar, R. & Bolanos, J.P. (2016) Mitochondrial control of cell bioenergetics in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*.
- Reznick, A.Z. & Packer, L. (1994) Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*, **233**, 357-363.
- Saccon, R.A., Bunton-Stasyshyn, R.K., Fisher, E.M. & Fratta, P. (2013) Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? *Brain*, **136**, 2342-2358.
- Singh, T.D. & Shankar, R. (1999) Developmental regulation and effect of early undernutrition on phosphorylation of rat cortical synaptic membrane proteins. *Int J Dev Neurosci*, **17**, 743-751.
- Smeyne, M. & Smeyne, R.J. (2013) Glutathione metabolism and Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*, **62**, 13-25.
- Starkov, A.A. & Fiskum, G. (2003) Regulation of brain mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *J Neurochem*, **86**, 1101-1107.
- Tatli, M., Guzel, A., Kizil, G., Kavak, V., Yavuz, M. & Kizil, M. (2007) Comparison of the effects of maternal protein malnutrition and intrauterine growth restriction on redox state of central nervous system in offspring rats. *Brain Res*, **1156**, 21-30.
- Troulinaki, K. & Bano, D. (2012) Mitochondrial deficiency: a double-edged sword for aging and neurodegeneration. *Front Genet*, **3**, 244.

- Wang, G., Anrather, J., Huang, J., Speth, R.C., Pickel, V.M. & Iadecola, C. (2004) NADPH oxidase contributes to angiotensin II signaling in the nucleus tractus solitarius. *J Neuroscience*, **24**, 5516-5524.
- Zambrano, E., Martinez-Samayoa, P.M., Bautista, C.J., Deas, M., Guillen, L., Rodriguez-Gonzalez, G.L., Guzman, C., Larrea, F. & Nathanielsz, P.W. (2005) Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol*, **566**, 225-236.
- Zanzinger, J. (2002) Mechanisms of action of nitric oxide in the brain stem: role of oxidative stress. *Auton Neurosci*, **98**, 24-27.

### *6.2 Undernutrition affects brainstem's mitochondria through generation?*

Esses resultados correspondem aos efeitos de uma restrição proteica materna no período crítico do desenvolvimento em tronco encefálico de ratos machos juvenis na primeira geração e com reexposição ou não ao insulto nutricional na segunda geração.

**Artigo 2** – Artigo a ser submetido na Revista Nutritional Research

**Fator de Impacto:** 2.5

**Qualis:** B1 (Medicina II)

## **Undernutrition affects brainstem's mitochondria through generation?**

David Filipe Santana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry, Federal University of Pernambuco-CAV, Vitoria de Santo Antao, Pernambuco, Brazil.

Running Title: Transgeneration effects in the mitochondria

### **#Mailing address:**

Claudia Jacques Lagranha

Rua Alto do Reservatório, s/n – CEP: 55608-680 – Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte – Bela Vista – Vitória de Santo Antão, PE – Brasil.

Fone/Fax: (00 55 81) 35233351 **E-mail:** [lagranha@hotmail.com](mailto:lagranha@hotmail.com)

The authors declare that has none conflict of interest.

## Abstract

Previous observations have shown that diet poor in protein during development induces the mitochondrial dysfunction in brainstem. However, little is known about the effects of maternal protein restriction on mitochondrial function for more than one generation in brainstem from male rats. Therefore, the present study aims to evaluate the effect of maternal protein restriction on mitochondrial function in brainstem of male rats for two generations. Wistar offspring were divided into experimental groups according to mothers' diets: control (NP, 17 % of protein) and low-protein (LP, 8 % of protein) groups in the first (F1), control and low-protein groups in the second (F2) and control and low-protein groups that received diet commercial chow (Labina, Purina) in second generation (F2 Labina). After weaning all groups received commercial chow until sacrifice at the 30<sup>th</sup> day in F1 and F2. It was found an increase in Reactive Oxygen Species-ROS production in LP-group in F1, and decrease in mitochondrial oxygen consumption and Respiratory Control-RCR. In F2, the state 2 of mitochondrial consumption increased 47% and the state 3 decreased 42% in LP-group, RCR was decreased 54% in addition to increase in ROS production 100% in LP-group. In F2-Labina the state 4 of mitochondrial consumption increased 350% and 100% in the uncoupling. It was found an increase in lipid peroxidation (73%) and oxidation of protein (90%) in LP-group in F1 alone. Related to enzymatic defense system we observe a decrease in the catalase activity in F1 (39%) and F2 (38%) while, glutathione-s-transferase (GST) decreased only in F1 (51%). The levels of glutathione oxidized (GSSG) increased in LP-group in F1 (45%) and F2 (15%) and decreased (36%) in LP-group F2 Labina. The redox state (GSH/GSSG) was found decreased in LP-group in F1 (25%) while in F2 Labina we observe an increase (47%). Our findings confirm that maternal protein restriction during development induces mitochondrial dysfunction leading to oxidative damage in brainstem in first generation and in the second generation. The animal may be more susceptibility dependent up whether they receive an additional insult, otherwise the animals will not show mitochondrial dysfunction neither alteration in oxidative status in brainstem, leading to a decrease in the risk to develop neurological diseases.

**Key Words:** Mitochondrial; Transgenerational effects; Maternal low-protein diet; Brainstem; Male.

## Introduction

Epidemiological studies have shown that along with obesity, *diabetes mellitus* and metabolic syndrome, hypertension is an important public health problem in word ((WHO, 2014)). The hypertension it is one of the major risk factors to development of cardiovascular disease (CVD) such as stroke and heart failure ((KOKUBO E IWASHIMA, 2015; WRITING GROUP *et al.*, 2016)). The World Health Organization (WHO) shown that cardiovascular disease as the main cause of death, with 17.5 million of which 9.4 million have hypertension as the cause of death ((WHO, 2014)).

Esler *et al.*, ((2010)) shown that more of 50% of all cases of hypertension has neurogenic origin due to an increase in sympathetic activity ((ESLER, 2010b)). These neural controls of blood pressure and cardiovascular functions are located in regions of brain as rostral ventrolateral medulla (RVLM), retro trapezoid nucleus, hypothalamus and nucleus of the solitary tract (NTS) ((ALLEN, 2002; GUYENET, 2006; GUYENET, STORNETTA, *et al.*, 2008; SPYER E GOURINE, 2009; DAMPNEY, 2016)). Studies shown that one possible factor associated to the mechanism behind to the neurogenic hypertension it is the increase in the levels of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial dysfunction and deregulation in the antioxidant system in areas of sympathetic activity responsible for the control of blood pressure ((LOPEZ-CAMPISTROUS *et al.*, 2008; CHAN E CHAN, 2013b; FRANCIS E DAVISSON, 2014; DAMPNEY, 2016)). Apparently, the increased levels of ROS play a key role in the neuropathogenesis of hypertension ((PETERSON, SHARMA *et al.*, 2006; MAJZUNOVA *et al.*, 2013)) and which can be explained, in part, by the decrease in the effectiveness of the mitochondrial respiratory complexes, leading to a disruption in the mitochondrial function ((ILOPEZ-CAMPISTROUS *et al.*, 2008)). Cardoso *et al.*, ((2006)) shown that the injection of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) into the brainstem deregulates blood pressure via sympathetic and parasympathetic activities and these responses (higher pressor response) were abolished or reduced by pre-treatment with the antioxidant agent, N-acetyl-L-cysteine-NAC, suggesting that the increase in blood pressure depend of an increases in ROS in neural controls ((MAXIMO CARDOSO, DE ALMEIDA COLOMBARI *et al.*, 2006)).

Among the nutritional insults in the embryonic period, protein restriction has several deleterious effects such as, changes in the antioxidant system, induction of oxidative stress in the brain and cardiovascular dysfunction, which can be associated

with increases in blood pressure ((OLIVEIRA, CARDOSO *et al.*, 2004; BONATTO, POLYDORO *et al.*, 2005; BONATTO, POLYDORO *et al.*, 2006; FEOLI, A. M., SIQUEIRA, I. R. *et al.*, 2006; PENITENTE, FERNANDES *et al.*, 2007)). De Brito Alves *et al.*, ((2014)) studying the offspring of rats that were submitted to the maternal protein restriction in critical period of development (gestation and lactation) observed an increase in blood pressure in adults rats ((DE BRITO ALVES, NOGUEIRA *et al.*, 2014)) and using the same experimental model Barros *et al.*, ((2015)) found increased sympathetic tone. Ferreira *et al.*, ((2016)) using the same experimental model verified in isolated mitochondria an increase in ROS production, decreased of mitochondrial membrane potential and alteration in the antioxidant system. Recently, de Brito Alves *et al.* ((DE BRITO ALVES *et al.*, 2016)) using offsprings from mothers that received a diet poor in protein during gestation and lactation period, showed that this nutritional insult induce increase in blood pressure, in addition to induction of lipid peroxidation and decrease in mRNA and activity of antioxidant enzymes.

Recent evidences shown that some environmental factors may affect not only the individual themselves in later periods, but can be transgenerational transmitted ((AIKEN E OZANNE, 2014; BALE, 2015)). Therefore, studies show that in case of exposure of females to insult, during pregnancy the fetus may be affected in the uterus, and the germ cells of the fetus can affect more than one generation for non-genetic inheritance ((HEARD E MARTIENSSEN, 2014; SZYF, 2015)).

Therefore, it is not totally clear whether the maternal low-protein diet effect can be transmitted through successive generation and how mitochondria and oxidative status are affected. Thus, in the present study, we aimed test the hypothesis that maternal protein restriction in perinatal period (gestation and lactation) alters the mitochondrial respiration capacity and oxidative balance in male's brainstem at 30 days old in two consecutives generation (i.e. F1 and F2).

## **Material and Methods**

### *Ethical Standards*

Experiments were carried out in accordance with the National Institutes of Health guide for animal experimentation (NIH Publications N°. 80-23, revised 1978) and endorsed by the Ethical Committee of the Biological Science Center of the Federal University of Pernambuco (n° 23076.018417/2013-73).

### *Experimental Groups and Diet:*

#### *F1 Offspring*

Female rats at 90 days were mated (two females for one male) and on the first day of pregnancy, determined through the spermatozoa presence in a vaginal smear, they were divided into two groups in accord to dietary manipulations. Mothers (F0) were fed with diets, based on 17% protein (normo-protein) or 8% protein (low-protein), both with the same energetic value as previously described by Nascimento *et al.*,((2014)) and 24h after birth, the litters were standardized to eight pups (F1). In the present study only male offsprings were used for F1 and F2. The litters were maintained on their respective diets until weaning (21 d of age) when started to receive laboratory chow (Labina; Purina Agriband) until complete 30 days of life when was sacrificed for experimental procedure.

#### *F2 Offspring*

Mating F1 males and females at 70-90 days of age, generated F2 offspring, always taking care for the parents do not have any relationship. During gestation and lactation period, we divided our parents (F1) in two groups, F2 offspring with and without maternal low-protein diet re-exposure. The offsprings compose the following groups of F2 offspring: 1) NP-F2: pups from mothers and fathers that received normoprotein diet during developmental and mating period; 2) LP-F2 (pups from mothers and fathers that received low-protein diet during developmental and mating period; 3) NP-F2 labina: pups from mothers and fathers that received normoprotein diet during developmental and diet commercial chow during mating period; 4) LP-F2 labina: pups from mothers and fathers that received low-protein diet during developmental and diet commercial chow during mating period. The litters were maintained on their respective diet until weaning (21 d of age) when started to receive laboratory chow (Labina; Purina Agriband) until complete 30 days of life.

#### *Preparation of mitochondria*

After the brainstems were removed, they were immediately minced and homogenized, using a potter-Elvehjem pestle and glass tube connected to a digital homogenizer IKA® RW 20, in an ice-cold mitochondrial isolation buffer containing

225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 4 mM HEPES, 2 mM Taurine and 0.5 mM EGTA, pH 7.4. Subsequently, the samples were centrifuged at 4°C for 5 min at 4,000 RPM, the supernatants were collected and centrifuged once more at 4°C for 10 min at 13,000 RPM. After the last centrifugation, the pellets were re-suspended in the respiration buffer (RB) consisting of 120 mM KCl, 4 mM HEPES, 5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0.2% BSA (w/v), pH 7.4. The mitochondria were kept on ice during the assay ((LAGRANHA, DESCHAMPS *et al.*, 2010)).

#### *Measurement of mitochondrial respiration*

Mitochondria were incubated in RB (1 mg protein/mL) in a 600 SL chamber connected to a Clark-type oxygen electrode (Hansatech Instruments, Pentney King's Lynn, UK) at 28°C. The mitochondrial respiration was assessed using Complex I substrates (10 mM glutamate/0.4 mM malate) and the mitochondrial phosphorylation started with 0.8 mM ADP ((NASCIMENTO, FREITAS *et al.*, 2014)).

#### *Measurement of reactive species production*

The RS production was assessed by the dihydrodichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) method ((FERREIRA, D. J., DA SILVA PEDROZA *et al.*, 2016)). Briefly, 0.1 mg of mitochondria was incubated in RB with complex I substrates, as described in the mitochondrial respiration section, followed by the addition of 5 µM (H<sub>2</sub>DCF-DA), which in the presence of reactive species forms a fluorescent product at 485 nm excitation and 530 nm emission. The reaction was followed by gentle shaking for 8 min in FLUOstar OMEGA (BMG Labtech, USA) at 28°C. The results were expressed in H<sub>2</sub>DCF-DA formation (ηmol/min/mg protein).

#### *Sample preparation for oxidative stress and antioxidant analyses*

After frozen at 20°C, brainstems from NP and LP rats were immersed in cold buffer containing 50 mM TRIS and 1mM EDTA, pH 7.4, with the addition of 1 mM sodium orthovanadate and 200µg/mL phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF). Then they were homogenized with digital homogenizer IKA® RW 20 using a potter-Elvehjem pestle and glass tube on ice for no more than 1 minute. Homogenates were centrifuged at 4.000 RPM for 10 min at 4°C, at room temperature (RT) and the protein used for oxidative status analyses after determination of protein concentration

using the Bradford method and read at a wavelength of 595 nm absorption at room temperature (RT) ((BRADFORD, 1976)).

