



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA

GIZELE SANTIAGO DE MOURA SILVA

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL NA SEGUNDA GERAÇÃO DE
RATAS JOVENS: AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO HEPÁTICO DA
PROLE.**

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
CURSO DE EDUCAÇÃO FÍSICA BACHARELADO
NUCLEO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E CIÊNCIAS DO ESPORTE

GIZELE SANTIAGO DE MOURA SILVA

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL NA SEGUNDA GERAÇÃO DE
RATAS JOVENS: AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO HEPÁTICO DA
PROLE.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Pinheiro
Fernandes

Co-Orientadora: Profa. Dra. Claudia Jacques
Lagranha

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2016

Catálogo na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca Setorial do CAV
Bibliotecária Giane da Paz Ferreira Silva - CRB-4/977

S586e Silva, Gizele Santiago de Moura.

Efeitos da restrição proteica perinatal na segunda geração de ratas jovens: avaliação do metabolismo oxidativo hepático da prole / Gizele Santiago de Moura Silva. _ Vitória de Santo Antão, 2016.

51 folhas: il. fig.

Orientador: Mariana Pinheiro Fernandes

Co-Orientadora: Claudia Jacques Lagranha

TCC (Bacharelado em Educação Física) - Universidade Federal de Pernambuco. CAV, Bacharelado em Educação Física, 2016.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Desnutrição proteica perinatal. 2. Metabolismo oxidativo hepático. 3. Estresse oxidativo. I. Fernandes, Mariana Pinheiro. II. Lagranha, Claudia Jacques. III. Título.

796 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-084/2016

GIZELE SANTIAGO DE MOURA SILVA

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL NA SEGUNDA GERAÇÃO DE
RATAS JOVENS: AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO HEPÁTICO DA
PROLE.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Pinheiro Fernandes

Co-orientadora: Profa. Dra. Claudia Jacques Lagranha.

Aprovado em: 01/07/2016.

BANCA EXAMINADORA

Profa^o. Dr. Mariana Pinheiro Fernandes (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa^o. Dr. Matilde Cesiana da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Profa^o. Talitta Ricarly Lopes de Arruda
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu Senhor Jesus por ter me concedido chegar até aqui, por me abençoar todos esses anos, me dando força, sabedoria, coragem e acima de tudo fé, para superar e ultrapassar todos os obstáculos que apareceram durante essa jornada. Agradeço a minha mãe Rosângela e a meu pai José João, por terem me dado o dom da vida, pelo apoio, pela paciência, por terem acreditado no meu potencial, por me ajudarem em todos os momentos, pelos ensinamentos, e por sempre torcerem pelo meu sucesso. Aos meus irmãos Neto, Geisiele e Gesiane, pelo carinho, pelo incentivo e por sempre estarem do meu lado me apoiando e me dando forças. A minha tia Elizabete, que é como uma mãe pra mim, que sempre esteve presente em minha vida, me ajudado, cuidando e torcendo pelas minhas conquistas. A toda minha família, muito obrigado, vocês são a razão pela qual cheguei até aqui, a vocês dedico todo o meu esforço, dedicação e conquistas, vocês são minha base, meu alicerce, meu maior tesouro. Amo todos vocês e que Deus derrame bênçãos sem medida sobre a vida de cada um.

Agradeço ao meu noivo e amor da minha vida Romeu Júnior, pelo amor e carinho, pelo companheirismo, apoio, incentivo e por sempre estar ao meu lado, me ajudando e me dando coragem para seguir em frente. Te amo meu amor! Agradeço também a minha sogra Kátia pelas orações, pela amizade, ajuda, por sempre ter acreditado e torcido por mim, ao meu sogro Romeu, pelo apoio, a ajuda de todos esses anos, pela paciência e pelo incentivo de sempre. Obrigado a todos por tudo que fizeram por mim, serei eternamente grata e que o Senhor ilumine e abençoe a vida de todos vocês.

Agradeço a minha orientadora Mariana Fernandes por ter acreditado em mim, por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse projeto, por todos os ensinamentos e conhecimentos passados, pelo apoio, pela paciência de todos esses anos, por ser essa profissional maravilhosa, sempre dedicada, esforçada, alegre e acima de tudo humilde, que Deus possa iluminar cada vez mais a sua vida, e que você tenha muito sucesso. Agradeço a minha co-orientadora Cláudia Lagranha, pelo incentivo, pela ajuda de sempre, pelos conhecimentos transmitidos, e pela paciência que teve comigo. Muito obrigada!

Aos meus colegas de laboratório, pelos aprendizados e conhecimentos que obtivemos juntos, pela ajuda nos experimentos, pelas risadas e conversas durante todo esse tempo, pelos momentos bons e difíceis que passamos juntos, pelos congressos que participamos e os

passeios que fizemos, a todos vocês que fizeram, e/ou fazem parte do nosso grupo de pesquisa Bionergética mitocondrial, Metabolismo celular e Plasticidade fenotípica (Luciana, Cristiane, Talitta, Aiany, Cássia, Rudá, Alessandra, Aline, Reginaldo, Priscilla, Anderson, Vitória, Diorginis, David, Ramon, Shirley, Máisa, Erica), obrigada por tudo, e muito sucesso para todos vocês.

A toda turma de Bacharelado em Educação Física 2012.2, por todos os momentos que vivemos juntos, pelas risadas, conversas, alegrias e tristezas que passamos, pelas brincadeiras e também pelos momentos de muito estudo, aprendizado, e conhecimento que tivemos, todos os momentos foram incríveis e com certeza irão ficar guardados eternamente em nossas mentes, sentirei muitas saudades de todos vocês. Agradeço também de forma especial aos grandes amigos que conquistei durante essa jornada, Francielly Ketully, Thaís Santos, Mayra Mendes, Mayara Mendes, Bruna Costa e Ewerton Thiago, obrigada por tudo gente, adoro todos vocês, que Deus os ilumine sempre e muito sucesso nessa nova caminhada.

E de uma forma especial, agradeço a todos os professores pelos ensinamentos e pelos conhecimentos que foram passados, pela dedicação, incentivo, e por ter contribuído para minha formação, sem vocês eu não teria chegado aqui, obrigada por tudo.

"Não existem sonhos impossíveis para aqueles que realmente acreditam que o poder realizador reside no interior de cada ser humano, sempre que alguém descobre esse poder algo antes considerado impossível se torna realidade."

(Albert Einstein)

RESUMO

A restrição de nutrientes maternos durante o período crítico de desenvolvimento está sendo apontada como um dos principais fatores no aparecimento de doenças crônicas na vida adulta. Diante disso, o objetivo do trabalho foi estudar a função e o metabolismo oxidativo hepático da segunda geração de ratas jovens submetidas a uma restrição proteica perinatal, e a sua correlação com doenças metabólicas da vida adulta. Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*. O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em Estudos com Animais do Centro de Ciências Biológicas da UFPE (nº 23076.018417/2013-73). As ratas prenhas foram divididas em dois grupos de acordo com a dieta fornecida: controle (C, caseína a 17%) e desnutridas (D, caseína a 8%). Na lactação, as ratas continuaram recebendo dieta experimental conforme o grupo experimental e após o desmame (21 dias de idade), os filhotes receberam dieta de biotério Presence-Purina®. Os animais nascidos a partir do 1º acasalamento (F1) após crescimento, foram acasalados para obtenção da 2ª geração (F2). Os machos (F2) foram avaliados aos 30 dias de idade. Avaliamos o peso corporal e do tecido hepático, e o peso relativo do fígado pelo peso corporal, os níveis de peroxidação lipídica (MDA), oxidação proteica (Carbonilas), grupamentos sulfidrilas (SH), glutatona reduzida (GSH), além da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), Glutathione-S-transferase (GST), além da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Verificou-se uma diminuição no peso corporal (C=101±3.54, n=8 vs D=87,6±2,46g n=8 p<0,01), e no peso do fígado (C=4.10±0.15, n=6 vs D=3.48±0.18g n=6 p<0,05), e aumento do peso relativo nos animais desnutridos em comparação ao grupo controle (C=3,742 ± 0,1402g n=5 vs D=4,452±0,2137g n=5 p<0,05). Os níveis de MDA (C=19.11±0.94, n=10 vs D=12.10±1.07 nmol/mg de proteína(prot.) n=8 p<0,001) e Carbonilas (C=7,242±0,45, n=5 vs D=4,495 ± 0,43 nmols/mg de prot., n=6 p<0,01) foram menores no grupo desnutrido, já os níveis de grupamentos sulfidrilas (C= 0,06±0,004, n=4 vs D=0,076 ± 0,002 nmol/mg de prot., n=5 p<0,01) e GSH (C=36,76 ± 1,83, n=6 vs D=46,96±1,56 µmol/mg de prot., n=6 p<0,01) aumentaram nos animais desnutrido em comparação com o grupo controle. Em relação às enzimas antioxidantes, a atividade da SOD (C=184.6±15.90, n=8 vs D=363.8±89.87 U/mg de prot. n=8 p=0,06) e CAT (C=13.7±0.78, n=8 vs D=15.98±0,61 U/mg de prot. n=9 p<0,05) aumentaram nos animais desnutridos, mas a GPx foi reduzida nesses animais (C=5,27±0,26 n=7 vs D=4.16±0.13 U/mg de prot. n=7 p<0,01), e a atividade da GST (C=230,8±18,19, n=5 vs D=375,3 ± 7,25 U/mg de prot., n=6, p<0,0001) e G6PDH (C=63,65±14,26, n=5 vs D=127,8 ± 7,70 nmol/min/mg de prot., n=5 p<0,01) foi aumentada nos animais desnutridos

em comparação ao grupo controle. Nossos resultados sugerem que os fígados dos animais F2 estão mais resistentes aos efeitos da restrição proteica perinatal, já que não apresentaram um quadro de estresse oxidativo, diante disso, podemos supor que esses animais estão numa tentativa de manter a homeostase metabólica diante do insulto nutricional sofrido no período crítico do desenvolvimento na geração anterior (F1).