#### *Evaluation of Lipid Peroxidation*

Lipid peroxidation was analyzed using malondialdehyde (MDA) levels as previously published ((BUEGE E AUST, 1978)). Three hundred µg protein was sequentially mixed to 30% (w/v) Trichloroacetic acid (TCA) and 10 mM TRIS buffer at 30°C, pH 7.4. This mixture was centrifuged at 1.700 RPM for 10 min and the supernatant was boiled for 15 min with 0.73% (w/v) thiobarbituric acid. The pink pigment yielded then was measured at 535 nm absorption at RT and the results were expressed in % compared to control.

#### *Determination of Protein Oxidation*

The protein oxidation was assessed using the procedures highlighted by Reznick and Packer (1994) ((REZNICK E PACKER, 1994)). With the samples on ice, 30% (w/v) TCA was added to the sample and then centrifuged for 14 min at 4.000 RPM. The pellet was re-suspended in 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine and immediately incubated in a dark-room for 1h with agitation every 15min. Samples were washed and centrifuged three times in ethyl/acetate buffer and the final pellet was re-suspended in 6M guanidine hydrochloride, incubated for 30 min at 37°C and the absorbance read at 370 nm. The results were expressed in % compared to control

#### *Measurement of superoxide dismutase (SOD) activity*

SOD determination was performed in accordance with the protocol developed by Misra and Fridovich (1972) ((MISRA E FRIDOVICH, 1972)). In brief, three hundred µg of protein were added to 0.05 M Carbonate buffer with 0.1 mM EDTA, pH 10.2. The reaction was started with 150 mM epinephrine and the SOD activity was determined by adrenaline auto-oxidation inhibition at 30°C. The decrease in absorbance was followed for 1.5 min at 480 nm and the results were expressed in % compared to control.

#### *Measurement of Catalase (CAT) activity*

The CAT activity was performed as previously described by Aebi (1984) ((AEBI, 1984)). Briefly, 0.3 M hydrogen peroxide and three hundred µg protein were added to a 50 mM phosphate buffer, pH 7.0 at 20°C and the absorption decay was monitored for 3 min at 240 nm and the results were expressed in % compared to control.

#### *Measurement of Glutathione-S-transferase (GST) activity*

GST activity was measured as described previously by Habig, Pabst ((HABIG, PABST, FLEISCHNER, *et al.*, 1974; HABIG E JAKOBY, 1981)). Three hundred µg of protein was incubated in a 0.1 M phosphate buffer, pH 6.5 containing 1mM EDTA at 30°C and the assay started with the addition of 1 mM 1 chloro-2,4-dinitrobenzene and 1 mM GSH. The formation of 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione was monitored through the absorbance at 340 nm and the results were expressed in % compared to control.

#### *Measurement of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG)*

To assess GSH levels, the samples were firstly diluted in a 0.1 M phosphate buffer containing 5 mM EDTA, pH 8.0. Then, an aliquot from the diluted sample was incubated with o-Phthaldialdehyde (OPT) at RT for exactly 15 min. Fluorescence intensities measured at 420 nm and excitation at 350 nm were compared with a standard curve of known concentrations of GSH. To determine GSSG levels, the samples were incubated with 0.04 M N-ethylmaleimide for 30 min at RT followed by addition of 0.1M NaOH. When this mixture was ready, the same steps of the GSH assay were followed to determine the GSSG levels. The Redox State was determined by the ratio of GSH/GSSG as previously described ((HISSIN E HILF, 1976)). The results were expressed in GSH and/or GSSG levels (µmol/mg protein).

Note: All reagents used were obtained from Sigma

#### *Statistics*

All values are expressed as means±SEM. Once the data were tested for normal distribution, a Student *t* test was used to assess the differences between groups. Comparisons were considered statistically significant at  $p \leq 0.05$  and statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6.0<sup>®</sup> software (GraphPad Software, Inc.)

## Results

### *Respiratory Mitochondrial*

Evaluating the consumption of oxygen by animal mitochondria in first generation (F1), we found an increase in state 2 between LP – group ( $10.2 \pm 1.0$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg prot) when compared to the NP – group ( $6.9 \pm 0.8$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg prot) and decrease in state 3 in LP – group ( $24.6 \pm 3.4$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg prot) when compared to the NP – group ( $42.3 \pm 4.8$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg prot). When assessing the state 4, no difference was observed between groups NP ( $3.4 \pm 0.4$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg prot) v.s LP ( $4.1 \pm 0.2$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg prot), as well as uncoupling state (NP – group:  $46.7 \pm 3.9$  v.s LP – group:  $42.5 \pm 6.1$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg prot). The respiratory control ratio was decreased LP – group ( $3.13 \pm 0.8$ ) when compared to the male NP – group ( $6.8 \pm 0.8$ ) (**Fig. 1A**).

In second generation (F2) (with re-exposed in the nutritional insult), was verified an increase in the oxygen consumption in the state 2 in LP – group ( $8.01 \pm 0.6$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg prot) when compared to the NP – group ( $5.0 \pm 0.4$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg prot). The consumption in the state 3 was decreased in LP – group ( $30.2 \pm 2.7$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg prot) when compared to the NP – group ( $40.6 \pm 3.1$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg prot). State 4 and uncoupling state wasn't altered by LP diet (State 4= LP– group:  $22.2 \pm 2.7$  v.s NP – group:  $30.3 \pm 2.5$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg prot; Uncoupling= LP – group:  $25.0 \pm 2.6$  v.s NP – group:  $27.5 \pm 1.5$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg prot). The respiratory control ratio was decreased LP – group ( $4.2 \pm 0.3$ ) when compared to the male NP – group ( $8.0 \pm 0.5$ ) (**Fig. 1B**).

When assessing mitochondrial consumption in F2 – Labina (without re-exposed in the insult original), we found no difference in state 2 (LP – group:  $4.8 \pm 0.5$  v.s NP – group:  $4.1 \pm 0.3$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg prot), as well as in state 3 (LP – group:  $55.5 \pm 7.0$  v.s NP – group:  $45.1 \pm 1.5$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg prot). We found increased in state 4 (LP – group:  $25.8 \pm 3.3$  v.s NP – group:  $4.6 \pm 0.2$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg prot) and in uncoupling state (LP – group:  $40.7 \pm 2.1$  v.s NP – group:  $19.5 \pm 0.6$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg prot). The respiratory control ratio showed no difference (LP – group:  $9.1 \pm 0.6$  v.s NP – group:  $10.3 \pm 1.0$ ) (**Fig. 1C**).

### *Production of ROS*

When we evaluated mitochondrial ROS production from F1 and F2 (with re-exposed to the nutritional insult) we found an increase in the LP – group (F1 LP:  $7.8 \pm 1.3$  v.s NP:  $2.1 \pm 0.4$  a.u.; F2 LP:  $11.3 \pm 0.9$  v.s NP:  $4.1 \pm 0.5$  a.u) (**Fig. 2A-B**). We did not find difference in F2-Labina (without re-exposed in the insult original) (LP:  $15.0 \pm 1.7$  v.s NP:  $18.2 \pm 2.5$  a.u) (**Fig. 2C**).

#### *Lipid peroxidation and protein oxidation*

When analyzed the effect of maternal restriction in protein in the oxidation of some biomolecules (lipids and proteins), we found in F1 an increase in lipid peroxidation between LP – group ( $172.9 \pm 26.7$ ) when compared to the NP – group ( $100.0 \pm 4.9$ ) (**Fig. 3A**) and increase in protein oxidation between LP – group ( $190.6 \pm 33.4$ ) when compared to the NP – group ( $100.0 \pm 12.6$ ) (**Fig. 3B**).

In F2 (with re-exposed in the insult original), no difference was found in lipid peroxidation between LP – group ( $106.6 \pm 15.4$ ) when compared to the NP – group ( $100.0 \pm 12.5$ ) (**Fig. 3C**) and in protein oxidation between LP – group ( $98.8 \pm 8.1$ ) when compared to the NP – group ( $100.0 \pm 5.6$ ) (**Fig. 3D**).

In F2-Labina (without re-exposed in the insult original) we found no difference in lipid peroxidation between LP – group ( $100.0 \pm 21.4$ ) when compared to NP – group ( $100.0 \pm 8.0$ ) (**Fig. 3E**) and decreased in protein oxidation between LP – group ( $61.2 \pm 3.2$ ) when compared to NP – group ( $100.0 \pm 17.1$ ) (**Fig. 3F**).

#### *Antioxidant enzymatic system*

After the analysis of oxidative stress biomarkers, the enzymatic antioxidant capacity was evaluated. In F1, we did not find difference in activity of SOD between LP – group ( $117.4 \pm 17.6$ ) when compared to NP – group ( $100.0 \pm 9.4$ ) (**Fig. 4A**), however we observed a decrease in CAT activity in LP – group ( $61.7 \pm 7.2$ ) when compared to NP – group ( $100.0 \pm 10.0$ ) (**Fig. 4B**) and decrease GST in LP group ( $49.1 \pm 10.2$ ) when compared to NP – group ( $100.0 \pm 8.9$ ) (**Fig. 4C**).

In F2 (with re-exposed in the insult original), we did not find difference in activity of SOD between LP – group ( $84.3 \pm 11.1$ ) when compared to NP – group ( $100.0 \pm 18.2$ ) (**Fig. 4D**), but a decreased in CAT activity between LP – group ( $68.6 \pm 6.9$ ) when compared to NP – group ( $100.0 \pm 5.3$ ) (**Fig. 4E**) and no difference in activity of GST

between LP – group ( $85.2 \pm 16.5$ ) when compared to the NP – group ( $100.0 \pm 15.9$ ) (**Fig. 4F**).

When analyzed the animals in F2 – Labina (without re-exposed in the insult original) we did not find significant difference in any enzymatic activity.

#### *Antioxidant non-enzymatic system and redox state*

We analyse the non-enzymatic system through levels of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) and redox state (GSH/GSSG ratio). In F1, we did not find difference in the levels of GSH in LP – group ( $23.4 \pm 1.4$ ) v.s NP – group ( $22.0 \pm 1.5$ ) (**Fig. 5A**), but an increase in GSSG at LP – group ( $4.6 \pm 0.3$ ) v.s NP – group ( $3.1 \pm 0.2$ ) (**Fig. 5B**), with a decreased in the redox state LP – group ( $5.2 \pm 0.6$ ) v.s NP – group ( $7.0 \pm 0.3$ ) (**Fig. 5C**).

In F2 (with re-exposed in the insult original), no difference was observed in the levels of GSH in LP – group ( $28.4 \pm 1.4$ ) v.s NP – group ( $27.0 \pm 1.5$ ) (**Fig. 5D**), but also an increase in GSSG in LP – group ( $9.3 \pm 0.3$ ) v.s NP – group ( $8.1 \pm 0.2$ ) (**Fig. 5E**), but no difference in the redox state in LP – group ( $2.9 \pm 0.2$ ) v.s NP – group ( $3.3 \pm 0.1$ ) (**Fig. 5F**).

In F2 – Labina (without re-exposed in the insult original) we observed an increase in the levels of GSH in LP – group ( $30.5 \pm 0.1$ ) v.s NP – group ( $25.0 \pm 0.0$ ) (**Fig. 5G**) associated to a decreased in the levels of GSSG in LP – group ( $3.0 \pm 0.4$ ) v.s NP – group ( $4.0 \pm 0.0$ ) (**Fig. 5H**), which results in an increase in the redox state in LP – group ( $8.7 \pm 0.1$ ) v.s NP – group ( $6.1 \pm 0.0$ ) (**Fig. 5I**).

## **Discussion**

According to *Developmental Origins of Health and Disease (DOHAD)* theory insults in the early stages of life are associated with several diseases throughout life such as hypertension, type 2 diabetes, dyslipidemia, psychological disorders and cancers ((BARKER, 2007; FUKUOKA E SATA, 2016)). We showed this paper the effects of maternal protein restriction in the brainstein of juvenile rats males for two generation. Our results shown that maternal low protein diet can changes the mitochondrial respiration capacity and oxidative stress in the offspring.

Mitochondrial activity is very important for the normal function of the nervous system, using a Huntington Disease (HD) model Lou *et al.*, (2016) shown that in striatum and cortex from rats with 9 weeks a significant decrease in oxygen consumption, indicating less capacity in generation of energy ((Lou *et al.*, 2016)). In model of calorie restriction Cerqueira *et al.*, (2012) using 6-month-old rats, show in vivo and in cultured cerebellar neurons an increase in the mitochondrial oxygen states (St 3, St 4 and uncoupled) and according to the authors the increase in oxidative phosphorylation may increase energy production and is associated with the increase in neural survival.

Ferreira *et al.*, (2015), shown in offspring, with 22 days of age, that mother were submitted to protein restriction (8% of protein) during the gestation and lactation, an increase in St 2, decreased in the state ADP – stimulation (St 3) and in RCR ((FERREIRA, D. J., DA SILVA PEDROZA *et al.*, 2016)). Corroborating with these previous data, our results showed similar effect in mitochondrial capacity in rats with 30 days of age.

Ours results shown increased in the ROS production in the brainstems of F1 offsprings; this data also agrees with Ferreira *et al.*, ((FERREIRA, D. J., DA SILVA PEDROZA *et al.*, 2016)) which used the same nutritional insult and brain tissue. The mitochondrial dysfunction and the vulnerability to oxidative stress depends on the brain area involved ((WANG, X. E MICHAELIS, 2010)), using protein restriction model (7% of protein), Feoli *et al.*, (2006) did shown difference in ROS production in cortex, hippocampus and cerebellum ((FEOLI, A. M., SIQUEIRA, I. R. *et al.*, 2006)).

Increased levels of ROS can damage biomolecules such as proteins, lipids and DNA as product of oxidative stress. Peroxidation of membrane lipids leads to loss of membrane fluidity and elasticity, impaired cellular functioning, and even cell rupture and consequently oxidative damage behind some neurodegenerative diseases ((SULTANA *et al.*, 2006; NIKI, 2008)). The oxidation of protein and lipids was verified in our results only in malnourished animals in the first generation (F1). Corroborating with our findings, Bonatto *et al.*, ((BONATTO, POLYDORO *et al.*, 2006)) using Wistar rats where the mothers were submitted to protein restriction in the critical period of development (7% of protein) found increased in the peroxidation in the cortex and cerebellum in the males at 21 days of age, Feoli *et al.*, at 60 days of

age ((FEOLI, A. M., SIQUEIRA, I. R. *et al.*, 2006)) and Ferreira *et al.*, in the brainstem in adult rats ((FERREIRA, D. S., LIU *et al.*, 2015)) and oxidation of protein at 60 days of age ((FERREIRA, D. J., DA SILVA PEDROZA *et al.*, 2016)) using the experimental model of 8% of protein.

The antioxidant system has a key role in the brain's protection against oxidative damage. Ours results shown decreased in the activity of catalase in the first (F1) and second (F2) generation and GST only F1. Some experimental studies have demonstrated that undernutrition is capable of decreased the activity of catalase ((BONATTO, POLYDORO *et al.*, 2006; FEOLI, A. M., SIQUEIRA, I. R. *et al.*, 2006; PARTADIREDDA *et al.*, 2009; FERREIRA, D. S., LIU *et al.*, 2015)), SOD ((FEOLI, A. M., SIQUEIRA, I. R. *et al.*, 2006; FERREIRA, D. S., LIU *et al.*, 2015)) and GST ((FERREIRA, D. J., DA SILVA PEDROZA *et al.*, 2016)) in different brain's area. The activity of GST is very important, because deleterious modification in GST isoforms have been associated with various pathological processes such as glioblastoma, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, stroke and epilepsy ((KUMAR *et al.*, 2016)). Partadiredja *et al.*, (2005) shown expression of both cytosolic and mitochondrial SOD is altered by undernutrition during early life in the cerebellum and/or the forebrain. However, the direction of the change in expression was different for these two enzymes. While undernutrition appeared to increase the level of MnSOD expression in the cerebellum, it decreased the expression of Cu/ZnSOD in both the cerebellum and forebrain regions compared to control values ((PARTADIREDDA, SIMPSON *et al.*, 2005)).

In the non – enzymatic antioxidant system, glutathione play the most important action. Glutathione is a peptide comprised of three amino acids (cysteine, glutamate and glycine) with antioxidant function and in normal conditions are in the reduced state (GSH), but in conditions where there is an increase in the pro-oxidant molecules GSH is transformed into oxidized glutathione (GSSG) ((DRINGEN, 2000)). Ours results shown levels increased of GSSG in F1 and F2. In F2- Labina, higher levels of GSH and lower levels of GSSG were found, suggesting in these animals a transgenerational resistance. The redox state decreased in F1 and increased in F2 – Labina. Since, reduced levels of GSH are associated with neural damage and the development of neurodegenerative diseases since deficiency has been identified as an early event in the progression as the Parkinson's disease ((DIAZ-HUNG *et al.*, 2016)), with our data we could speculated that in the second generation there is a

possible resistance to neurological diseases induced by mitochondrial dysfunction and oxidative stress, only in individuals that doesn't suffer an additional insult.

Together we showed that maternal protein restriction during development induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in brainstem in first generation and in the second generation of animals that receive an additional insult, otherwise if the insult not occur, the animals will not show mitochondrial dysfunction neither alteration in oxidative status in brainstem, decreasing the risk in develop neurological diseases.

## References

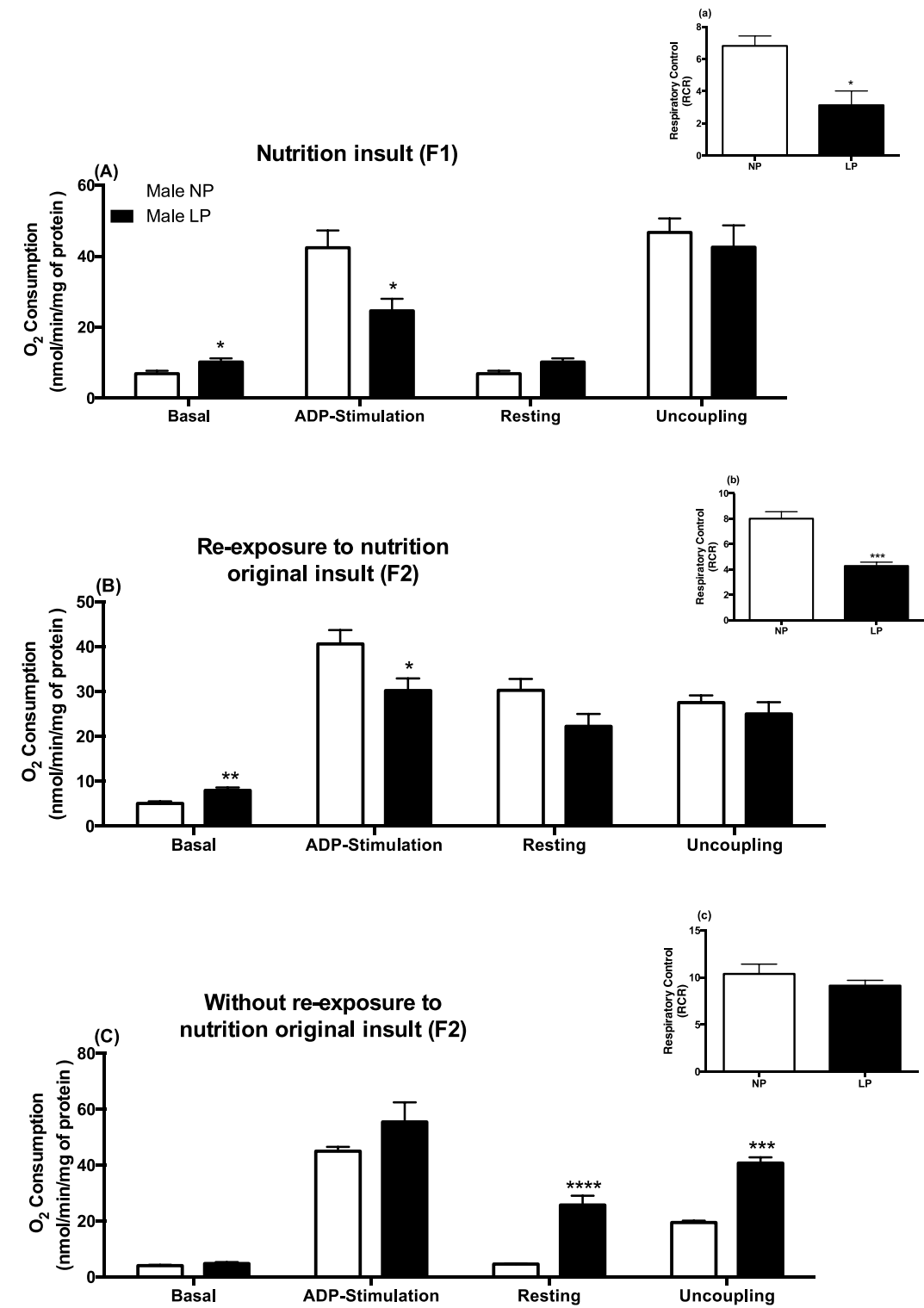
1. WHO. Global Status Report, Non Communicable Diseases 2014. (ed.) World Health Organization. 2014.
2. Writing Group M, Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133(4):e38-60.
3. Kokubo Y, Iwashima Y. Higher blood pressure as a risk factor for diseases other than stroke and ischemic heart disease. *Hypertension*. 2015;66(2):254-9.
4. Esler M, Lambert E, Schlaich M. Point: Chronic activation of the sympathetic nervous system is the dominant contributor to systemic hypertension. *J Appl Physiol* (1985). 2010;109(6):1996-8; discussion 2016.
5. Esler M. The 2009 Carl Ludwig Lecture: Pathophysiology of the human sympathetic nervous system in cardiovascular diseases: the transition from mechanisms to medical management. *J Appl Physiol*. 2010;108(2):227-37.
6. Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(5):335-46.
7. Guyenet PG, Stornetta RL, Bayliss DA. Retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. *J Physiol*. 2008;586(8):2043-8.
8. Spyer KM, Gourine AV. Chemosensory pathways in the brainstem controlling cardiorespiratory activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009;364(1529):2603-10.
9. Allen AM. Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone. *Hypertension*. 2002;39(2):275-80.
10. Dampney RA. Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives. *Adv Physiol Educ*. 2016;40(3):283-96.
11. Chan SH, Chan JY. Brain stem NOS and ROS in neural mechanisms of hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2013.
12. Francis J, Davisson RL. Emerging concepts in hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(1):69-73.
13. Lopez-Campistrous A, Hao L, Xiang W, Ton D, Semchuk P, Sander J, et al. Mitochondrial dysfunction in the hypertensive rat brain: respiratory complexes exhibit assembly defects in hypertension. *Hypertension*. 2008;51(2):412-9.
14. Peterson JR, Sharma RV, Davisson RL. Reactive oxygen species in the neuropathogenesis of hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2006;8(3):232-41.
15. Majzunova M, Dovinova I, Barancik M, Chan JY. Redox signaling in pathophysiology of hypertension. *J Biomed Sci*. 2013;20:69.
16. Lopez-Campistrous A, Hao L, Xiang W, Ton D, Semchuk P, Sander J, et al. Mitochondrial dysfunction in the hypertensive rat brain: respiratory complexes exhibit assembly defects in hypertension. *Hypertension*. 2008;51(2):412-9.
17. Maximo Cardoso L, de Almeida Colombari DS, Vanderlei Menani J, Alves Chianca D, Jr., Colombari E. Cardiovascular responses produced by central injection of hydrogen peroxide in conscious rats. *Brain Res Bull*. 2006;71(1-3):37-44.
18. Oliveira EL, Cardoso LM, Pedrosa ML, Silva ME, Dun NJ, Colombari E, et al. A low protein diet causes an increase in the basal levels and variability of mean arterial pressure and heart rate in Fisher rats. *Nutr Neurosci*. 2004;7(4):201-5.
19. Bonatto F, Polydoro M, Andrades ME, Conte da Frota ML, Jr., Dal-Pizzol F, Rotta LN, et al. Effects of maternal protein malnutrition on oxidative markers in the young rat cortex and cerebellum. *Neurosci Lett*. 2006;406(3):281-4.

20. Bonatto F, Polydoro M, Andrades ME, da Frota Junior ML, Dal-Pizzol F, Rotta LN, et al. Effect of protein malnutrition on redox state of the hippocampus of rat. *Brain Res.* 2005;1042(1):17-22.
21. Feoli AM, Siqueira IR, Almeida L, Tramontina AC, Vanzella C, Sbaraini S, et al. Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. *Nutrition.* 2006;22(2):160-5.
22. Penitente AR, Fernandes LG, Cardoso LM, Silva ME, Pedrosa ML, Silva AL, et al. Malnutrition enhances cardiovascular responses to chemoreflex activation in awake rats. *Life Sci.* 2007;81(7):609-14.
23. Yim HE, Yoo KH, Bae IS, Hong YS, Lee JW. Postnatal early overnutrition causes long-term renal decline in aging male rats. *Pediatr Res.* 2014;75(2):259-65.
24. de Brito Alves JL, Nogueira VO, de Oliveira GB, da Silva GS, Wanderley AG, Leandro CG, et al. Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. *Br J Nutr.* 2014;111(4):606-15.
25. Barros MA, De Brito Alves JL, Nogueira VO, Wanderley AG, Costa-Silva JH. Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2015;25(1):123-30.
26. Ferreira DJ, da Silva Pedroza AA, Braz GR, da Silva-Filho RC, Lima TA, Fernandes MP, et al. Mitochondrial bioenergetics and oxidative status disruption in brainstem of weaned rats: Immediate response to maternal protein restriction. *Brain Res.* 2016.
27. de Brito Alves JL, de Oliveira JM, Ferreira DJ, Barros MA, Nogueira VO, Alves DS, et al. Maternal protein restriction induced-hypertension is associated to oxidative disruption at transcriptional and functional levels in the medulla oblongata. *Clinical and experimental pharmacology & physiology.* 2016;43(12):1177-84.
28. Aiken CE, Ozanne SE. Transgenerational developmental programming. *Hum Reprod Update.* 2014;20(1):63-75.
29. Bale TL. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16(6):332-44.
30. Heard E, Martienssen RA. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell.* 2014;157(1):95-109.
31. Szyf M. Nongenetic inheritance and transgenerational epigenetics. *Trends Mol Med.* 2015;21(2):134-44.
32. Nascimento L, Freitas CM, Silva-Filho R, Leite AC, Silva AB, da Silva AI, et al. The effect of maternal low-protein diet on the heart of adult offspring: role of mitochondria and oxidative stress. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2014;39(8):880-7.
33. Lagranha CJ, Deschamps A, Aponte A, Steenbergen C, Murphy E. Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. *Circ Res.* 2010;106(11):1681-91.
34. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
35. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.
36. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994;233:357-63.

37. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972;247(10):3170-5.
38. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
39. Habig WH, Jakoby WB. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol.* 1981;77:218-31.
40. Habig WH, Pabst MJ, Fleischner G, Gatmaitan Z, Arias IM, Jakoby WB. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974;71(10):3879-82.
41. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1976;74(1):214-26.
42. Barker DJ. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med.* 2007;261(5):412-7.
43. Fukuoka H, Sata F. Molecular Mechanism of Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD). *Nihon eiseigaku zasshi Japanese journal of hygiene.* 2016;71(3):185-7.
44. Lou S, Lepak VC, Eberly LE, Roth B, Cui W, Zhu XH, et al. Oxygen consumption deficit in Huntington disease mouse brain under metabolic stress. *Hum Mol Genet.* 2016.
45. Wang X, Michaelis EK. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in aging neuroscience.* 2010;2:12.
46. Niki E. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *Biofactors.* 2008;34(2):171-80.
47. Sultana R, Perluigi M, Butterfield DA. Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insights into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(11-12):2021-37.
48. Ferreira DS, Liu Y, Fernandes MP, Lagranha CJ. Perinatal low-protein diet alters brainstem antioxidant metabolism in adult offspring. *Nutr Neurosci.* 2015.
49. Partadiredja G, Worrall S, Bedi KS. Early life undernutrition alters the level of reduced glutathione but not the activity levels of reactive oxygen species enzymes or lipid peroxidation in the mouse forebrain. *Brain Res.* 2009;1285:22-9.
50. Kumar A, Dhull DK, Gupta V, Channana P, Singh A, Bhardwaj M, et al. Role of Glutathione-S-transferases in neurological problems. Expert opinion on therapeutic patents. 2016:1-11.
51. Partadiredja G, Simpson R, Bedi KS. The effects of pre-weaning undernutrition on the expression levels of free radical deactivating enzymes in the mouse brain. *Nutr Neurosci.* 2005;8(3):183-93.
52. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol.* 2000;62(6):649-71.
53. Diaz-Hung ML, Yglesias-Rivera A, Hernandez-Zimbron LF, Orozco-Suarez S, Ruiz-Fuentes JL, Diaz-Garcia A, et al. Transient glutathione depletion in the substantia nigra compacta is associated with neuroinflammation in rats. *Neuroscience.* 2016;335:207-20.

Figures

Figure 1



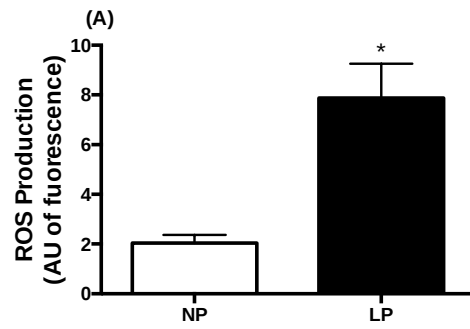
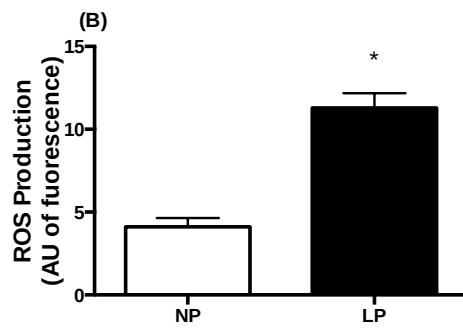
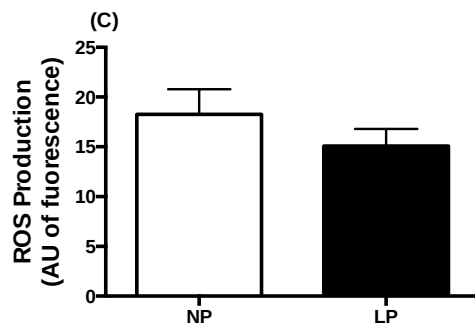
**Figure 2****Nutrition insult (F1)****Re-exposure to nutrition original insult (F2)****Without re-exposure to nutrition original insult (F2)**

Figure 3

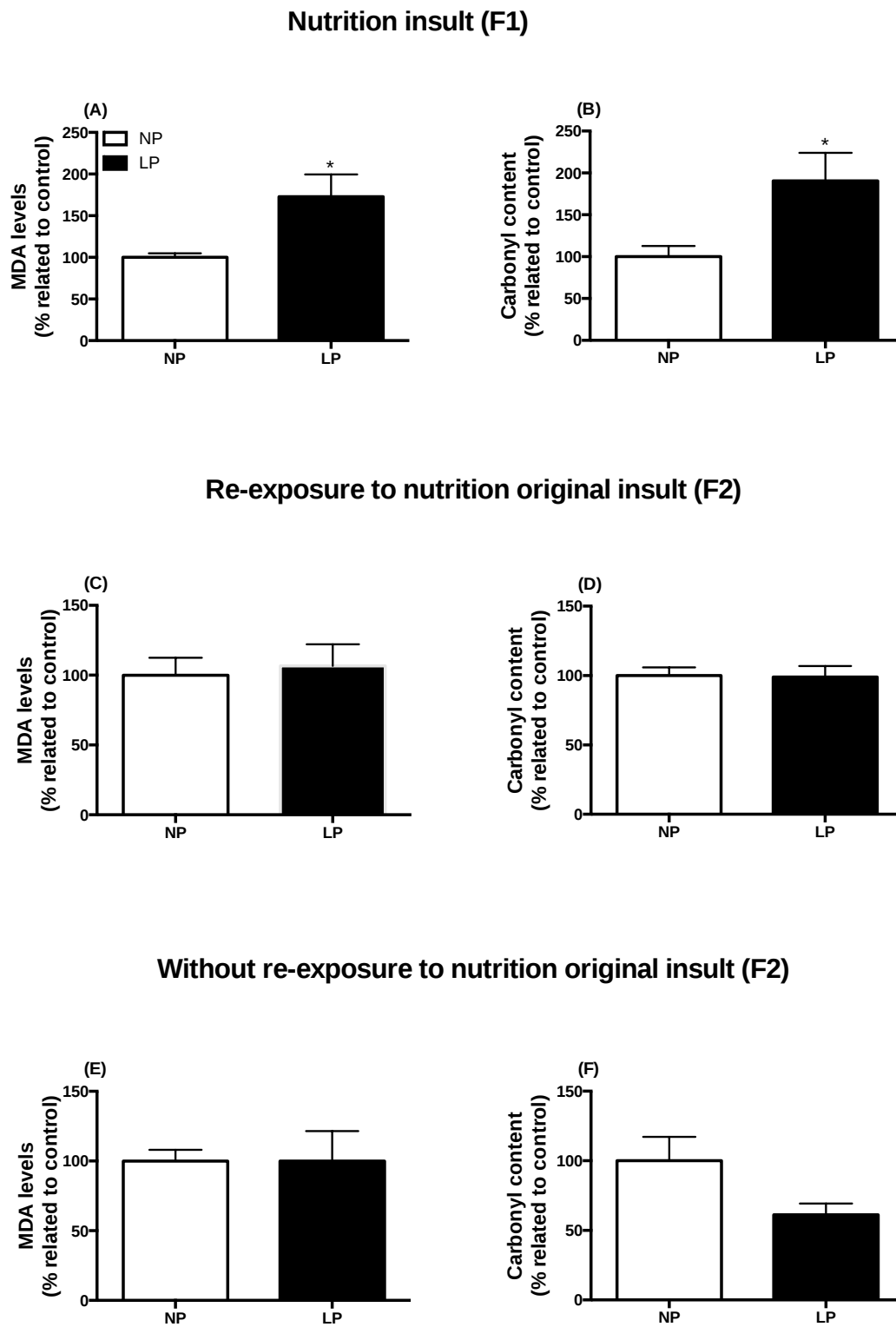


Figure 4

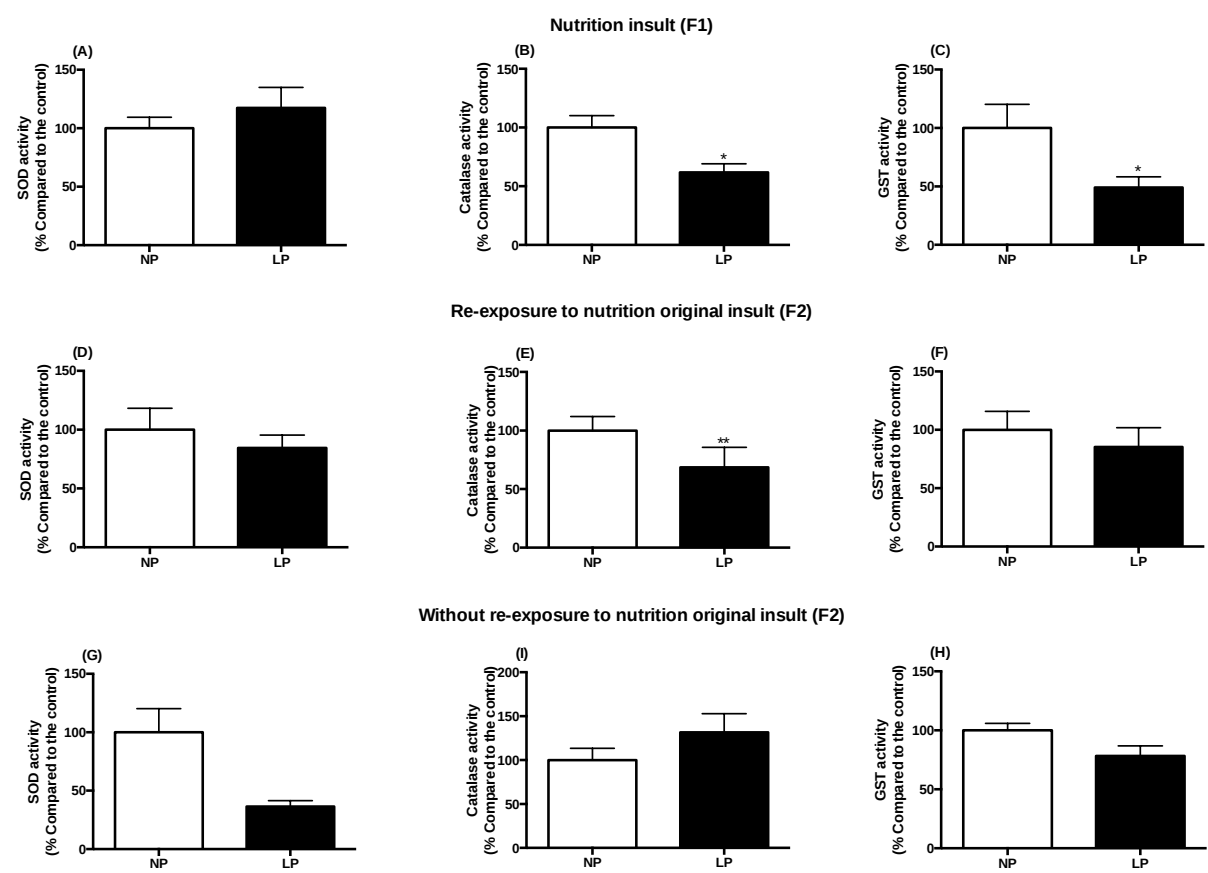
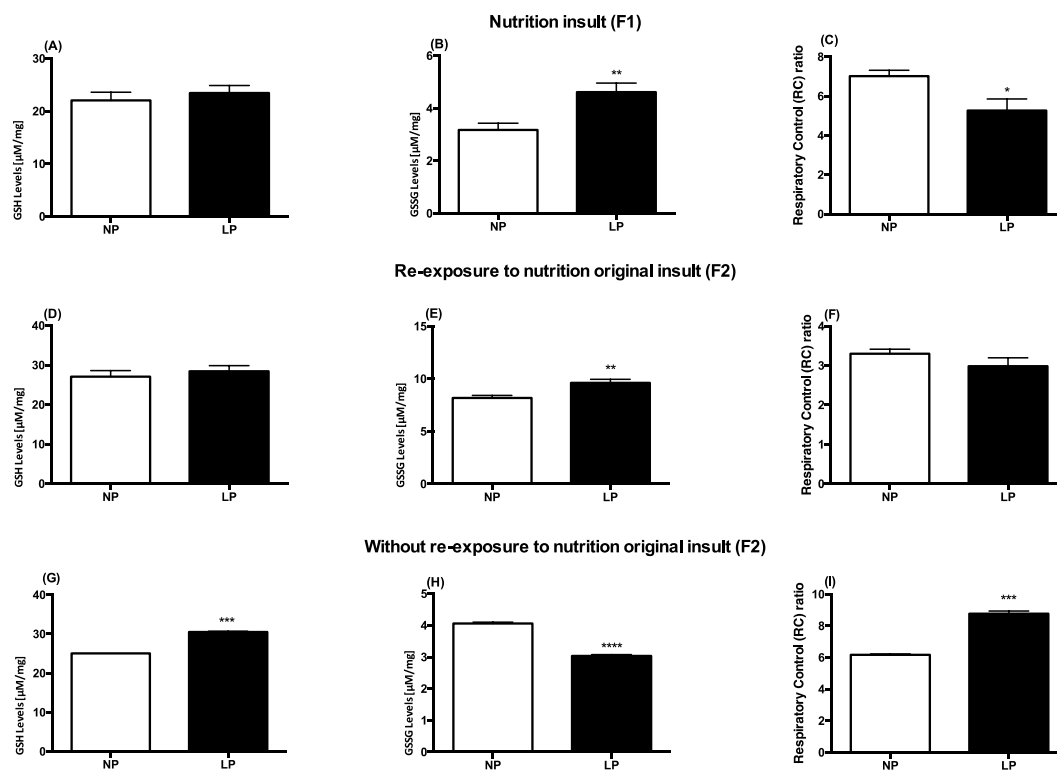


Figure 5



## Figure Legends

**Figure 1.** Mitochondrial oxygen consumption in brainstem from 30 day-old males rats that received a low-protein diet throughout perinatal period. (A) First generation (F1) and ratio control respiratory (RCR) (a). (B) Second generation F2 (with re-exposed to the nutritional insult) and (RCR) (b). (C) F2-Labina (without re-exposed to the nutritional insult) and (RCR) (c). White bars represent normo-protein group (NP) and black bars represent low-protein group (LP) (n = 6–10 rats per group). Values are means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  is the difference between diet and *Student's t* test was used.