Palavras Chaves: Desnutrição proteica perinatal. Metabolismo oxidativo hepático. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

The restriction of maternal nutrients during the critical period of development is being singled out as one of the main factors in the onset of chronic diseases in adulthood. Thus, the objective was to study the function and hepatic oxidative metabolism of the second generation of young rats subjected to perinatal protein restriction, and its correlation with metabolic diseases in adulthood. Rats were used Wistar. The study was approved by the Ethics Committee on Animal studies with the Biological Sciences Center of UFPE (N° 23076.018417/2013-73). The pregnant rats were divided into two groups according to the diet provided: control (C, 17% casein) and malnourished (D, casein, 8%). In lactation, the rats continue to receive experimental diet as the experimental group and after weaning (21 days old) pups received vivarium diet Presence-Purina®. Animals born from the first mating (F1) after growth, were mated to obtain the second generation (F2). Males (F2) were evaluated at 30 days old. We evaluated the body weight and hepatic tissue, and the relative weight of the liver to body weight, lipid peroxidation (MDA) levels, protein oxidation (carbonyl) sulfhydryl groups (SH), reduced glutathione (GSH), and the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase (GST), and Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). There was a decrease in body weight (C=3,54 ± 101 n=8 vs D=87,6 ± 2,46g n=8 p<0.01) and in liver weight (C= 4,10 ± 0.15, n=6 vs D=3,48 ± 0.18g n=6 p<0.05), and increased relative weight in malnourished animals in the control group (C=3,742 ± 0,1402 n=5; D=4,452 ± 0,2137g n=5 p<0.05). MDA levels (C= 19.11 ± 0.94, n=10 vs D=12,10 ± 1,07 nmol/mg protein (Prot.) n=8 p<0.001) and carbonyl (C=7.242 ± 0.45, n=5 vs D=4.495 ± 0.43 nmols/mg prot., n=6, p<0.01) were lower in the unfed group, since the levels of sulfhydryl groups (C=0.06 ± 0.004, n=4 vs D=0.076 ± 0.002 nmol/mg prot., n=5, p<0.01) and GSH (C=36.76 ± 1.83, n=6, vs 46.96 ± D=1, 56 µmol/mg prot., n=6, p<0.01) increased in the malnourished animals compared to the control group. In relation to the antioxidant enzymes SOD activity (C=184.6 ± 15.90, n= 8 vs D=363.8 ± 89.87 U/mg prot. n=8 p=0.06) and CAT (C= 13.7 ± 0.78, n=8 vs D= 15.98 ± 0.61 U/mg prot. n=9 p<0.05) increased in malnourished animals, but these animals was reduced GPx (C=5,27 ± 0,26 n=7 vs D=4,16 ± 0,13 U/mg prot. n=7 p<0.01) and the activity of GST (C=18,19 ± 230,8 n=5 vs D=375,3 ± 7,25 U/mg prot., n=6, p<0.0001) and G6PDH (C=63,65 ± 14,26 n=5 vs D=127,8 ± 7,70 nmol/min/mg prot., n=5, p<0.01) was increased in malnourished animals compared to the control group. Our results suggest that the livers of the F2 animals are more resistant to

the effects of perinatal protein restriction, since it did not have an oxidative stress frame, before that, we can assume that these animals are an attempt to maintain metabolic homeostasis on the nutritional insult suffered the critical period of development in the previous generation (F1).

Key words: Protein malnutrition perinatal. Hepatic oxidative metabolism. Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Defesas antioxidantes enzimáticas.....	19
Figura 2- Desenho do modelo experimental.....	23
Figura 3- Avaliação do peso corporal da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal.....	29
Figura 4- Avaliação do peso do fígado da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal.....	29
Figura 5- Peso relativo do tecido hepático pelo peso corporal da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal.....	29
Figura 6- Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica (MDA) no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal.....	30
Figura 7- Avaliação dos níveis de oxidação proteica (CARBOLINAS) no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidos à restrição proteica perinatal.....	31
Figura 8- Avaliação dos níveis de grupamentos sulfidrilas (SH) no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal.....	32
Figura 9- Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal.....	32
Figura 10- Avaliação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal.....	34

Figura 11- Avaliação da atividade da Catalase (CAT) no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal.....	34
Figura 12- Avaliação da atividade da Glutathione Peroxidase (GPx) no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal.....	35
Figura 13- Avaliação da atividade da enzima Glutathione-S-transferase (GST) no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal.....	35
Figura 14- Avaliação da atividade da enzima Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal.....	35
Quadro 1- Composição de dieta experimental isocalórica com diferentes teores de proteína.....	24

LISTA DE ABREVIações

C	Controle
CAT	Catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
D	Desnutrido
DNPH	2,4-dinitrofenilidrazina
DNP-SG	Dinitro fenil-S-glutationa
DOHaD	Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis nitrobenzóico
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EROS	Espécies reativas de oxigênio
F0	Mãe
F1	Primeira geração
F2	Segunda geração
g	Gramas
GPx	Glutationa Peroxidase
GR	Glutationa Redutase
GSH	Glutationa Reduzida
GSSG	Glutationa Oxidada
GST	Glutationa-S-transferase
G6PDH	Glicose 6- fosfato desidrogenase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
LPO	Lipoperóxidação
MDA	Malondialdeído
mM	Milimolar
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
PC	Peso corporal
PF	Peso do fígado
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Flúor fenilmetanossulfonilo
RPM	Rotação por minuto

SH	Sulfidrina
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico

Sumário

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Plasticidade fenotípica e doenças metabólicas	19
2.2 Disfunção hepática e estresse oxidativo	20
2.3 Epigenética e Nutrição	22
3 OBJETIVOS	25
4 MATERIAS E MÉTODOS.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXO A.....	50

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde tem priorizado o combate às doenças crônico-degenerativas. Para isso, estratégias como alimentação adequada e mudanças do estilo de vida (destacando-se a prática de exercício físico), devem ser priorizadas desde o início da vida. Estudos epidemiológicos vêm observando que a má nutrição na infância seguida de supernutrição, *a posteriori*, predispõe o risco de obesidade e doenças relacionadas (hipertensão, diabetes tipo II, dislipidemias, hiperinsulinemia) na idade adulta (BARKER, OSMOND, 1986; SAWAYA *et al.*, 1995; BARKER, 1999).

Nas últimas décadas, o estado nutricional da população brasileira passou por um processo de transição (BATISTA FILHO; RISSIN, 2003). Observou-se uma diminuição predominante da desnutrição infantil e um aumento progressivo do sobrepeso/obesidade em adultos (AMITRAGE *et al.*, 2008). Sendo assim, parece haver uma contradição entre desnutrição e sobrepeso/obesidade. Um dos principais fatores não genéticos envolvidos no surgimento de doenças metabólicas aliadas a obesidade é a desnutrição (BARKER *et al.*, 2007). O mecanismo implícito parece estar relacionado aos efeitos irreversíveis da desnutrição no período perinatal levando a alterações de eventos celulares, com consequências negativas tanto na aquisição de padrões fisiológicos maduros do organismo quanto para o acontecimento de eventos metabólicos (LUCAS, 2000).

Análises experimentais realizadas com animais proporcionam um importante apoio para o conhecimento dos mecanismos relacionados à programação de doenças metabólicas (BALLEN *et al.*, 2009). Pesquisadores do Departamento de Nutrição e Anatomia da UFPE e do Centro Acadêmico de Vitória têm observado que tais modificações nutricionais no período crítico de desenvolvimento podem variar a ontogênese reflexa, o crescimento somático, a resposta ao tratamento com antidepressivos, o comportamento agressivo e o padrão de atividade locomotora de ratos adultos (BARROS *et al.*, 2006; FREITAS-SILVA *et al.*, 2008). Trabalhos precursores também são relevantes ao correlacionar a desnutrição neonatal e déficit no padrão de aquisição da atividade locomotora de ratos (BARROS, 2006), na estrutura do músculo cardíaco (TOSCANO *et al.*, 2008), prejuízo no metabolismo oxidativo do coração (NASCIMENTO *et al.*, 2014), além de mudanças nas propriedades mecânicas do músculo esquelético (TOSCANO *et al.*, 2008).

As associações entre saúde e dieta demonstram que dependendo do estado nutricional do indivíduo ocorre uma maior tendência ao aparecimento e/ou progressão de doenças metabólicas na idade adulta (GLUCKMAN, HANSON, 2004).

Esse trabalho é justificado pela importância de mais investigações sobre a desnutrição e os seus efeitos no metabolismo oxidativo hepático, visto que a desnutrição é um problema de saúde pública que afeta, principalmente, a população de países subdesenvolvidos, onde a fome crônica que significa o aporte alimentar insuficiente está fortemente relacionada ao surgimento de doenças crônico-degenerativas. O mecanismo subjacente ao desenvolvimento dessas afecções parece estar relacionado aos efeitos deletérios das deficiências nutricionais sofridas durante o período crítico do desenvolvimento.

Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa observaram que a desnutrição no período de gestação e lactação é capaz de induzir aumento nos níveis de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial em fígado de ratos jovens (SILVA FILHO *et al.* – dados não publicados). Contudo, se tem pouco conhecimento sobre os efeitos de uma restrição proteica perinatal no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidas a este modelo experimental. Logo, a hipótese desse trabalho é que uma restrição proteica no período crítico do desenvolvimento altere o metabolismo oxidativo da segunda geração de ratas jovens.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Plasticidade fenotípica e doenças metabólicas

A plasticidade fenotípica é caracterizada por um fenômeno que ocorre durante as fases de desenvolvimento de um indivíduo onde certas situações específicas podem gerar resultados em momentos posteriores da vida. Condições como a desnutrição materna, diabetes gestacional e obesidade durante a fase perinatal são fatores que podem favorecer o aparecimento da obesidade na prole devido às alterações metabólicas (LEVIN, 2006). Os fatores ambientais que atuam na plasticidade durante a fase de desenvolvimento podem agir interrompendo o programa normal do desenvolvimento ou o modulando (GLUCKMAN *et al.*, 2005) podendo levar a malformação estrutural, ou a problemas mais sutis. A deficiência de nutrientes durante este período ou uma incapacidade do feto para responder aos nutrientes, pode resultar em desenvolvimento anormal ou até mesmo a sua morte (BAZER *et al.*, 2010). Além disso, um ambiente intrauterino inadequado pode levar a um conjunto de alterações relevantes na prole, como por exemplo, a adiposidade visceral, alterações centrais e periféricas na regulação da saciedade, metabolismo de gordura e sensibilidade à insulina (GLUCKMAN, HANSON, 2007).

O DOHAD - *Developmental origins of health and disease* (Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença) é um dos conceitos utilizados para definir esses eventos. Ele tem como hipótese que fatores ambientais atuam no início da vida (geralmente na vida fetal) gerando efeitos negativos que pode predeterminar o indivíduo a desenvolver doenças, muitas vezes numa fase posterior da vida (GLUCKMAN *et al.*, 2010).

De acordo com esse raciocínio, Barker *et al.*, 1989 supôs que essas situações adversas no ambiente fetal e durante a infância estaria relacionado ao aumento de risco de doenças cardiovasculares. Para confirmar essa suposição, eles compararam o peso ao nascer e as condições ambientais durante a infância com a saúde cardiovascular de adultos que nasceram no início do século XX, em Hertfordshire, Inglaterra. Esses estudos mostraram que os indivíduos nascidos abaixo do peso mantiveram-se biologicamente diferentes dos que nasceram com peso normal, persistindo até a vida adulta. Além de apresentarem maiores níveis de pressão arterial, (ERIKSSON *et al.*, 2002), e serem mais expostos ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 (BARKER, 2002).

Existem várias causas que podem perturbar o crescimento pré-natal do feto, incluindo nutrição materna, pré-eclâmpsia, disfunção placentária ou diabetes gestacional (VIEAU, 2011). A obesidade materna e aumento da ingestão de nutrientes antes e durante a gestação é conhecida por resultar no crescimento alterado, adiposidade e intolerância à glicose em prole adulta (LONG *et al.*, 2011). Os insultos perinatais podem trazer consequências a longo prazo, sendo extremamente variáveis e dependendo de vários parâmetros tais como o tipo de "estressor", a sua intensidade e a duração, as espécies, sexo e o tempo durante o qual ele é aplicado (VIEAU, 2011).

2.2 Disfunção hepática e estresse oxidativo

O fígado é o maior órgão do corpo constituindo aproximadamente 2% a 5% do peso corporal de um homem adulto, ele é dividido em dois hemifígados, conhecido como lóbulo direito e esquerdo, os quais, por sua vez, são divididos em setores e segmentos, tendo como elementos de definição os pedículos portais e as veias hepáticas (TRIVIÑO, ABIB, 2003). O fígado atua como órgão essencial no metabolismo de carboidratos e lipídios. É interessante observar que alterações no metabolismo hepático induzidas pela desnutrição ocorrem antes mesmo do que é visto no tecido adiposo e no músculo esquelético. Estudos mostram que animais jovens submetidos à restrição de nutrientes, sofrem alterações na expressão de RNAm em várias enzimas envolvidas na glicogênese, glicogenólise e glicólise, na sensibilidade à insulina e na homeostase da glicose, mesmo sem hiperinsulinemia. Além disso, a mal nutrição proteica perinatal acarreta na redução de DNAm de fígado e músculo esquelético de ratos na vida adulta (PARK *et al.*, 2003). De acordo com o estudo de Qasem *et al.*, 2010, a restrição proteica durante a gestação e lactação também diminuiu o teor de triglicerídeos hepáticos em animais machos de 65 dias de vida, e essa diminuição persistiu pelo menos até os 150 dias, quando o estudo foi encerrado.

Dentre as funções do fígado destacam-se a regulação do metabolismo de diversos nutrientes, papel imunológico, síntese proteica e de outras moléculas, armazenamento de vitaminas e ferro, degradação hormonal e a inativação e excreção de drogas e toxinas. Algumas modificações na função do fígado podem ser resultantes de alterações no metabolismo como, doença hepática gordurosa não alcoólica, fibrose, cirrose e esteatose hepática, sendo esta última relacionada com diferentes fatores de predisposição, tais como a obesidade, diabetes, dislipidemia, e nutrição parenteral (MATTEONI *et al.*, 1999; FALCK-YTTER *et al.*, 2001).

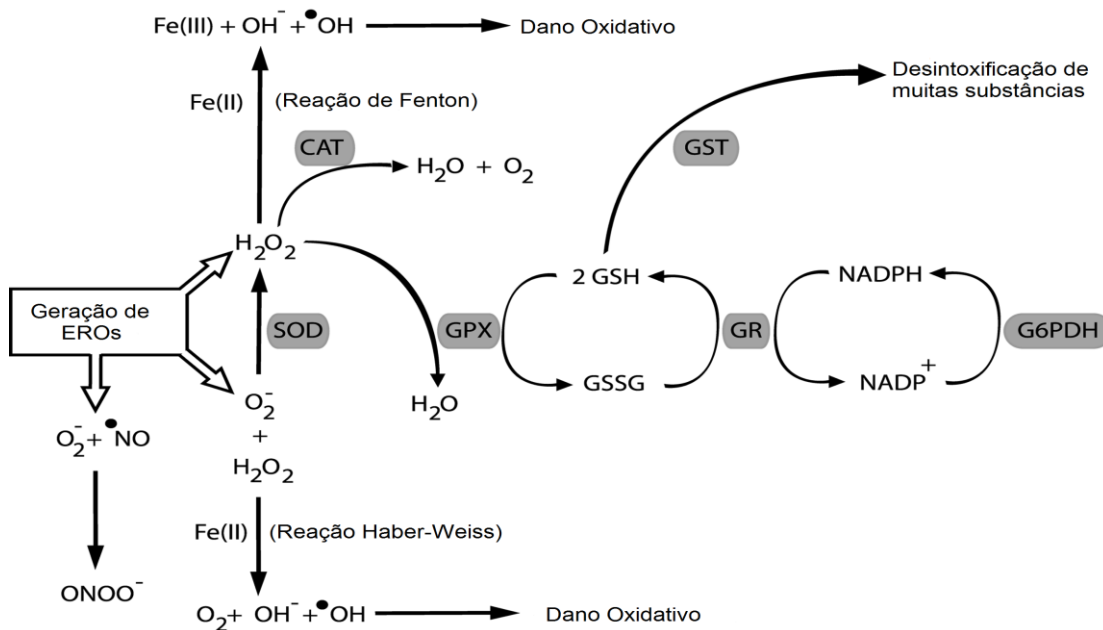
Muitos estudos vêm mostrando a relação entre programação fetal e doenças crônico-degenerativas, mas ainda não se sabe ao certo sobre os mecanismos bioquímicos e moleculares indutores dessas doenças. No entanto, já se sabe que varias doenças metabólicas são induzidas pelo desequilíbrio oxidativo (BARBOSA *et al.*, 2010), elevando a produção de Espécies reativas de oxigênio nesses tipos de células, estimulando o aparecimento de doenças em uma fase posterior (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

O estresse oxidativo tem sido definido como um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, nas células intactas. Quando existe maior ocorrência de eventos oxidativos, o sistema pende para o lado pró-oxidativo, o que pode afetar os níveis de antioxidantes, tendo como resultado final, o dano oxidativo em lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, e com severidade deste processo pode levar à morte celular (JORDÃO *et al.*, 1998). Esse desequilíbrio oxidativo tem grande importância no processo de envelhecimento, transformação e morte celular, com consequências diretas em muitos processos patológicos, entre eles, câncer, cardiopatias, hipertensão arterial sistêmica, Alzheimer, Parkinson, estados tóxicos causados por álcool, fumo, e outras (JACOB *et al.*, 2013).

As defesas antioxidantes nas nossas células tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres (KOURY, 2003). O sistema de defesa antioxidante é dividido em enzimático e não-enzimático. O sistema enzimático é formado por diversas enzimas, destacando-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e as enzimas relacionadas ao metabolismo das Glutationas (Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Redutase (GR), Glutathione-S-transferase (GST), Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), entre outras). A SOD age transformando ânions superóxidos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), esse por sua vez mesmo não sendo um radical livre, tem um alto potencial reativo, participando da reação que gera o radical hidroxila que é extremamente lesivo as células (BARBOSA *et al.*, 2010). A catalase possui a capacidade de transformar o H_2O_2 em H_2O e O_2 , diminuindo a atividade reativa do peróxido contra as células. A molécula da Glutathione Reduzida (GSH) atua como coenzima para algumas enzimas como, por exemplo, a GST (FUJII *et al.*, 2011), entretanto, é como substrato para a Glutathione Peroxidase, que tem a mesma função importante da catalase, proteger as células contra altas concentrações de H_2O_2 reduzindo-o a H_2O , para isso a GPx necessita da oxidação simultânea da Glutathione Reduzida. Já a Glutathione Redutase tem a função de regenerar a Glutathione Oxidada (GSSG) à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

(NADPH) fornecido pela Glicose-6-P-Desidrogenase, tendo a função de impedir que o ciclo metabólico da glutathiona pare (HALLIWELL, 2006).

Figura 1. Defesas antioxidantes enzimáticas. As abreviaturas SOD, CAT, GST, GR, GPX, e G6PDH representam as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathiona-S-transferase, glutathiona redutase, glutathiona peroxidase e glicose-6-fosfato desidrogenase, respectivamente.



Fonte: Hermes, Marcelo 2004.