**Figure 2.** The production of reactive species (ROS) in brainstem from 30 day-old males rats that received a low-protein diet throughout perinatal period. (A) Production of ROS in F1, (B) in F2 (with re-exposed to the nutritional insult) and (C) in F2-Labina (without re-exposed to the nutritional insult). White bars represent normo-protein group (NP) and black bars represent low-protein group (LP) (n = 6–10 rats per group). Values are means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  is the difference between diet and *Student's t* test was used.

**Figure 3.** Biomarkers of oxidative damage in brainstem from 30 day-old males rats that received a low-protein diet throughout perinatal period. (A) Levels of Malondialdehyde (MDA) and (B) oxidation of protein in F1. (C) MDA and (D) oxidation of protein in F2 (with re-exposed to the nutritional insult). (E) Levels of Malondialdehyde (MDA) and (F) oxidation of protein in F2-Labina (without re-exposed to the nutritional insult). White bars represent normo-protein group (NP) and black bars represent low-protein group (LP) (n = 6–10 rats per group). Values are means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  is the difference between diet and *Student's t* test was used.

**Figure 4.** Effects of perinatal low-protein on enzymatic antioxidant activities in brainstem from 30 day-old males rats that received a low-protein diet throughout perinatal period. (A) Superoxide dismutase (SOD), (B) Catalase (CAT), (C) glutathione-S-transferase (GST) in brainstem from animals at 30 days of life in F1. (D) SOD, (E) CAT and (F) GST in F2 (with re-exposed to the nutritional insult) and (G) SOD, (H) CAT and (I) GST in F2-Labina (without re-exposed to the nutritional insult). White bars represent normo-protein group (NP) and black bars represent low-

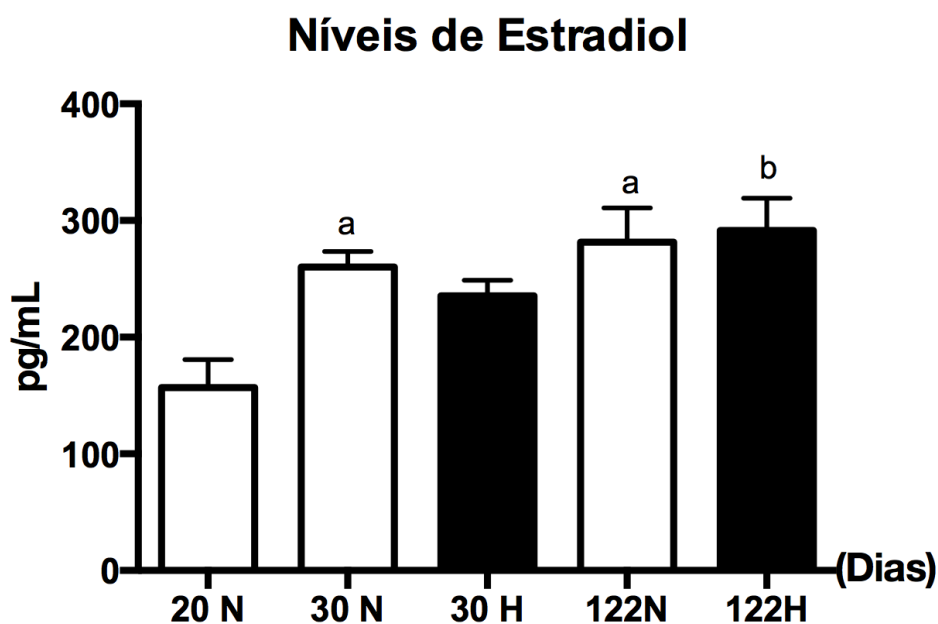
protein group (LP) (n = 6–10 rats per group). Values are means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  is the difference between diet and *Student's t* test was used.

**Figure 5.** Redox state in brainstem from 30 day-old males rats that received a low-protein diet throughout perinatal period. (A) Redox state in F1, (B) Redox state in F2 (with re-exposed to the nutritional insult) and (C) in F2-Labina (without re-exposed to the nutritional insult). White bars represent normo-protein group (NP) and black bars represent low-protein group (LP) (n = 6–10 rats per group). Values are means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  is the difference between diet and *Student's t* test was used.

### 6.3 Resultado Complementar

#### 6.3.1 Níveis de Estradiol

**Figura 1.** Níveis de estradiol em soro de ratas aos (20, 30, 122 dias de idade) que foram submetidos a dieta Normoproteica (NP, 17 % de proteína, n:4) ou Hipoproteica (HP, % de proteína, n:4) durante a gestação e lactação na primeira geração (F1). *a* – foi considerada diferença significativa entre o grupo Normo (30N ou 122N) quando comparado com o grupo normo (20N) e *b* - foi considerada diferença significativa entre o grupo Hipo (30H ou 122H) quando comparado com o grupo normo (20N):  $P < 0.005$ ; test t de Student não pareado).



## **7 CONCLUSÕES**

### ***1- Em relação aos efeitos da desnutrição sobre a função mitocondrial e estado oxidativo:***

Com os nossos dados podemos concluir que a restrição proteica materna no período crítico do desenvolvimento é capaz de causar disfunção mitocondrial aumentando assim a produção de moléculas pró-oxidantes que promovem dano a biomoléculas-chaves para a manutenção da saúde ou indução de patologias, como proteínas e lipídios. Esses efeitos, possivelmente, seja devido a uma modulação detrimental nas defesas antioxidantes celulares (enzimáticas e não enzimáticas), causando o desbalanço oxidativo, perpetuando assim os mecanismos indutores de lesões celulares e/ou teciduais.

### ***2- Em relação aos efeitos da desnutrição sobre a diferença de gênero:***

Adicional aos efeitos sobre a função mitocondrial e estado oxidativo, nossos dados suportam a hipótese de que a desnutrição proteica materna perinatal afeta de forma distinta ratos machos e fêmeas; essa diferença observada nos níveis de disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, provavelmente seja devido à presença do hormônio estradiol nas fêmeas de 30 dias.

### ***3- Em relação aos efeitos da desnutrição sobre os efeitos transgeracionais:***

A realização desse estudo permitiu concluir que a restrição proteica materna perinatal induz um efeito mais acentuado na primeira geração exposta ao insulto nutricional do que na geração seguinte. A indução de um novo insulto nutricional na segunda geração acarreta uma maior disfunção mitocondrial e estresse oxidativo do que a não re-exposição do insulto nutricional, sugerindo uma predisposição na segunda geração, mas só aparecerá os efeitos deletérios, caso sofra novo insulto nutricional.

### 7.1 Perspectivas

No transcorrer da realização desse estudo novas perguntas foram surgindo, o que nos permite ter como perspectivas futuras para novas avaliações:

- ✓ Avaliar se além dos danos a lipídeos e proteínas o estresse oxidativo induzido pela restrição proteica perinatal seria capaz de causar dano ao DNA nuclear e mitocondrial;
- ✓ Averiguar se a produção de EROs exacerbada provem apenas da disfunção mitocondrial ou está associada a outras fontes produtoras de EROs como a enzima NADPH Oxidase, MAO, lipoxigenases e cicloxigenases;
- ✓ Analisar os mecanismos epigenéticos induzidos pela restrição proteica perinatal (acetilação e metilação);
- ✓ Avaliar quais as possíveis vias que o estradiol ativa para promover neuroproteção;
- ✓ Avaliar se outros hormônios sexuais (progesterona e testosterona) também estão associados a diferença de gênero nos machos e fêmeas;
- ✓ Verificar se o efeito transgeracional vai além da segunda geração (F2).

## REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-6, 1984. ISSN 0076-6879.

AIKEN, C. E.; OZANNE, S. E. Transgenerational developmental programming. **Hum Reprod Update**, v. 20, n. 1, p. 63-75, Jan-Feb 2014. ISSN 1460-2369.

AKSENOV, M. Y. et al. Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 103, n. 2, p. 373-83, 2001. ISSN 0306-4522.

ALLEN, A. M. Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone. **Hypertension**, v. 39, n. 2, p. 275-80, Feb 2002. ISSN 1524-4563.

AMES, A., 3RD. CNS energy metabolism as related to function. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 34, n. 1-2, p. 42-68, Nov 2000.

ANDERSON, C. M. et al. Placental insufficiency: programming of leptin secretion, blood pressure, and postnatal growth in two generations of Sprague-Dawley rats. **Biol Res Nurs**, v. 10, n. 3, p. 284-91, Jan 2009. ISSN 1099-8004.

ANDERSON, C. M. et al. Placental insufficiency leads to developmental hypertension and mesenteric artery dysfunction in two generations of Sprague-Dawley rat offspring. **Biol Reprod**, v. 74, n. 3, p. 538-44, Mar 2006. ISSN 0006-3363.

ANDERSON, M. F.; SIMS, N. R. Improved recovery of highly enriched mitochondrial fractions from small brain tissue samples. **Brain Res Brain Res Protoc**, v. 5, n. 1, p. 95-101, Feb 2000. ISSN 1385-299X.

AREVALO, M. A. et al. Actions of estrogens on glial cells: Implications for neuroprotection. **Biochim Biophys Acta**, v. 1800, n. 10, p. 1106-12, Oct 2010. ISSN 0006-3002 (Print)  
0006-3002.

AYE, M. T. et al. Effect of filtration of platelet concentrates on the accumulation of cytokines and platelet release factors during storage. **Transfusion**, v. 35, n. 2, p. 117-24, Feb 1995. ISSN 0041-1132.

BALDERESCHI, M. et al. Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging. **Neurology**, v. 55, n. 9, p. 1358-63, Nov 14 2000. ISSN 0028-3878 (Print)  
0028-3878.

BALE, T. L. Lifetime stress experience: transgenerational epigenetics and germ cell programming. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 16, n. 3, p. 297-305, Sep 2014. ISSN 1958-5969.

\_\_\_\_\_. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. **Nat Rev Neurosci**, v. 16, n. 6, p. 332-44, Jun 2015. ISSN 1471-0048 (Electronic) 1471-003X.

BALZER, J. et al. Non-Thermal Dielectric Barrier Discharge (DBD) Effects on Proliferation and Differentiation of Human Fibroblasts Are Primary Mediated by Hydrogen Peroxide. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0144968, 2015. ISSN 1932-6203.

BARKER, D. J. The developmental origins of chronic adult disease. **Acta Paediatr Suppl**, v. 93, n. 446, p. 26-33, Dec 2004. ISSN 0803-5326.

BARROS, M. A. et al. Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 25, n. 1, p. 123-30, Jan 2015. ISSN 1590-3729.

BEACH, R. S.; GERSHWIN, M. E.; HURLEY, L. S. Gestational zinc deprivation in mice: persistence of immunodeficiency for three generations. **Science**, v. 218, n. 4571, p. 469-71, Oct 29 1982. ISSN 0036-8075.

BELLANTI, F. et al. Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: impact of estrogen therapy. **Redox Biol**, v. 1, p. 340-6, 2013. ISSN 2213-2317.

BENYSHEK, D. C.; JOHNSTON, C. S.; MARTIN, J. F. Post-natal diet determines insulin resistance in fetally malnourished, low birthweight rats (F1) but diet does not modify the insulin resistance of their offspring (F2). **Life Sci**, v. 74, n. 24, p. 3033-41, Apr 30 2004. ISSN 0024-3205.

BENYSHEK, D. C. et al. Insulin sensitivity is normalized in the third generation (F3) offspring of developmentally programmed insulin resistant (F2) rats fed an energy-restricted diet. **Nutr Metab (Lond)**, v. 5, p. 26, 2008. ISSN 1743-7075 (Electronic) 1743-7075.

BERNAL-MONDRAGON, C. et al. Estradiol prevents olfactory dysfunction induced by A-beta 25-35 injection in hippocampus. **BMC Neurosci**, v. 14, p. 104, Sep 24 2013. ISSN 1471-2202.

BERTRAM, C. et al. Transgenerational effects of prenatal nutrient restriction on cardiovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal function. **J Physiol**, v. 586, n. 8, p. 2217-29, Apr 15 2008. ISSN 1469-7793.

BONATTO, F. et al. Effects of maternal protein malnutrition on oxidative markers in the young rat cortex and cerebellum. **Neurosci Lett**, v. 406, n. 3, p. 281-4, Oct 9 2006. ISSN 0304-3940.

BONATTO, F. et al. Effect of protein malnutrition on redox state of the hippocampus of rat. **Brain Res**, v. 1042, n. 1, p. 17-22, Apr 25 2005. ISSN 0006-8993.

BORRAS, C. et al. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. **Free Radic Biol Med**, v. 34, n. 5, p. 546-52, Mar 1 2003. ISSN 0891-5849.

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. ISSN 0003-2697.

BROWN, A. S.; SUSSER, E. S. Prenatal nutritional deficiency and risk of adult schizophrenia. **Schizophr Bull**, v. 34, n. 6, p. 1054-63, Nov 2008. ISSN 0586-7614.

BUCHWALD, U. et al. Prenatal stress programs lipid metabolism enhancing cardiovascular risk in the female F1, F2, and F3 generation in the primate model common marmoset (*Callithrix jacchus*). **J Med Primatol**, v. 41, n. 4, p. 231-40, Aug 2012. ISSN 1600-0684.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302-10, 1978. ISSN 0076-6879 (Print) 0076-6879.

BURDGE, G. C. et al. Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? **Br J Nutr**, v. 97, n. 6, p. 1036-46, Jun 2007. ISSN 0007-1145 (Print) 0007-1145.

BURDGE, G. C. et al. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. **Br J Nutr**, v. 97, n. 3, p. 435-9, Mar 2007. ISSN 0007-1145.

CAMPOS, F. L. et al. GDNF contributes to oestrogen-mediated protection of midbrain dopaminergic neurones. **J Neuroendocrinol**, v. 24, n. 11, p. 1386-97, Nov 2012. ISSN 0953-8194.

CARONE, B. R. et al. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. **Cell**, v. 143, n. 7, p. 1084-96, Dec 23 2010. ISSN 1097-4172.