Nota: Imagem modificada pela autora do trabalho.

2.3 Epigenética e Nutrição

Em diversas espécies animais, influências ambientais atingem o feto, através da mãe/placenta, ou o neonato, através da lactação, promovendo adaptações fisiológicas que aumentam a chance de o indivíduo sobreviver naquele meio (SILVEIRA *et al.*, 2007). Alterações induzidas no fenótipo persistem durante todo o tempo de vida e são susceptíveis a envolverem alterações estáveis para a expressão do genoma (LILLYCROP, 2007). De acordo com estudos epidemiológicos e experimentais os aspectos do ambiente pré-natal, tais como os níveis de nutrição e estresse materno fornecem pistas que modificam o fenótipo da prole sem reduções evidentes no crescimento fetal (GODFREY, BARKER 2001; BERTRAM, HANSON, 2002). A maior parte dos estudos sobre a indução de um fenótipo metabólico alterado através da restrição de dieta materna em humanos e modelos experimentais tem

focado na primeira geração da prole. Mas, há evidências de estudo com modelos animais (MARTIN *et al.*, 2000; TORRENS *et al.*, 2002; ZAMBRANO *et al.*, 2005; BENYSHEK *et al.*, 2006) que o fenótipo induzido na geração F1 pode ser transmitido para gerações seguintes.

Estudos mostram que a influência de interações ocorridas em períodos vulneráveis ou passíveis de programação através de efeitos epigenéticos, pode persistir, inclusive de forma transgeracional (CHAMPAGNE, 2001; ZHANG *et al.*, 2006.) A herança epigenética transgeracional é definida como herança de linha germinal mediada de informação epigenéticas entre as gerações, na ausência de influências ambientais diretas, que leva a variação fenotípica (SKINNER *et al.*, 2010; 2011).

Estudos experimentais com modelo animal observou que o efeito da desnutrição materna sobre a secreção hormonal e o metabolismo pode ser passado transgeracionalmente a partir da mãe (F0) para filha (F1) e para a progénie (F2) (BERTRAM *et al.*, 2008). Outros trabalhos também mostraram que a restrição calórica materna em ratos, provocou diminuição na massa e no número de células β pancreáticas na primeira geração de descendentes do sexo feminino, levando a resistência à insulina e a hiperglicemia gestacional, prejudicando a resposta das células β pancreáticas na segunda geração (MARTIN *et al.*, 2000, THAMOTHARAN *et al.*, 2007).

Processos epigenéticos podem ser modificados quando o organismo é dirigido à exposição ambiental durante os períodos críticos de desenvolvimento (ANWAY *et al.*, 2005, SKINNER *et al.*, 2010, VANDEGEHUCHTE *et al.*, 2014). Esses efeitos sofrem interferência do ambiente ao longo da fase perinatal, sendo extremamente importantes no ramo de estudos de DOHaD (SILVEIRA *et al.*, 2007). No entanto, muitas dessas modificações estão relacionadas com alterações permanentes na expressão de genes regulados por fatores epigenéticos, tais como a metilação do DNA e a metilação/acetilação de histonas (GLUCKMAN, 2007). Segundo Van Straten *et al.*, 2010, as diferenças na metilação do DNA como uma consequência da restrição proteica materna pode ser mais uma deslocalização de recursos do que um processo passivo causado por falta de substrato. Em importantes estudos experimentais, Lillycrop *et al.*, 2007, demonstraram que a restrição de proteína na dieta pode modificar o padrão de metilação do promotor de genes envolvidos em processos metabólicos e, consequentemente, mudar expressão genética.

A Nutrição pode induzir, em algum momento, alterações epigenéticas que podem ser transmitidas de uma geração para outra afetando a saúde (CSABA, 2007). Estudos demonstram que ratos alimentados com dieta restrita em proteína durante a gravidez na geração F0 resultou no aumento da pressão sanguínea e disfunção endotelial (TORRENS *et al.*, 2002) e a resistência à insulina (MARTIN *et al.*, 2000; ZAMBRANO *et al.*, 2005) nas gerações F1 e F2, mesmo recebendo nutrição normal durante a gravidez na geração F1. Como aspectos essenciais para a sobrevivência do indivíduo, é de se esperar que a nutrição, o metabolismo, o crescimento, a reprodução e as respostas ao estresse sejam os mais facilmente passíveis de programação (SILVEIRA *et al.*, 2007).

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral: Estudar a função e o metabolismo oxidativo hepático da segunda geração de ratas jovens submetidas a uma restrição proteica perinatal, a fim de se obter uma melhor compreensão em relação aos efeitos crônicos dessa restrição em diferentes gerações e sua correlação com doenças metabólicas da vida adulta.

Objetivos Específicos:

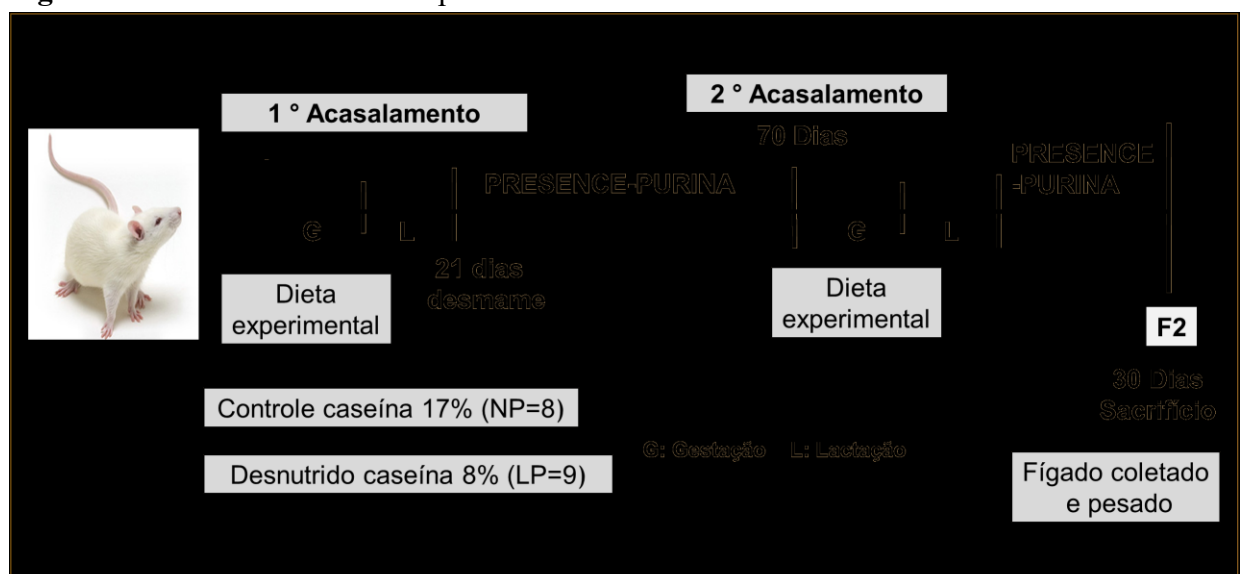
Avaliar em ratos machos de 30 dias da segunda geração de fêmeas submetidas a uma restrição proteica perinatal:

- O peso corpóreo dos animais e do tecido hepático;
- Peso relativo do fígado pelo peso corporal dos animais;
- Peroxidação de lipídios de membrana;
- Níveis de Oxidação Proteica pelo método de Carbonilas;
- Níveis de Glutathione Reduzida;
- Níveis de grupamentos sulfidrilas (SH);
- Atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx), Glutathione s-transferase (GST) e atividade da enzima Glicose-6-fosfato desidrogenase.

4 MATERIAS E MÉTODOS

Animais e dieta: Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. As fêmeas selecionadas (n=6) entre 220-250g foram abrigadas em biotério sob condições padrão de temperatura, iluminação e umidade com água e comida (dieta Presence – Purina) *ad libitum* (VAN ZUTPHEN, 1993). Foram promovidos períodos alternados e regulares de luz e escuridão (12/12 horas) e um período de adaptação de 15 dias para sincronizar o ciclo circadiano. Após a adaptação, as ratas quando em período estral, foram acasaladas na proporção 2 fêmea para 1 macho. A possível prenhez foi diagnosticada pela identificação de espermatozoides nas lâminas do esfregaço vaginal (MARCONDES *et al.*, 2002). Animais nascidos a partir do 1º acasalamento (geração F1) após crescimento, foram acasalados para obtenção da 2ª geração (geração F2). Os machos da segunda geração (F2) foram avaliados aos 30 dias de idade (Figura 2). 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 comitê de ética aprovou o estudo protocolado com o nº 23076.018417/2013-73. As ratas prenhas foram divididas em dois grupos de acordo com a dieta fornecida: controle (C, caseína a 17%) e desnutridas (D, caseína a 8%) (Quadro1). Na lactação, as ratas continuaram recebendo dieta experimental conforme o grupo experimental e após o desmame (21 dias de idade), os filhotes receberam dieta de biotério Presence-Purina®.

Figura 2: Desenho do modelo experimental.



Fonte: Silva, Gizele, 2016. Nota: Figura elaborada pela autora com base na pesquisa realizada.

Quadro 1: 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

Fonte: Descrito por Reeves, *et al.*, 1993.

*Quantidade para 1 kg de dieta.

** Mix Vitamínico continha o seguinte (em mg / kg de ração): retinol, 12; colecalciferol, 0,125; tiamina, 40; riboflavina, 30; ácido pantotênico, 140; piridoxina, 20; inositol, 300; cianocobalamina, 0,1; menadiona, 80; nicotínico ácido, 200; colina, 2720; ácido fólico, 10; ácido p-aminobenzóico, 100; e biotina, 0,6.

*** Mix Mineral continha o seguinte (em mg / kg de ração): CaHPO₄, 17 200; KCl, 4000; NaCl, 4000; MgO, 420; MgSO₄, 2000; Fe₂O₃, 120; FeSO₄.7H₂O, 200.

Coleta do material biológico: Aos 30 dias de vida os ratos foram eutanasiados e o fígado rapidamente coletado, pesado e armazenado imediatamente a -80 °C.

Preparação do homogenato de fígado para as análises bioquímicas: O fígado foi homogeneizado em tampão de extração (Tris base 50 mM, pH 7,4; EDTA 1 mM; contendo um coquetel de inibidores de protease (Ortovanadato 1 mM; PMSF 2 mM)). Para quantificação protéica e avaliação da atividade enzimática as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm, a 4° C, por 10 minutos e o sobrenadante foi recolhido e armazenado no freezer a -20° C sendo utilizado para realizar os experimentos.

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

Avaliação do peso corpóreo dos animais e do tecido hepático: Aos 30 dias de idade, os animais dos grupos controle e desnutridos foram pesados antes de serem eutanasiados. Imediatamente após a eutanásia dos animais, o fígado foi rapidamente coletado e pesado.

Avaliação do peso relativo do fígado pelo peso corporal dos animais: O peso relativo foi determinado pela razão entre o peso do tecido hepático pelo peso corporal do animal multiplicado por 100.

Medida dos níveis de estresse oxidativo pela metodologia da Substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico: Para a dosagem de TBARS foi utilizada a técnica colorimétrica de Buege, Aust (1978), sendo uma técnica muito utilizada para avaliar a lipoperoxidação (LPO), pois o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da LPO, entre eles o malondialdeído e outros aldeídos. Onde coloca-se uma alíquota do homogeneizado, de ácido tricloroacético a 30% e de ácido tiobarbitúrico a 0,73% que reage com os produtos da lipoperoxidação formando um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada por 15 minutos a 100°C e em seguida resfriada. O material foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos, e a leitura da absorbância a 535nm, utilizando cubetas de quartzo. Os resultados foram expressos em nmol de TBARS por mg de proteína.

Medida dos níveis de oxidação de proteínas (Carbonilas): A medida da oxidação de proteínas foi avaliada segundo Zanatta, 2013. Os grupos carbonilas reagem com o 2,4-dinitrophenil-hidrazina (DNPH) a 10 mM. Os valores da absorbância foram obtidos a 370nm e expressos em nmol de carbonilas/ mg de proteína.

Medida do conteúdo de grupos Sulfidrilas: O conteúdo de sulfidrilas foi determinado a partir da reação com o composto DTNB (5,5-dithiobis 2nitrobenzoie acid). Alíquota do homogenato (200 µg de proteína) foi incubada no escuro com 30 µL de DTNB a 10 mM e completado o volume final de 1 mL com tampão de extração. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 412nm (ELLMAN, 1959). Os resultados foram expressos em nmol por mg de proteína.

Medida dos níveis de Glutathiona Reduzida: A GSH foi mensurada pelo método descrito por Hissin, Hilf (1976). A amostra foi diluída 10 vezes em tampão fosfato de sódio (o mesmo usado no experimento). Para a análise, foi adicionado tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 8,0) com EDTA 5mM, a amostra diluída e OPT (orto-ftaldeído) a 7 mM e incubada por 15 minutos em temperatura ambiente. A fluorescência foi determinada a 420 nm com excitação a 350nm. Foi estabelecida uma curva de calibração utilizando diferentes concentrações de GSH. Os resultados foram expressos em μmol de GSH/mg de proteína.

Superóxido dismutase (SOD): A atividade da superóxido dismutase foi avaliada através do método de auto-oxidação da adrenalina, o qual compete com a SOD sendo medido em espectrofotometro a 480 nm. Em uma cubeta de quartzo de 1 mL, adiciona-se tampão carbonato a 0,1 M (pH 10,2), amostra (80 μg de proteína) e adrenalina a 150 mM. A absorbância foi registrada por um período de aproximadamente 3 minutos. Os resultados foram expressos em Unidade por mg de proteína (MISRA & FRIDOVICH, 1972).

Catalase: A atividade da catalase (CAT) é diretamente proporcional a taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, sendo assim, a atividade da enzima pode ser medida através da avaliação do consumo de peróxido pelo decréscimo na absorção a 240 nm de um meio de reação, contendo tampão fosfato a 50 mM (pH=7,0) e H_2O_2 a 300 mM. Os resultados foram expressos em Unidade por mg de proteína (AEBI, 1984).

Glutathiona peroxidase (GPx): As amostras foram previamente preparadas, adicionando-se uma mistura de cianetos para inibir a atividade pseudo-peroxidase da hemoglobina, transformando-a em cianometaemoglobina. A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi monitorada pela diminuição de absorbância do NADPH a 340 nm, em um meio contendo: Tampão fosfato de sódio monobásico 0,05 M e EDTA (1 mM), NADPH 0,28 mM, Azida sódica 3,75 mM, GSH 5 mM, Glutathiona redutase (GR) 0,33 U e H_2O_2 73 μM . A absorbância foi registrada por um período de aproximadamente 3 minutos com controle da temperatura (37°C). Após esse período foi adicionado hidróxido de tert-butila, e o consumo de NADPH foi monitorado por aproximadamente 5 minutos. Os resultados foram expressos em Unidade por mg de proteína (PAGLIA, 1967).

Medida da atividade da Glutathiona-S-transferase (GST): A atividade da glutathiona-S-transferase é diretamente proporcional a taxa de formação do composto DNP-SG (dinitro fenil S glutathiona), podendo desta forma ser medida através do monitoramento da taxa de formação do composto. Em uma cubeta de quartzo de 1 mL, foi adicionado tampão fosfato de potássio (pH=6,5), amostra, GSH (60 mM) e CDNB (30 mM). A absorbância foi registrada

por um período de aproximadamente 3 minutos com controle da temperatura (25°C). Os resultados foram expressos em Unidade por mg de proteína (HABIG & JAKOBY, 1974).

Determinação da atividade da glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH): A G6PDH catalisa a primeira reação do shunt da hexose-monofosfato, a via das pentoses. A atividade máxima foi avaliada pelo método descrito por Bergmeyer *et al.*, 1974. O sistema de reação enzimático deve conter Tris-HCl 86 mM, MgCl₂ 6,9 mM, NADPH + 0,4 mM, glicose-6-fosfato 1,2 mM, Triton X-100 0,05 % (v/v), pH 7,5. Foi adicionado ao sistema de reação, 50 µl de extrato celular e o ensaio iniciado pela adição do substrato (glicose-6-fosfato). As determinações enzimáticas foram realizadas no volume total de 1 ml a 37°C, por 4 min, a 340 nM. Os resultados foram expressos em nmol/min/mg de proteína.

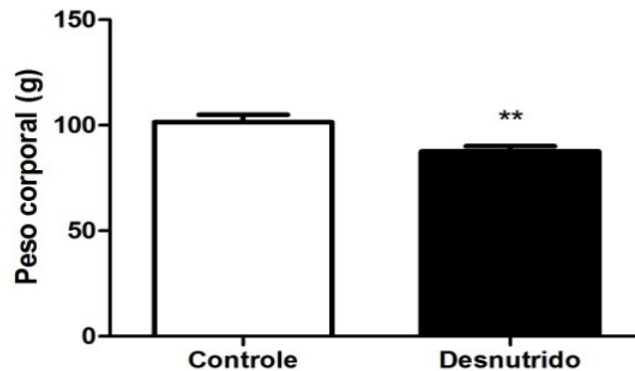
Análise estatística: Os resultados foram expressos como média ± EP (erro padrão da média). A análise estatística foi realizada através do teste “t” de Student não pareado. O nível de significância foi considerado quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação do peso corporal e do tecido hepático, e o peso relativo do fígado pelo peso corporal da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal.

A literatura relata que há uma estreita relação entre o peso ao nascer e uma maior incidência de desenvolvimento de doenças metabólicas (obesidade, diabetes, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares) na vida adulta (BARKER, 1998). Ao analisarmos tanto o peso corporal (PC) (Figura 3) quanto o peso dos fígados (PF) (Figura 4) de ratos machos aos 30 dias de vida, observamos uma redução significativa desses pesos no grupo desnutrido em comparação com o grupo controle, PC ($C=101\pm3.54$, $n=8$ vs $D=87.6\pm2.46$ g $n=8$ $p<0,01$), e PF ($C=4.10\pm0.15$, $n=6$ vs $D=3.48\pm0.18$ g $n=6$ $p<0,05$). Uma explicação possível para a redução do peso corporal dos filhotes pode ser devido ao baixo teor de proteínas oferecido à mãe que provavelmente resultou em deficiência de nutrientes para a prole (BARKER, 2007). Esses efeitos da restrição proteica perinatal na redução do peso corporal e hepático dos animais, já tinha sido observado previamente pelo nosso grupo de pesquisa na primeira geração de ratos jovens submetidos ao mesmo protocolo experimental e persistiu na prole da segunda geração. Já o peso relativo do fígado pelo peso corporal dos animais (Figura 5) foi maior nos animais desnutrido ($C= 3,742 \pm 0,1402$ g $n=5$ vs $D= 4,452 \pm 0,2137$ g $n=5$ $p<0,05$). Ou seja, o peso do fígado dos animais desnutridos diminuiu em relação aos animais controle, mas essa diminuição foi em menor proporção ao se comparar com o peso corporal. Isso mostra que na segunda geração o efeito da desnutrição no tecido hepático foi menor, já que o peso relativo dos animais desnutridos foi maior. Pode-se dizer que o fígado dos animais desnutridos está mais resistente aos efeitos da desnutrição, já que o peso não diminuiu tanto, principalmente quando comparado aos animais de primeira geração que mostra redução do peso corporal e do tecido hepático, mas não houve diferença no peso relativo. (Simões, 2014; Dados não publicados).