CARRI, M. T. et al. Oxidative stress and mitochondrial damage: importance in non-SOD1 ALS. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 41, 2015. ISSN 1662-5102.

CHAN, S. H.; CHAN, J. Y. Brain stem oxidative stress and its associated signaling in the regulation of sympathetic vasomotor tone. **J Appl Physiol (1985)**, v. 113, n. 12, p. 1921-8, Dec 15 2012. ISSN 1522-1601.

CHAN, S. H. et al. Brain Stem NOS and ROS in Neural Mechanisms of Hypertension. **Antioxid Redox Signal**, Mar 28 2013b. ISSN 1557-7716.

CHAN, S. H. et al. NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced pressor effect via activation of p38 mitogen-activated protein kinase in the rostral ventrolateral medulla. **Circ Res**, v. 97, n. 8, p. 772-80, Oct 14 2005. ISSN 1524-4571.

CHEN, Y. et al. Evaluation of gender-related differences in various oxidative stress enzymes in mice. **Chin J Physiol**, v. 54, n. 6, p. 385-90, Dec 31 2011. ISSN 0304-4920.

CHERNOFF, N. et al. Reproductive effects of maternal and pre-weaning undernutrition in rat offspring: age at puberty, onset of female reproductive senescence and intergenerational pup growth and viability. **Reprod Toxicol**, v. 28, n. 4, p. 489-94, Dec 2009. ISSN 1873-1708.

CHINTA, S. J.; ANDERSEN, J. K. Redox imbalance in Parkinson's disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1780, n. 11, p. 1362-7, Nov 2008. ISSN 0006-3002.

CHONG, E.; YOSYPYV, I. V. Developmental programming of hypertension and kidney disease. **Int J Nephrol**, v. 2012, p. 760580, 2012. ISSN 2090-2158.

CIRIELLO, J.; SCHULTZ, C. G.; RODER, S. Collateral axonal projections from ventrolateral medullary non-catecholaminergic neurons to central nucleus of the amygdala. **Brain Res**, v. 663, n. 2, p. 346-51, Nov 14 1994. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993.

COLOMBARI, E.; MENANI, J. V.; TALMAN, W. T. Commissural NTS contributes to pressor responses to glutamate injected into the medial NTS of awake rats. **Am J Physiol**, v. 270, n. 6 Pt 2, p. R1220-5, Jun 1996. ISSN 0002-9513.

CRUDO, A. et al. Prenatal synthetic glucocorticoid treatment changes DNA methylation states in male organ systems: multigenerational effects. **Endocrinology**, v. 153, n. 7, p. 3269-83, Jul 2012. ISSN 1945-7170.

DAMPNEY, R. A. Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives. **Adv Physiol Educ**, v. 40, n. 3, p. 283-96, Sep 2016. ISSN 1522-1229.

DAVE, K. R. et al. Ischemic preconditioning preserves mitochondrial function after global cerebral ischemia in rat hippocampus. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 21, n. 12, p. 1401-10, Dec 2001. ISSN 0271-678X.

DE BRITO ALVES, J. L. et al. Maternal protein restriction induced-hypertension is associated to oxidative disruption at transcriptional and functional levels in the medulla oblongata. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 43, n. 12, p. 1177-1184, Dec 2016. ISSN 1440-1681.

DE BRITO ALVES, J. L. et al. Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. **Br J Nutr**, v. 111, n. 4, p. 606-15, Feb 2014. ISSN 1475-2662.

DE MARINIS, E. et al. 17beta-Oestradiol anti-inflammatory effects in primary astrocytes require oestrogen receptor beta-mediated neuroglobin up-regulation. **J Neuroendocrinol**, v. 25, n. 3, p. 260-70, Mar 2013. ISSN 0953-8194.

DI NUNZIO, M.; VALLI, V.; BORDONI, A. PUFA and oxidative stress. Differential modulation of the cell response by DHA. **Int J Food Sci Nutr**, v. 67, n. 7, p. 834-43, Nov 2016. ISSN 0963-7486.

DIAZ-HUNG, M. L. et al. Transient glutathione depletion in the substantia nigra compacta is associated with neuroinflammation in rats. **Neuroscience**, v. 335, p. 207-20, Oct 29 2016. ISSN 0306-4522.

DIRNAGL, U.; MEISEL, A. Endogenous neuroprotection: mitochondria as gateways to cerebral preconditioning? **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 334-44, Sep 2008. ISSN 0028-3908.

DIRNAGL, U.; SIMON, R. P.; HALLENBECK, J. M. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. **Trends Neurosci**, v. 26, n. 5, p. 248-54, May 2003. ISSN 0166-2236.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Prog Neurobiol**, v. 62, n. 6, p. 649-71, Dec 2000. ISSN 0301-0082.

DRINGEN, R.; GUTTERER, J. M.; HIRRLINGER, J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 16, p. 4912-6, Aug 2000. ISSN 0014-2956.

DUNN, G. A.; BALE, T. L. Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage. **Endocrinology**, v. 152, n. 6, p. 2228-36, Jun 2011. ISSN 1945-7170.

DUTRA-TAVARES, A. C. et al. Locomotor response to acute nicotine in adolescent mice is altered by maternal undernutrition during lactation. **Int J Dev Neurosci**, v. 47, n. Pt B, p. 278-85, Dec 2015. ISSN 1873-474X.

EHINGER, J. K. et al. Mitochondrial dysfunction in blood cells from amyotrophic lateral sclerosis patients. **J Neurol**, v. 262, n. 6, p. 1493-503, Jun 2015. ISSN 1432-1459.

ERECINSKA, M.; CHERIAN, S.; SILVER, I. A. Energy metabolism in mammalian brain during development. **Prog Neurobiol**, v. 73, n. 6, p. 397-445, Aug 2004. ISSN 0301-0082.

ESCOBALES, N.; CRESPO, M. J. Oxidative-nitrosative stress in hypertension. **Curr Vasc Pharmacol**, v. 3, n. 3, p. 231-46, Jul 2005. ISSN 1570-1611.

ESLER, M. The 2009 Carl Ludwig Lecture: Pathophysiology of the human sympathetic nervous system in cardiovascular diseases: the transition from mechanisms to medical management. **J Appl Physiol (1985)**, v. 108, n. 2, p. 227-37, Feb 2010a. ISSN 1522-1601.

The 2009 Carl Ludwig Lecture: Pathophysiology of the human sympathetic nervous system in cardiovascular diseases: the transition from mechanisms to medical management. **J Appl Physiol**, v. 108, n. 2, p. 227-37, Feb 2010b. ISSN 1522-1601.

ESLER, M.; LAMBERT, E.; SCHLAICH, M. Point: Chronic activation of the sympathetic nervous system is the dominant contributor to systemic hypertension. **J Appl Physiol (1985)**, v. 109, n. 6, p. 1996-8; discussion 2016, Dec 2010. ISSN 1522-1601.

FAIZI, M. et al. Schizophrenia induces oxidative stress and cytochrome C release in isolated rat brain mitochondria: a possible pathway for induction of apoptosis and neurodegeneration. **Iran J Pharm Res**, v. 13, n. Suppl, p. 93-100, Winter 2014. ISSN 1735-0328.

FEOLI, A. M. et al. Developmental changes in content of glial marker proteins in rats exposed to protein malnutrition. **Brain Res**, v. 1187, p. 33-41, Jan 2 2008. ISSN 0006-8993.

FEOLI, A. M. et al. Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to pre- and postnatal protein malnutrition. **J Nutr**, v. 136, n. 9, p. 2357-61, Sep 2006. ISSN 0022-3166.

FEOLI, A. M. et al. Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. **Nutrition**, v. 22, n. 2, p. 160-5, Feb 2006. ISSN 0899-9007.

FERREIRA, D. J. et al. Mitochondrial bioenergetics and oxidative status disruption in brainstem of weaned rats: Immediate response to maternal protein restriction. **Brain Res**, Apr 21 2016. ISSN 1872-6240.

FERREIRA, D. S. et al. Perinatal low-protein diet alters brainstem antioxidant metabolism in adult offspring. **Nutr Neurosci**, Jun 2 2015. ISSN 1476-8305.

FOLBERGROVA, J. et al. Status Epilepticus in Immature Rats Is Associated with Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. **Front Cell Neurosci**, v. 10, p. 136, 2016. ISSN 1662-5102.

FRANCIS, J.; DAVISSON, R. L. Emerging concepts in hypertension. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 1, p. 69-73, Jan 1 2014. ISSN 1557-7716 (Electronic) 1523-0864.

FRANTZ, E. D. et al. Transgenerational endocrine pancreatic adaptation in mice from maternal protein restriction in utero. **Mech Ageing Dev**, v. 132, n. 3, p. 110-6, Mar 2011. ISSN 1872-6216.

FRIEDLAND-LEUNER, K. et al. Mitochondrial dysfunction: cause and consequence of Alzheimer's disease. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 127, p. 183-210, 2014. ISSN 1878-0814.

FRIEDLANDER, A. H.; JONES, L. J. The biology, medical management, and podiatric implications of menopause. **J Am Podiatr Med Assoc**, v. 92, n. 8, p. 437-43, Sep 2002. ISSN 8750-7315 (Print) 1930-8264.

FRISANCHO, A. R. Reduced rate of fat oxidation: a metabolic pathway to obesity in the developing nations. **Am J Hum Biol**, v. 15, n. 4, p. 522-32, Jul-Aug 2003. ISSN 1042-0533.

FUKUOKA, H.; SATA, F. Molecular Mechanism of Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD). **Nihon Eiseigaku Zasshi**, v. 71, n. 3, p. 185-187, 2016. ISSN 0021-5082.

GIULIVI, C.; BOVERIS, A.; CADENAS, E. Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in mitochondrial DNA. **Arch Biochem Biophys**, v. 316, n. 2, p. 909-16, Feb 1 1995. ISSN 0003-9861.

GODFREY, K. M. The role of the placenta in fetal programming-a review. **Placenta**, v. 23 Suppl A, p. S20-7, Apr 2002. ISSN 0143-4004.

GRESSENS, P. et al. Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 103, n. 1, p. 21-35, Oct 20 1997. ISSN 0165-3806.

GU, F.; CHAUHAN, V.; CHAUHAN, A. Glutathione redox imbalance in brain disorders. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 18, n. 1, p. 89-95, Jan 2015. ISSN 1473-6519.

GUEVARA, R. et al. Age and sex-related changes in rat brain mitochondrial oxidative status. **Exp Gerontol**, v. 46, n. 11, p. 923-8, Nov 2011. ISSN 1873-6815.

GUEVARA, R. et al. Sex-dependent differences in aged rat brain mitochondrial function and oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 46, n. 2, p. 169-75, Jan 15 2009. ISSN 1873-4596.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 5, p. 335-46, May 2006. ISSN 1471-003X (Print) 1471-003X.

GUYENET, P. G. et al. The retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. **Adv Exp Med Biol**, v. 605, p. 327-32, 2008. ISSN 0065-2598 (Print) 0065-2598.

GUYENET, P. G.; STORNETTA, R. L.; BAYLISS, D. A. Retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. **J Physiol**, v. 586, n. 8, p. 2043-8, Apr 15 2008. ISSN 1469-7793.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases (rat and human). **Methods Enzymol**, v. 77, p. 218-31, 1981. ISSN 0076-6879.

HABIG, W. H. et al. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 71, n. 10, p. 3879-82, Oct 1974. ISSN 0027-8424.

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. ISSN 0021-9258.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J Neurochem**, v. 97, n. 6, p. 1634-58, Jun 2006. ISSN 0022-3042.

HALLIWELL, G. A. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford University Press**, n. 4th 2006.

HAMEED, L. S. et al. Environmental changes in oxygen tension reveal ROS-dependent neurogenesis and regeneration in the adult newt brain. **Elife**, v. 4, Oct 20 2015. ISSN 2050-084x.

HANAFI, M. Y. et al. Transgenerational effects of obesity and malnourishment on diabetes risk in F2 generation. **Mol Cell Biochem**, v. 412, n. 1-2, p. 269-80, Jan 2016. ISSN 1573-4919.

HARRISON, M.; LANGLEY-EVANS, S. C. Intergenerational programming of impaired nephrogenesis and hypertension in rats following maternal protein restriction during pregnancy. **Br J Nutr**, v. 101, n. 7, p. 1020-30, Apr 2009. ISSN 1475-2662.

HATTORI, N. [Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease: from mitochondrial dysfunctions to familial Parkinson's disease]. **Rinsho Shinkeigaku**, v. 44, n. 4-5, p. 241-62, Apr-May 2004. ISSN 0009-918X.

HAYLETT, W. et al. Altered Mitochondrial Respiration and Other Features of Mitochondrial Function in Parkin-Mutant Fibroblasts from Parkinson's Disease Patients. **Parkinsons Dis**, v. 2016, p. 1819209, 2016. ISSN 2090-8083.

HEARD, E.; MARTIENSSEN, R. A. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 95-109, Mar 27 2014. ISSN 1097-4172.

HERNANDES, A. S.; ALMEIDA, S. S. Postnatal protein malnutrition affects inhibitory avoidance and risk assessment behaviors in two models of anxiety in rats. **Nutr Neurosci**, v. 6, n. 4, p. 213-9, Aug 2003. ISSN 1028-415X.

HIEBERT, J. B. et al. Traumatic Brain Injury and Mitochondrial Dysfunction. **Am J Med Sci**, Jun 16 2015. ISSN 1538-2990.

HIROOKA, Y. Role of reactive oxygen species in brainstem in neural mechanisms of hypertension. **Auton Neurosci**, v. 142, n. 1-2, p. 20-4, Nov 3 2008. ISSN 1566-0702.

HIRSCH, L. et al. The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Neuroepidemiology**, v. 46, n. 4, p. 292-300, 2016. ISSN 0251-5350.

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. ISSN 0003-2697 (Print).

HOFFMAN, D. J. et al. Why are nutritionally stunted children at increased risk of obesity? Studies of metabolic rate and fat oxidation in shantytown children from Sao Paulo, Brazil. **Am J Clin Nutr**, v. 72, n. 3, p. 702-7, Sep 2000. ISSN 0002-9165.

HONORIO DE MELO MARTIMIANO, P. et al. Maternal protein-restriction during gestation and lactation in the rat results in increased brain levels of kynurenine and kynurenic acid in their adult offspring. **J Neurochem**, Oct 25 2016. ISSN 1471-4159.

IDE, T. et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. **Circ Res**, v. 88, n. 5, p. 529-35, Mar 16 2001. ISSN 1524-4571.

ILOPEZ-CAMPISTROUS, A. et al. Mitochondrial dysfunction in the hypertensive rat brain: respiratory complexes exhibit assembly defects in hypertension. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 412-9, Feb 2008. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X.

INDO, H. P. et al. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. **J Clin Biochem Nutr**, v. 56, n. 1, p. 1-7, Jan 2015. ISSN 0912-0009.

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

ISLAM, M. T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. **Neurol Res**, p. 1-10, Nov 3 2016. ISSN 0161-6412.

JIANG, T.; SUN, Q.; CHEN, S. Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. **Prog Neurobiol**, Oct 18 2016. ISSN 0301-0082.

JIMENEZ-CHILLARON, J. C. et al. Intergenerational transmission of glucose intolerance and obesity by in utero undernutrition in mice. **Diabetes**, v. 58, n. 2, p. 460-8, Feb 2009. ISSN 1939-327X.

JIRTLE, R. L.; SKINNER, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nat Rev Genet**, v. 8, n. 4, p. 253-62, Apr 2007. ISSN 1471-0056.

JOHNSON, M. H. Functional brain development in humans. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 7, p. 475-83, Jul 2001. ISSN 1471-003X.

JOMOVA, K. et al. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Mol Cell Biochem**, v. 345, n. 1-2, p. 91-104, Dec 2010. ISSN 0300-8177.

KAATI, G.; BYGREN, L. O.; EDVINSSON, S. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. **Eur J Hum Genet**, v. 10, n. 11, p. 682-8, Nov 2002. ISSN 1018-4813.

KAATI, G. et al. Transgenerational response to nutrition, early life circumstances and longevity. **Eur J Hum Genet**, v. 15, n. 7, p. 784-90, Jul 2007. ISSN 1018-4813.

KAWAMURA, M. et al. Undernutrition in utero augments systolic blood pressure and cardiac remodeling in adult mouse offspring: possible involvement of local cardiac angiotensin system in developmental origins of cardiovascular disease. **Endocrinology**, v. 148, n. 3, p. 1218-25, Mar 2007. ISSN 0013-7227.

KILBAUGH, T. J. et al. Peripheral Blood Mitochondrial DNA as a Biomarker of Cerebral Mitochondrial Dysfunction following Traumatic Brain Injury in a Porcine Model. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0130927, 2015. ISSN 1932-6203.

KIMURA, Y. et al. Overexpression of inducible nitric oxide synthase in rostral ventrolateral medulla causes hypertension and sympathoexcitation via an increase in oxidative stress. **Circ Res**, v. 96, n. 2, p. 252-60, Feb 4 2005. ISSN 0009-7330.

KING, V. et al. Maternal obesity has little effect on the immediate offspring but impacts on the next generation. **Endocrinology**, v. 154, n. 7, p. 2514-24, Jul 2013. ISSN 1945-7170.

KISHI, T. et al. Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Circulation**, v. 109, n. 19, p. 2357-62, May 18 2004. ISSN 1524-4539.

KOKUBO, Y.; IWASHIMA, Y. Higher blood pressure as a risk factor for diseases other than stroke and ischemic heart disease. **Hypertension**, v. 66, n. 2, p. 254-9, Aug 2015. ISSN 1524-4563.

KUDIN, A. P.; DEBSKA-VIELHABER, G.; KUNZ, W. S. Characterization of superoxide production sites in isolated rat brain and skeletal muscle mitochondria. **Biomed Pharmacother**, v. 59, n. 4, p. 163-8, May 2005. ISSN 0753-3322 (Print) 0753-3322.

KUMAGAI, H. et al. Importance of rostral ventrolateral medulla neurons in determining efferent sympathetic nerve activity and blood pressure. **Hypertens Res**, v. 35, n. 2, p. 132-41, Feb 2012. ISSN 1348-4214.

KUMAR, A. et al. Role of Glutathione-S-transferases in neurological problems. **Expert Opin Ther Pat**, p. 1-11, Nov 10 2016. ISSN 1354-3776.

LAGRANHA, C. J. et al. Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. **Circ Res**, v. 106, n. 11, p. 1681-91, Jun 11 2010. ISSN 1524-4571.

LAKSHMY, R. Metabolic syndrome: Role of maternal undernutrition and fetal programming. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 14, n. 3, p. 229-40, Sep 2013. ISSN 1573-2606.

LAM, M. K. et al. Second generation effects of maternal alcohol consumption during pregnancy in rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 24, n. 4, p. 619-31, May 2000. ISSN 0278-5846.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem Res Toxicol**, v. 5, n. 2, p. 227-31, Mar-Apr 1992. ISSN 0893-228X.

LILLYCROP, K. A. et al. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. **J Nutr**, v. 135, n. 6, p. 1382-6, Jun 2005. ISSN 0022-3166.

LONG, P. et al. Caloric restriction restores the cardioprotective effect of preconditioning in the rat heart. **Mech Ageing Dev**, v. 123, n. 10, p. 1411-3, Jul 2002. ISSN 0047-6374.

LOPES DE SOUZA, S. et al. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. **Eur J Neurosci**, v. 27, n. 6, p. 1400-8, Mar 2008. ISSN 1460-9568.

LOPEZ-CAMPISTROUS, A. et al. Mitochondrial dysfunction in the hypertensive rat brain: respiratory complexes exhibit assembly defects in hypertension. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 412-9, Feb 2008. ISSN 1524-4563.

LOU, S. et al. Oxygen consumption deficit in Huntington disease mouse brain under metabolic stress. **Hum Mol Genet**, May 18 2016. ISSN 0964-6906.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Found Symp**, v. 156, p. 38-50; discussion 50-5, 1991. ISSN 0300-5208.

MACHADO, B. H. et al. Autonomic processing of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarius. **Braz J Med Biol Res**, v. 30, n. 4, p. 533-43, Apr 1997. ISSN 0100-879X.

MAHSOUDI, B.; LI, A.; O'NEILL, C. Assessment of the long-term and transgenerational consequences of perturbing preimplantation embryo development in mice. **Biol Reprod**, v. 77, n. 5, p. 889-96, Nov 2007. ISSN 0006-3363.

MAJZUNOVA, M. et al. Redox signaling in pathophysiology of hypertension. **J Biomed Sci**, v. 20, p. 69, 2013. ISSN 1423-0127.

MANDA-HANDZLIK, A.; DEMKOW, U. Neutrophils: The Role of Oxidative and Nitrosative Stress in Health and Disease. **Adv Exp Med Biol**, v. 857, p. 51-60, 2015. ISSN 0065-2598 (Print) 0065-2598.

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. ISSN 1519-6984.

MARINA, N. et al. Brainstem hypoxia contributes to the development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 65, n. 4, p. 775-83, Apr 2015. ISSN 1524-4563.

MARTIN, J. F. et al. Nutritional origins of insulin resistance: a rat model for diabetes-prone human populations. **J Nutr**, v. 130, n. 4, p. 741-4, Apr 2000. ISSN 0022-3166.

MARTINS, D. B. et al. 17-beta estradiol in the acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain and blood of ovariectomized adult and middle-aged rats. **Life Sci**, v. 90, n. 9-10, p. 351-9, Feb 27 2012. ISSN 0024-3205.

MAXIMO CARDOSO, L. et al. Cardiovascular responses produced by central injection of hydrogen peroxide in conscious rats. **Brain Res Bull**, v. 71, n. 1-3, p. 37-44, Dec 11 2006. ISSN 0361-9230.

MAZZETTI, A. P. et al. Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. **Neurochem Int**, v. 82, p. 10-8, Mar 2015. ISSN 1872-9754 (Electronic) 0197-0186.

MCGAUGHY, J. A. et al. Prenatal malnutrition leads to deficits in attentional set shifting and decreases metabolic activity in prefrontal subregions that control executive function. **Dev Neurosci**, v. 36, n. 6, p. 532-41, 2014. ISSN 1421-9859.

MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U. Protective conditioning of the brain: expressway or roadblock? **J Physiol**, v. 589, n. Pt 17, p. 4147-55, Sep 1 2011. ISSN 1469-7793 (Electronic).

MIFFLIN, S. W. Arterial chemoreceptor input to nucleus tractus solitarius. **Am J Physiol**, v. 263, n. 2 Pt 2, p. R368-75, Aug 1992. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513.

MISIAK, M.; BEYER, C.; ARNOLD, S. Gender-specific role of mitochondria in the vulnerability of 6-hydroxydopamine-treated mesencephalic neurons. **Biochim Biophys Acta**, v. 1797, n. 6-7, p. 1178-88, Jun-Jul 2010. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002.

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. ISSN 0021-9258.

MORGANE, P. J. et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 17, n. 1, p. 91-128, Spring 1993. ISSN 0149-7634.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 26, n. 4, p. 471-83, Jun 2002. ISSN 0149-7634.

NASCIMENTO, L. et al. The effect of maternal low-protein diet on the heart of adult offspring: role of mitochondria and oxidative stress. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 39, n. 8, p. 880-887, Aug 2014. ISSN 1715-5320.

NAYAK, P.; CHATTERJEE, A. K. Dietary protein restriction causes modification in aluminum-induced alteration in glutamate and GABA system of rat brain. **BMC Neurosci**, v. 4, p. 4, Feb 25 2003. ISSN 1471-2202.

NELSON, L. R.; BULUN, S. E. Estrogen production and action. **J Am Acad Dermatol**, v. 45, n. 3 Suppl, p. S116-24, Sep 2001. ISSN 0190-9622 (Print) 0190-9622.

NIKI, E. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. **Biofactors**, v. 34, n. 2, p. 171-80, 2008. ISSN 0951-6433.

NISHIHARA, M. et al. Oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla modulates excitatory and inhibitory inputs in spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens**, v. 30, n. 1, p. 97-106, Jan 2012. ISSN 1473-5598.

NURLIYANA, A. R. et al. Early nutrition, growth and cognitive development of infants from birth to 2 years in Malaysia: a study protocol. **BMC Pediatr**, v. 16, n. 1, p. 160, Sep 29 2016. ISSN 1471-2431.

OKAZAWA, H. et al. Brain imaging for oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. **Q J Nucl Med Mol Imaging**, v. 58, n. 4, p. 387-97, Dec 2014. ISSN 1824-4785.

OLIVEIRA, E. L. et al. A low protein diet causes an increase in the basal levels and variability of mean arterial pressure and heart rate in Fisher rats. **Nutr Neurosci**, v. 7, n. 4, p. 201-5, Aug 2004. ISSN 1028-415X.

PAHRUDIN ARROZI, A. et al. Antioxidant modulation in restoring mitochondrial function in neurodegeneration. **Int J Neurosci**, p. 1-43, Apr 13 2016. ISSN 1563-5279.

PAINTER, R. C. et al. Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life. **BJOG**, v. 115, n. 10, p. 1243-9, Sep 2008. ISSN 1471-0528.

PALOMO, G. M.; MANFREDI, G. Exploring new pathways of neurodegeneration in ALS: the role of mitochondria quality control. **Brain Res**, v. 1607, p. 36-46, May 14 2015. ISSN 1872-6240.

PARTADIREDJA, G.; SIMPSON, R.; BEDI, K. S. The effects of pre-weaning undernutrition on the expression levels of free radical deactivating enzymes in the mouse brain. **Nutr Neurosci**, v. 8, n. 3, p. 183-93, Jun 2005. ISSN 1028-415X (Print) 1028-415X.

PARTADIREDJA, G.; WORRALL, S.; BEDI, K. S. Early life undernutrition alters the level of reduced glutathione but not the activity levels of reactive oxygen species enzymes or lipid peroxidation in the mouse forebrain. **Brain Res**, v. 1285, p. 22-9, Aug 18 2009. ISSN 0006-8993.

PEARSON, J. N. et al. Reactive oxygen species mediate cognitive deficits in experimental temporal lobe epilepsy. **Neurobiol Dis**, v. 82, p. 289-97, Oct 2015. ISSN 0969-9961 (Print) 0969-9961.

PEIXOTO-SILVA, N. et al. Maternal protein restriction in mice causes adverse metabolic and hypothalamic effects in the F1 and F2 generations. **Br J Nutr**, v. 106, n. 9, p. 1364-73, Nov 2011. ISSN 1475-2662.

PENITENTE, A. R. et al. Malnutrition enhances cardiovascular responses to chemoreflex activation in awake rats. **Life Sci**, v. 81, n. 7, p. 609-14, Jul 26 2007. ISSN 0024-3205.

PETERSON, J. R.; SHARMA, R. V.; DAVISSON, R. L. Reactive oxygen species in the neuropathogenesis of hypertension. **Curr Hypertens Rep**, v. 8, n. 3, p. 232-41, Jun 2006. ISSN 1522-6417.

PIETRANERA, L. et al. 17alpha-Oestradiol-induced neuroprotection in the brain of spontaneously hypertensive rats. **J Neuroendocrinol**, v. 26, n. 5, p. 310-20, May 2014. ISSN 0953-8194.

PINHEIRO, A. R. et al. Protein restriction during gestation and/or lactation causes adverse transgenerational effects on biometry and glucose metabolism in F1 and F2 progenies of rats. **Clin Sci (Lond)**, v. 114, n. 5, p. 381-92, Mar 2008. ISSN 1470-8736.

PIRES, K. M.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Early renal structure alteration in rat offspring from dams fed low protein diet. **Life Sci**, v. 79, n. 22, p. 2128-34, Oct 26 2006. ISSN 0024-3205.