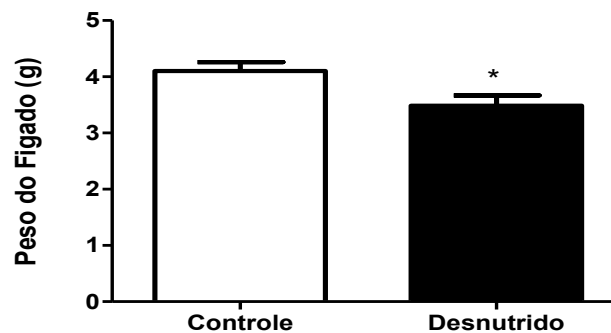
Figura 3: Avaliação do peso corporal da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal. Para essa análise foram utilizados $n=8$ animais para o grupo controle e $n=8$ animais para o grupo desnutrido. Os valores, em gramas, representam média $\pm$ erro padrão da média (** $p<0,01$).



Fonte: Silva, Gizele, 2016.

Nota: Gráfico elaborado pela autora com base nos resultados obtidos na pesquisa.

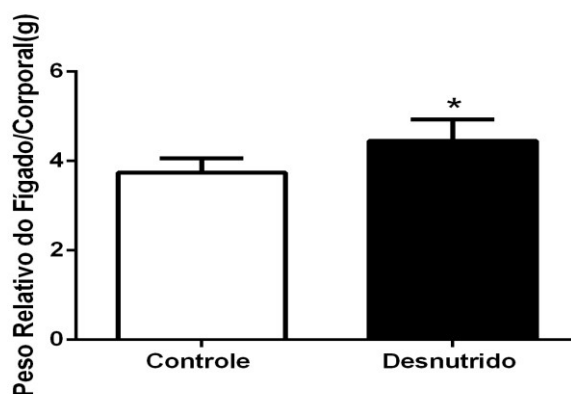
Figura 4: Avaliação do peso do fígado da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal. Para essa análise foram utilizados $n=6$ animais para o grupo controle e $n=6$ animais para o grupo desnutrido. Os valores, em gramas, representam média $\pm$ erro padrão da média (* $p<0,05$).



Fonte: Silva, Gizele, 2016.

Nota: Gráfico elaborado pela autora com base nos resultados obtidos na pesquisa.

Figura 5: Peso relativo do tecido hepático pelo peso corporal da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal. Para essa análise foram utilizados $n=5$ animais para o grupo controle e $n=5$ animais para o grupo desnutrido. Os valores, em gramas, representam média $\pm$ erro padrão da média (* $p<0,05$).



Fonte: Silva, Gizele, 2016.

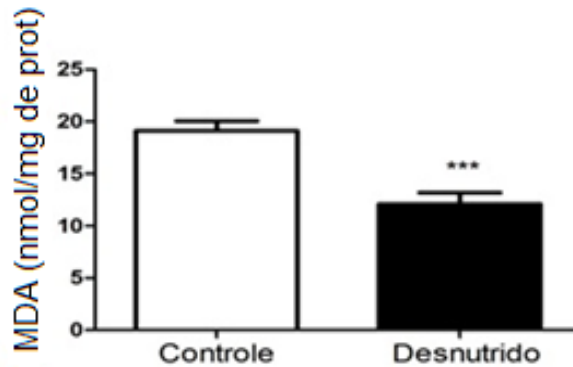
Nota: Gráfico elaborado pela autora com base nos resultados obtidos na pesquisa.

Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica (MDA), e oxidação proteica (CARBONILAS), no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal.

O estado oxidativo da célula é decorrente do equilíbrio entre os agentes oxidantes e o sistema de defesa antioxidante (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008). O estresse oxidativo ocorre quando este equilíbrio é quebrado devido à redução de antioxidantes e/ou aumento da formação de agentes pró-oxidantes (PANDEY; RIZVI, 2010). Esse evento provoca a oxidação de biomoléculas como lipídios e proteínas, o que leva a liberação de produtos como o Malondialdeído (MDA) e Carbonilas, com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (SCHNEIDER, 2004).

Como um índice para avaliação da peroxidação lipídica, foi utilizado a metodologia do TBARS, a qual quantifica o malondialdeído como principal produto da lipoperoxidação decorrente da ação de espécies reativas às membranas celulares. Ao ser avaliado os níveis de peroxidação lipídica de membrana (Figura 6) foi verificado que os animais desnutridos da segunda geração tiveram seus níveis reduzidos em relação aos animais controle ($C=19.11 \pm 0.94$, $n=10$ vs $D=12.10 \pm 1.07$ nmol/mg de Proteína(prot.) $n=8$ $p<0,001$). Em relação aos níveis de oxidação proteica (Figura 7) verificamos uma diminuição significativa nos animais desnutridos ($C=7,242 \pm 0,45$, $n=5$, vs $D=4,495 \pm 0,43$ nmol/mg de prot., $n=6$, $p<0,01$). Esses dados mostram que os animais desnutridos de segunda geração não apresentam estresse oxidativo, já que esses indicadores encontram-se diminuídos, não levando assim ao dano oxidativo nas células hepáticas.

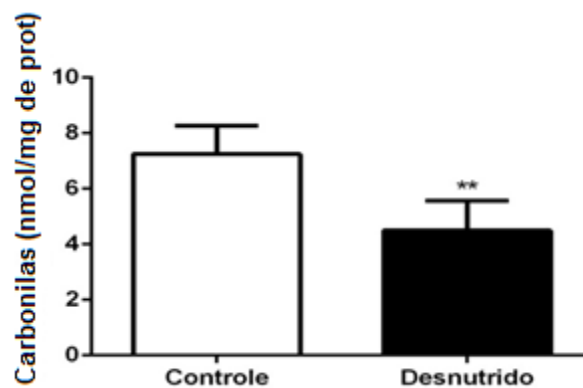
Figura 6. Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal. Para essa análise foram utilizados n=8 animais para o grupo controle e n=10 animais para o grupo desnutrido. Os valores, em nmol/mg de proteína, representam média $\pm$ erro padrão da média (** $p < 0,001$).



Fonte: Silva, Gizele, 2016.

Nota: Gráfico elaborado pela autora com base nos resultados obtidos na pesquisa.

Figura 7. Avaliação dos níveis de oxidação proteica no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidos à restrição proteica perinatal. Para essa análise foram utilizados n=5 para o grupo controle e n=6 para o grupo desnutrido. Os valores, em nmol/mg de proteína, representam média $\pm$ erro padrão da média (** $p < 0,01$).



Fonte: Silva, Gizele, 2016.

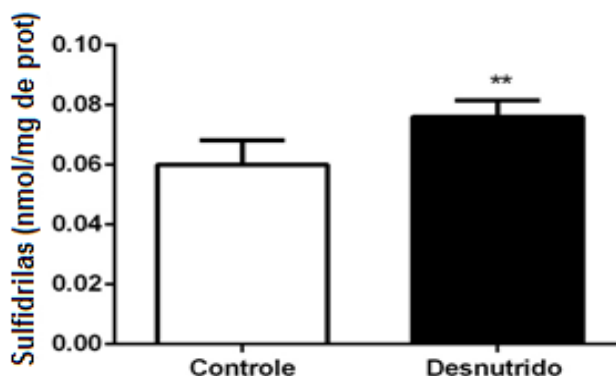
Nota: Gráfico elaborado pela autora com base nos resultados obtidos na pesquisa.

Avaliação dos níveis de grupamentos sulfidrila (SH) e glutathiona reduzida (GSH) no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal.

Os grupamentos sulfidrila são compostos que possuem grande importância no sistema antioxidante por oferecerem suas ligações (–SH) a Glutathiona (GSH), auxiliando, portanto, na atenuação das respostas de estresse oxidativo (FAURE, LAFOND, 1995). A glutathiona reduzida está presente na maioria das células e é o tiol (–SH) mais abundante no meio intracelular, a sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento –SH, presente na cisteína, e ela atua como transportadora e reservatório da cisteína e participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. (FERREIRA, ALA *et al.* 1997).

Ao avaliarmos os níveis de grupamentos sulfidrila (SH) (Figura 8) e da GSH (Figura 9) nesse estudo, observamos um aumento significativo nos animais desnutridos comparados com o grupo controle, SH (C= $0,06 \pm 0,004$, n=4, vs D= $0,076 \pm 0,002$ nmol/mg de prot., n=5, $p<0,01$) e GSH (C= $36,76 \pm 1,83$, n=6, vs D= $46,96 \pm 1,56$ μ mol/mg de prot., n=6, $p<0,01$). Isso implica numa melhora da ação antioxidantes nesses animais desnutridos, favorecendo o controle de EROs e reduzindo o potencial de estresse oxidativo, já que a os grupamentos sulfidrila e a GSH atuam no combate a agentes oxidantes dentro das células.

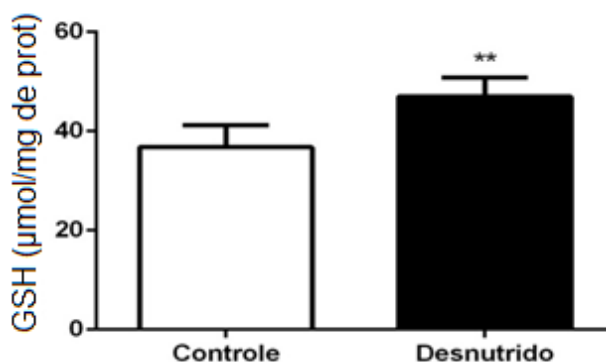
Figura 8. Avaliação dos níveis de grupamentos sulfidrila (SH) no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal. Para essa análise foram utilizados n=4 para o grupo controle e n=5 para o grupo desnutrido. Os valores, em nmol/mg de proteína, representam média $\pm$ erro padrão da média (** $p<0,01$).



Fonte: Silva, Gizele, 2016.

Nota: Gráfico elaborado pela autora com base nos resultados obtidos na pesquisa.

Figura 9. Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal. Para essa análise foram utilizados n=6 animais para o grupo controle e n=6 animais para o grupo desnutrido. Os valores, em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína, representam média $\pm$ erro padrão da média (** $p<0,01$).



Fonte: Silva, Gizele, 2016.

Nota: Gráfico elaborado pela autora com base nos resultados obtidos na pesquisa.

Avaliação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona-S-transferase (GST), e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal.

O sistema de defesa antioxidante enzimático inclui o grupo das glutathionas e outras enzimas muito importantes para as defesas celulares, como a SOD e a catalase. Essas enzimas agem no intuito de prevenir o organismo da ação dos radicais livres, impedindo e/ou controlando a sua formação (FERREIRA, 1997; SCHNEIDER, 2004). Os danos oxidativos induzidos pelo EROs podem ser evitados pela ação da SOD que faz a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, que por sua vez é removido pela ação da Catalase ou da GPx transformando-o em H_2O e O_2 . Além disso, a GSH tem um papel importante na defesa celular contra EROs, peróxidos e xenobióticos, atuando em conjunto com a GPx e a GST, também para que os níveis de GSH sejam mantidos, é necessário que a G6PDH forneça o substrato NADPH, que é essencial para manter a função do ciclo das glutathionas (HUBE *et al.*, 2008).

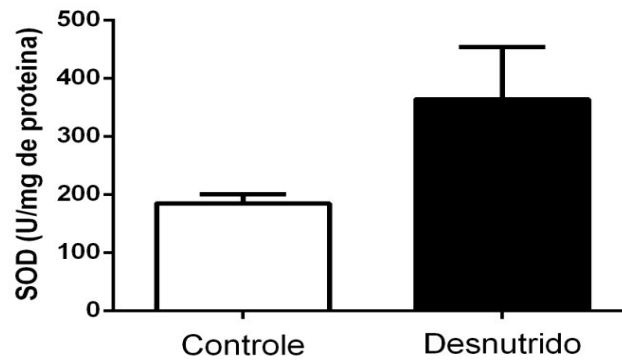
Ao verificarmos a atividade das enzimas, encontramos um aumento na atividade da SOD (Figura 10) nos animais desnutridos, porém não foi significativo ($C=184.6 \pm 15.90$, $n=8$ vs $D=363.8 \pm 89.87$ U/mg de prot. $n=8$ $p=0,06$). Já a Catalase (Figura 11) obteve um aumento

significativo nos animais desnutridos em comparação ao grupo controle ($C=13.7\pm0.78$, $n=8$ vs $D=15.98\pm0.61$ U/mg de prot. $n=9$ $p<0,05$). Em contrapartida, a GPx (Figura 12) foi significativamente reduzida nos animais desnutridos ($C=5.27\pm0.26$, $n=7$ vs $LP=4.16\pm0.13$ U/mg de prot. $n=7$ $p<0,01$), podendo ser justificada devido ao aumento da catalase, já que está tem a mesma função da GPx. Em relação a atividade da GST (Figura 13), e da G6PDH (Figura 14) houve um aumento significativo nos animais desnutridos comparados com os animais controle, GST ($C=230,8 \pm 18,19$, $n=5$, vs $D=375,3 \pm 7,25$ U/mg de prot., $n=6$, $p<0,0001$) e G6PDH ($C=63,65 \pm 14,26$, $n=5$, vs $D=127,8 \pm 7,70$ nmol/min/mg de prot., $n=5$, $p<0,01$). A glutathione-s-transferase tem a função de catabolizar á reação de transferência do tripeptídeo glutathione reduzida (GSH) para substratos eletrofílicos tóxicos (endógenos ou exógenos), tornando-os compostos solúveis menos tóxicos para a célula, e estes por sua vez são transportados para fora o vacúolo (MARRS,1996). Além disso, evidências recentes sugerem que as funções de diversas enzimas e proteínas estruturais são reguladas pela GST (HILL *et al.*, 2007).

Esses resultados em conjunto, sugerem que o fígado desses animais desnutridos adquiriu resistência à desnutrição com o passar do tempo, se adaptando ao ambiente em que foi exposto, e que as defesas enzimáticas estão trabalhando de forma eficiente no controle e na prevenção do estresse oxidativo nesses animais de segunda geração, já que os indicadores de estresse estão diminuídos. Pouco se sabe sobre os efeitos da desnutrição proteica em animais de segunda geração, porém já foi observado pelo nosso grupo um aumento de peroxidação lipídica sem alteração na atividade da SOD e tendência a aumento na atividade da CAT em fígado de animais aos 30 dias de vida de primeira geração (Simões *et al.* – dados ainda não publicados).

Isso nos permite dizer que a restrição proteica perinatal submetida aos animais machos de segunda geração não ocasionou desequilíbrio oxidativo no tecido hepático, garantindo assim a homeostase diante dos insultos que foram submetidos no período crítico de desenvolvimento, podendo ser uma estratégia de compensação metabólica devido aos insultos sofridos na geração anterior. Isso pode estar relacionado com processos de alterações nos genes da prole, onde o organismo desenvolve mecanismos que detectam mudanças nutricionais e se adapta por meio de programas epigenéticos, causando modificações no fenótipo e na expressão de genes para manter a homeostase metabólica. Essas modulações ocorrem em resposta adaptativa ao ambiente, condições como nutrição, exercício e estresse são fatores que podem induzir esses mecanismos epigenéticos. (ETCHEGARAY, MOSTOSLAVSKY, 2016).

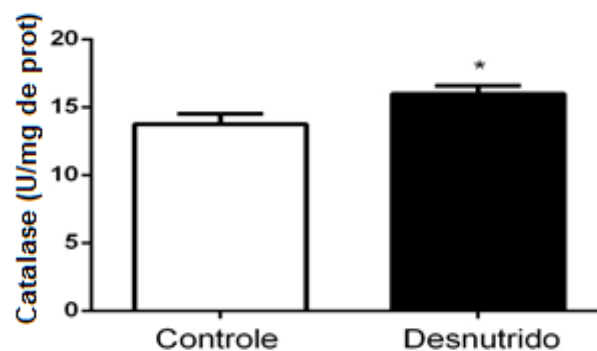
Figura 10. Avaliação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal. Para essa análise foram utilizados n=8 animais para o grupo controle e n=8 animais para o grupo desnutrido. Os valores, em U/mg de proteína, representam média $\pm$ erro padrão da média. Não significativo.



Fonte: Silva, Gizele, 2016.

Nota: Gráfico elaborado pela autora com base nos resultados obtidos na pesquisa.

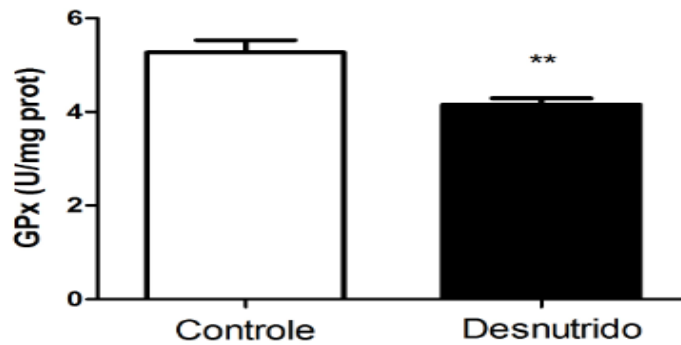
Figura 11. Avaliação da atividade da Catalase no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal. Para essa análise foram utilizados n=8 para o grupo controle e n=9 para o grupo desnutrido. Os valores, U/mg de proteína, representam média $\pm$ erro padrão da média (*p=0,05).



Fonte: Silva, Gizele, 2016.

Nota: Gráfico elaborado pela autora com base nos resultados obtidos na pesquisa.

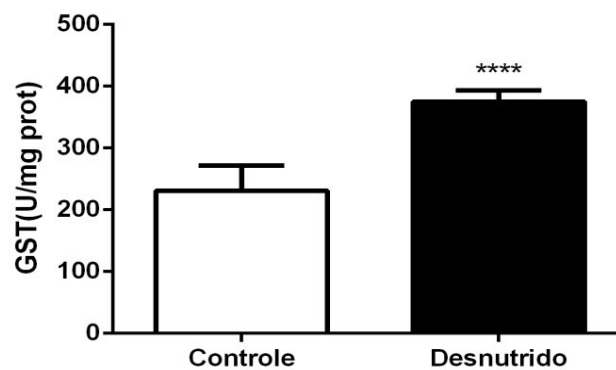
Figura 12. Avaliação da atividade da Glutathione Peroxidase (GPx) no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal. Para essa análise foram utilizados $n=7$ animais para o grupo controle e $n=7$ animais para o grupo desnutrido. Os valores, U/mg proteína, representam média $\pm$ erro padrão da média (** $p<0,01$).



Fonte: Silva, Gizele, 2016.

Nota: Gráfico elaborado pela autora com base nos resultados obtidos na pesquisa.

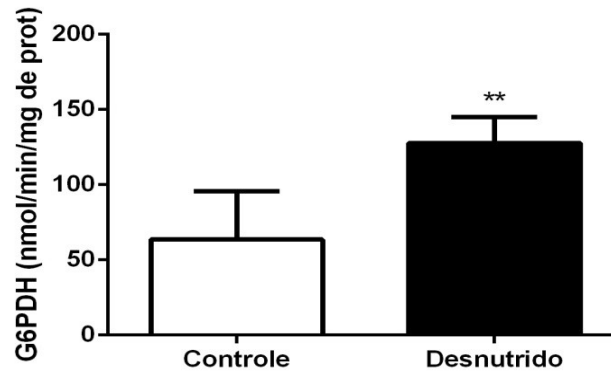
Figura 13. Avaliação da atividade da enzima Glutathione-s-transferase (GST) no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal. Para essa análise foram utilizados $n=5$ para o grupo controle e $n=6$ para o grupo desnutrido. Os valores, em U/mg de proteína, representam média $\pm$ erro padrão da média (**** $p=0,0001$).