PRADO, E. L.; DEWEY, K. G. Nutrition and brain development in early life. **Nutr Rev**, v. 72, n. 4, p. 267-84, Apr 2014. ISSN 1753-4887 (Electronic) 0029-6643.

RAJASEKARAN, A. et al. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: pathways, mechanisms and implications. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 48, p. 10-21, Jan 2015. ISSN 1873-7528 (Electronic) 0149-7634.

RAVATI, A. et al. Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species and activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. **J Neurochem**, v. 78, n. 4, p. 909-19, Aug 2001. ISSN 0022-3042.

.

RAVELLI, A. C. et al. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. **Am J Clin Nutr**, v. 70, n. 5, p. 811-6, Nov 1999. ISSN 0002-9165.

.

REALE, M. et al. Mitochondria as an easy target to oxidative stress events in Parkinson's disease. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 11, n. 4, p. 430-8, Jun 1 2012. ISSN 1996-3181.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993. ISSN 0022-3166.

REQUEJO-AGUILAR, R.; BOLANOS, J. P. Mitochondrial control of cell bioenergetics in Parkinson's disease. **Free Radic Biol Med**, Apr 16 2016. ISSN 1873-4596.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 357-63, 1994. ISSN 0076-6879.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, E. et al. Mitochondrial dysfunction in the hippocampus of rats caused by chronic oxidative stress. **Neuroscience**, v. 252, p. 384-95, Nov 12 2013. ISSN 1873-7544.

RUSHMORE, J.; LUEBKE, J.; GALLER, J. R. Electrophysiological properties of rat hippocampal principal cells are unaltered by prenatal protein malnutrition. **Hippocampus**, v. 8, n. 4, p. 380-9, 1998. ISSN 1050-9631.

RYAN, K. J. Biochemistry of aromatase: significance to female reproductive physiology. **Cancer Res**, v. 42, n. 8 Suppl, p. 3342s-3344s, Aug 1982. ISSN 0008-5472.

SACCON, R. A. et al. Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? **Brain**, v. 136, n. Pt 8, p. 2342-58, Aug 2013. ISSN 1460-2156.

SIDDIQUI, A. N. et al. Neuroprotective Role of Steroidal Sex Hormones: An Overview. **CNS Neurosci Ther**, v. 22, n. 5, p. 342-50, May 2016. ISSN 1755-5930.

SIMPKINS, J. W.; DYKENS, J. A. Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. **Brain Res Rev**, v. 57, n. 2, p. 421-30, Mar 2008. ISSN 0165-0173.

.

SINGH, T. D.; SHANKAR, R. Developmental regulation and effect of early undernutrition on phosphorylation of rat cortical synaptic membrane proteins. **Int J Dev Neurosci**, v. 17, n. 7, p. 743-51, Nov 1999. ISSN 0736-5748.

SINGHAL, A. et al. Programming of lean body mass: a link between birth weight, obesity, and cardiovascular disease? **Am J Clin Nutr**, v. 77, n. 3, p. 726-30, Mar 2003. ISSN 0002-9165.

SKINNER, M. K. What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2. **Reprod Toxicol**, v. 25, n. 1, p. 2-6, Jan 2008. ISSN 0890-6238 (Print) 0890-6238 (Linking).

SLAMBEROVA, R.; RILEY, M. A.; VATHY, I. Cross-generational effect of prenatal morphine exposure on neurobehavioral development of rat pups. **Physiol Res**, v. 54, n. 6, p. 655-60, 2005. ISSN 0862-8408.

SMEYNE, M.; SMEYNE, R. J. Glutathione metabolism and Parkinson's disease. **Free Radic Biol Med**, v. 62, p. 13-25, Sep 2013. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking).

SPENCER, J. P. et al. Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. **J Neurochem**, v. 71, n. 5, p. 2112-22, Nov 1998. ISSN 0022-3042 (Print) 0022-3042.

SPYER, K. M.; GOURINE, A. V. Chemosensory pathways in the brainstem controlling cardiorespiratory activity. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 364, n. 1529, p. 2603-10, Sep 12 2009. ISSN 1471-2970.

SULTANA, R.; PERLUIGI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insights into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics. **Antioxid Redox Signal**, v. 8, n. 11-12, p. 2021-37, Nov-Dec 2006. ISSN 1523-0864.

SWOMLEY, A. M.; BUTTERFIELD, D. A. Oxidative stress in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: evidence from human data provided by redox proteomics. **Arch Toxicol**, Jul 1 2015. ISSN 1432-0738.

SZYF, M. Nongenetic inheritance and transgenerational epigenetics. **Trends Mol Med**, v. 21, n. 2, p. 134-44, Feb 2015. ISSN 1471-499X.

TATLI, M. et al. Comparison of the effects of maternal protein malnutrition and intrauterine growth restriction on redox state of central nervous system in offspring rats. **Brain Res**, v. 1156, p. 21-30, Jul 2 2007. ISSN 0006-8993.

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

TROULINAKI, K.; BANO, D. Mitochondrial deficiency: a double-edged sword for aging and neurodegeneration. **Front Genet**, v. 3, p. 244, 2012. ISSN 1664-8021.

VALADARES, C. T.; DE SOUSA ALMEIDA, S. Early protein malnutrition changes learning and memory in spaced but not in condensed trials in the Morris water-maze. **Nutr Neurosci**, v. 8, n. 1, p. 39-47, Feb 2005. ISSN 1028-415X.

VAN ZUTPHEN, L. F. Toxicity testing and genetic quality control. **J Exp Anim Sci**, v. 35, n. 5-6, p. 202-9, Sep 1993. ISSN 0939-8600.

VICKERS, M. H. Developmental programming and transgenerational transmission of obesity. **Ann Nutr Metab**, v. 64 Suppl 1, p. 26-34, 2014. ISSN 1421-9697.

VILLAR-MARTINI, V. C. et al. Hypertension and kidney alterations in rat offspring from low protein pregnancies. **J Hypertens Suppl**, v. 27, n. 6, p. S47-51, Aug 2009. ISSN 0952-1178.

WANG, G. et al. NADPH oxidase contributes to angiotensin II signaling in the nucleus tractus solitarius. **J Neurosci**, v. 24, n. 24, p. 5516-24, Jun 16 2004. ISSN 1529-2401.

WANG, L.; XU, R. J. The effects of perinatal protein malnutrition on spatial learning and memory behaviour and brain-derived neurotrophic factor concentration in the brain tissue in young rats. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 16 Suppl 1, p. 467-72, 2007. ISSN 0964-7058.

WANG, X.; MICHAELIS, E. K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Front Aging Neurosci**, v. 2, p. 12, 2010. ISSN 1663-4365.

WARD, R. J. et al. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. **Lancet Neurol**, v. 13, n. 10, p. 1045-60, Oct 2014. ISSN 1474-4422.

WHO. Global Status Report, Non Communicable Diseases 2014. (ed.) **World Health Organization**, 2014.

WINCHESTER, S. B. et al. Prematurity, Birth Weight, and Socioeconomic Status Are Linked to Atypical Diurnal Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity in Young Adults. **Res Nurs Health**, v. 39, n. 1, p. 15-29, Feb 2016. ISSN 0160-6891.

WRITING GROUP, M. et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 133, n. 4, p. e38-60, Jan 26 2016. ISSN 1524-4539.

YAO, J. et al. Estrogen protection against mitochondrial toxin-induced cell death in hippocampal neurons: antagonism by progesterone. **Brain Res**, v. 1379, p. 2-10, Mar 16 2011. ISSN 1872-6240.

YAO, J. et al. Ovarian hormone loss induces bioenergetic deficits and mitochondrial beta-amyloid. **Neurobiol Aging**, v. 33, n. 8, p. 1507-21, Aug 2012. ISSN 1558-1497.

YIM, H. E. et al. Postnatal early overnutrition causes long-term renal decline in aging male rats. **Pediatr Res**, v. 75, n. 2, p. 259-65, Feb 2014. ISSN 1530-0447.

YUAN, N. et al. SOD1 gene transfer into paraventricular nucleus attenuates hypertension and sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats. **Pflugers Arch**, v. 465, n. 2, p. 261-70, Feb 2013. ISSN 1432-2013.

ZAMBRANO, E. et al. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. **J Physiol**, v. 566, n. Pt 1, p. 225-36, Jul 1 2005. ISSN 0022-3751.

ZAMENHOF, S.; VAN MARTHENS, E.; GRAUEL, L. DNA (cell number) in neonatal brain: second generation (F2) alteration by maternal (F0) dietary protein restriction. **Science**, v. 172, n. 3985, p. 850-1, May 21 1971. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

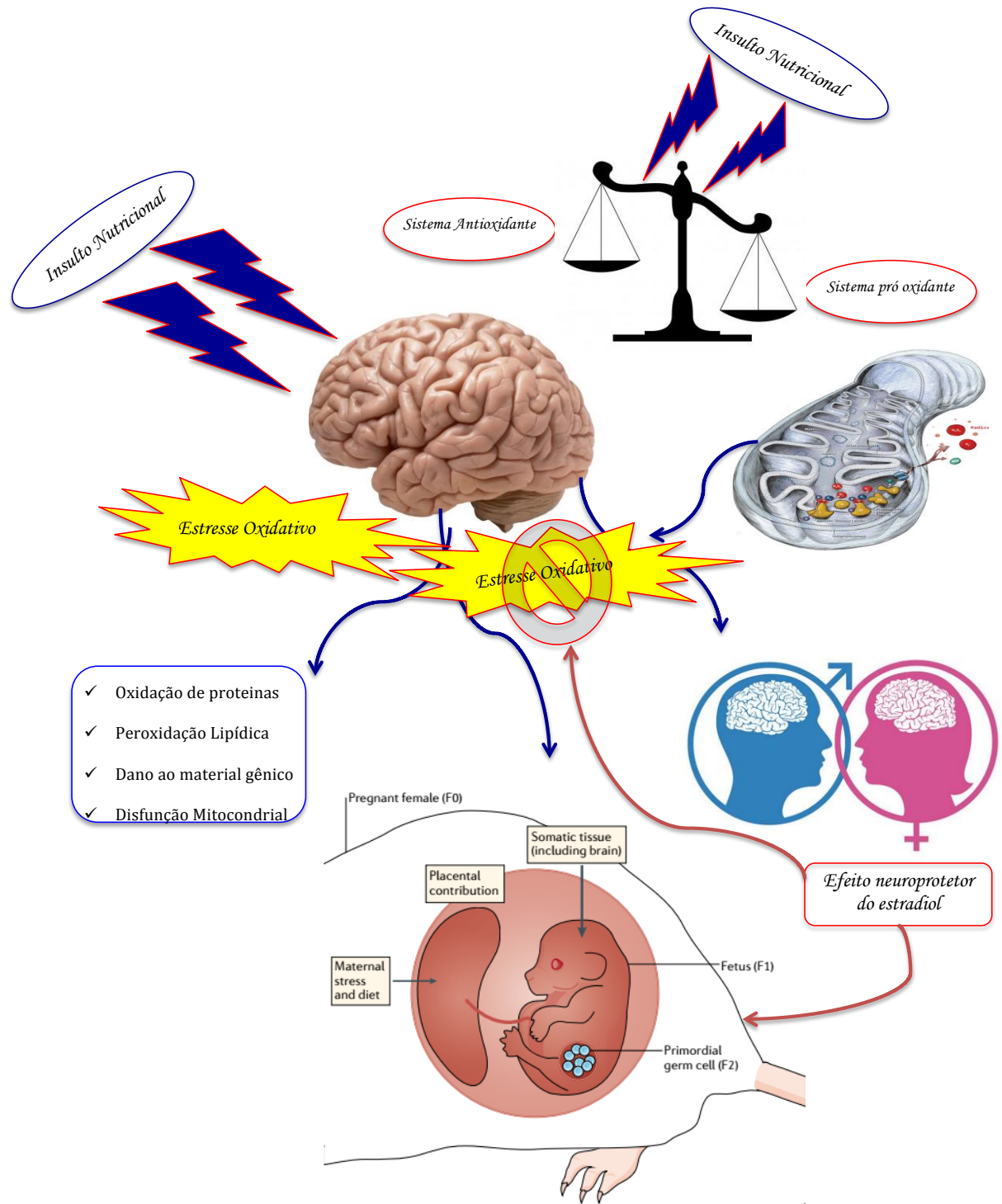
ZANZINGER, J. Mechanisms of action of nitric oxide in the brain stem: role of oxidative stress. **Auton Neurosci**, v. 98, n. 1-2, p. 24-7, Jun 28 2002. ISSN 1566-0702.

ZANZINGER, J.; CZACHURSKI, J. Chronic oxidative stress in the RVLM modulates sympathetic control of circulation in pigs. **Pflugers Arch**, v. 439, n. 4, p. 489-94, Feb 2000. ISSN 0031-6768.

ZIMMERMAN, M. C. et al. Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. **Circ Res**, v. 95, n. 2, p. 210-6, Jul 23 2004. ISSN 1524-4571.



APÊNDICE A – Resumo gráfico da tese



## ANEXO A – Parecer do comitê de ética

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas

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



Recife, 06 de junho de 2013.

Ofício nº 577/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
Para: **Profª Cláudia Jacques Lagranha**  
Universidade Federal de Pernambuco  
Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte - CAV  
Processo nº 23076.018417/2013-73

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **"Pode uma restrição protéica crônica por duas gerações alterar o estresse oxidativo no tronco encefálico de forma distinta entre ratos machos e fêmeas?"**

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

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

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

Origem dos animais: Biotério; Animais: ratos; Linhagem: Wistar; Idade: progenitores adultos, prole jovem (30-40 dias) e adulta (90-110 dias); Peso: 70-100g (jovens) e 250-380g (adultos); Sexo: machos e fêmeas; Nº total de animais: 142

Atenciosamente,

  
Profª Marcia Vasconcelos  
Vice-Presidente do CEUA/CCB-UFPE  
SIAPE 2199635

CCB: Integrar para desenvolver