Fonte: Silva, Gizele, 2016.

Nota: Gráfico elaborado pela autora com base nos resultados obtidos na pesquisa.

Figura 14. Avaliação da atividade da enzima Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidas à restrição proteica perinatal. Para essa análise foram utilizados $n=5$ para o grupo controle e $n=5$ para o grupo desnutrido. Os valores, em nmol/min/mg de proteína, representam média $\pm$ erro padrão da média (** $p=0,01$).



Fonte: Silva, Gizele, 2016.

Nota: Gráfico elaborado pela autora com base nos resultados obtidos na pesquisa.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que os animais desnutridos F2 não apresentaram estresse oxidativo, diferente de animais F1 que já mostram alteração no balanço oxidativo. Assim, esses dados sugerem que os animais de segunda geração estão mais resistentes à restrição proteica perinatal, como uma estratégia de compensação metabólica hepática devido aos insultos sofridos e possivelmente estariam menos predispostos ao aparecimento de doenças metabólicas na vida adulta, causadas pelo estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

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

AMITRAGE, J. A., *et al.* Developmental origins of obesity and the metabolic syndrome: the role of maternal obesity. **Front Horm Res.**, New York. v. 36, p. 73-84. Jan. 2008.

ANWAY, M. D. *et al.* Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. **Science.**, New York. v. 308, p. 1466–1469, Jun. 2005.

BALLEN, M. L. O. *et al.* Restrição protéica na prenhez: efeitos relacionados ao metabolismo materno. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, Rio de Janeiro. v. 53, n. 1, p. 87, Fev. 2009.

BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, Campinas. v. 23, n. 4, p. 629-643, Jul/Ago. 2010.

BARKER, D. J. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. **Int J Epidemiol.**, Londres. v. 31, p.1235-1239, Dez. 2002.

BARKER, D. J., *et al.* Maternal and social origins of hypertension. **Hypertension.**, Dallas. v. 50, n. 3, p. 565-571, Set. 2007.

BARKER, D. J.; OSMOND. C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet.**, Londres. v.1, n.8489, p.1077-1081, Mai. 1986.

BARKER, D. J. Early growth and cardiovascular disease. **Archives of disease in childhood.**, Londres. v.80, n.4, p.305-7, Abr. 1999.

BARKER, D. J. *et al.* Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **Lancet.**, Londres. v. 2, p. 577-580, Set. 1989.

BARROS, K. M. *et al.* A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. **Nutr Neurosci.**, Amsterdam. v. 9, n.1-2, p.99-104, Abr. 2006.

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

BAZER, F. W. *et al.* Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. **Mol. Human. Reprod.**, Oxford. v. 16, p. 135–152, Mar. 2010.

BENYSHEK, D. C. *et al.* Glucose metabolism is altered in the adequately-nourished grandoffspring (F3 generation) of rats malnourished during gestation and perinatal life. **Diabetologia.**, Berlin. v. 49, p. 1117-1119, Mar. 2006.

BERGMEYER, H. U. *et al.* D-Glucose: Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In.: BERGMEYER, H. U. (ed.). **Methods of Enzymatic Analysis.** New York, 1974. v. 3 p. 1196-1201.

BERTRAM, C. E.; HANSON, M. A. Prenatal programming of postnatal endocrine responses by glucocorticoids. **Reproduction.**, Cambridge. v. 124, p. 459–467. Out. 2002.

BERTRAM, C. *et al.* Transgenerational effects of prenatal nutrient restriction on cardiovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal function. **J. Physiol.**, Londres.. v. 586, p. 2217–2229, Abr. 2008.

BRADFORD, M. M. *et al.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, Orlando. v. 72, p. 248-254, Mai. 1976.

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

CSABA, G. *et al.* Transgenerational effect of neonatal vitamin A or D treatment (hormonal imprinting) on the hormone content of rat immune cells. **Horm. Metab. Res.**, Stuttgart. v. 39, p. 197–201, Mar. 2007.

CHAMPAGNE, F.; MEANEY, M. J. Like mother, like daughter: evidence for non-genomic transmission of parental behavior and stress responsivity. **Prog. Brain. Res.**, Amsterdam. v. 133, p. 287-302, Jan. 2001.

ELLMAN, G. L. Tissue Sulfhydryl Groups. **Archives of biochemistry and biophysics.**, New York. v. 82, p. 70-77. Mai. 1959.

ERIKSSON, J. G. *et al.* Effects of size at birth and childhood growth on the insulin resistance syndrome in elderly individuals. **Diabetologia.**, Berlin. v. 45, p. 342-348, Abr. 2002.

ETCHEGARAY, J. P.; MOSTOSLAVSKY, R. Interplay between Metabolism and Epigenetics: A Nuclear Adaptation to Environmental Changes. **Molecular Cell.**, Cambridge. v. 62, p. 695-711, Jun. 2016.

FALCK-YTTER, Y. *et al.* Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. **Seminars in Liver Disease.**, New York. v. 21, p. 17-26, Jan. 2001.

FAURE, P.; LAFOND, J. L. Measurement of plasma sulphhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: FAVIER, A. E. *et al.* (Eds.). **Analysis of Free Radicals in Biological Systems.** Berlin: Birkhäuser Verlag., 1995. p. 237-248

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **RAMB.**, São Paulo. v. 43, n. 1, p. 61-68, Mar. 1997.

FIBACH, E.; RACHMILEWITZ, E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia. **Current Molecular Medicine.**, Hilversum, v. 8, n. 7, p. 609-619, Nov. 2008.

FUJII, J. *et al.*, Unveiling the roles of the glutathione redox system in vivo by analyzing genetically modified mice. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition.**, Mitake. v. 49, p. 70-78. Jun. 2011.

FREITAS-SILVA, S. R. *et al.* Is the maturation of monosynaptic stretch reflex in rats affected by neonatal malnutrition? **Nutr Neurosci.**, Amsterdam. v.11, n.5, p.207-212, Out. 2008.

GODFREY, K. M.; BARKER, D. J. Fetal programming and adult health. **Public Health Nutr.**, Wallingford. v. 4, p.611–624, Abr. 2001.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. **Pediatr. Res.**, New York, v. 56, n. 3, p. 311-317, Set. 2004.

GLUCKMAN, P. D. *et al.* The fetal, neonatal and infant environments: The longterm consequences for disease risk. **Early Hum. Dev.**, Amsterdam. v. 81, p. 51–59, Jan. 2005.

GLUCKMAN, D. P. *et al.* Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. **American journal of human biology.**, New York. v. 19 p. 1–19. Jan/Fev. 2007.

GLUCKMAN, P. D. *et al.* Non-genomic transgenerational inheritance of disease risk. **BioEssays.**, Cambridge. v. 29, p. 145–154. Fev. 2007.

GLUCKMAN, P. D. *et al.* A conceptual framework for the developmental origins of health and disease. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease.**, Cambridge. v. 1 p. 6–18. Fev. 2010.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferase (Rat and Human). **Meth. Enzymol.**, New York. v. 77, p. 218-230, Mai. 1974.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal Neurochemistry.**, Singapura. v. 97, p. 1634-1658. Jun. 2006.

HERMES, M. L. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: WILEY, John. **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation.** Brasília: Kenneth B. Storey, 2004. p. 319-368.

HILL, B. G.; BHATNAGAR, A. Role of glutathiolation in preservation, restoration and regulation of protein function. **IUBMB Life.**, Londres. v. 59, p. 21–26, Jan. 2007.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal. Biochem.**, Orlando. v. 74, p. 214–226, Jul. 1976.

HUBER, P. C. *et al.* Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova.**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, Abr. 2008.

JACOB, K. D. *et al.* Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related Disease. **Mechanisms of Ageing and Development.**, Lausana. v. 134, p. 139-157, Mar. 2013.

JORDÃO, A. J. *et al.* Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathione reduzida e da vitamina E. **Medicina.**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 434-449, jul/set. 1998.

KOURY J. C., DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev Nutr.**, Campinas. v. 16 n. 4 p. 433-41. Dez. 2003.

LEVIN, B. R. Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. **Phil. Trans. R. Soc. B.**, Londres. v. 361, p. 1107–1121, Jul. 2006.

LILLYCROP, A. K. *et al.* Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a proteinrestricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications. **Br J Nutr.**, Cambridge. v. 97 n. 6 p. 1064–1073. Jun. 2007.

LONG, N. M. *et al.* “Maternal obesity eliminates the neonatal lamb plasma leptin peak”. **Journal of Physiology.**, Londres. v. 589, n. 6, p. 1455–1462, Mar. 2011.

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

MARCONDES, F. K. *et al.* Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Biol.**, São Carlos. v. 62, n. 4A, p. 609-614, Nov. 2002.

MARRS, K. A. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.**, Palo Alto, v. 47, p.127-158, Jun. 1996.

MARTIN, J. F. Nutritional origins of insulin resistance: A rat model for diabetes- prone human populations. **J. Nutr.**, Springfield. v. 130, p. 741–744, Abr. 2000.

MATTEONI, C. A. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. **Gastroenterology.**, Baltimore. v. 116, p.1413-1419, Jun. 1999.

MISRA H. P.; FRIDOVICH I. J. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem.**, Baltimore. v. 247 n. 10 p. 3170- 3175. Mai. 1972.

NASCIMENTO, L. *et al.* The effect of maternal low-protein diet on the heart of adult-offspring: Role of mitochondria and oxidative stress. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism.**, Ottawa. v.10, p. 1139, Ago. 2014.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.**, Austin, v. 3, n. 1, p. 2-12, Jan/Fev. 2010.

PARK K. S, *et al.* Fetal and Early Postnatal Protein Malnutrition Cause Long-Term Changes in Rat Liver and Muscle Mitochondria. **The Journal of Nutrition.**, Springfield. v. 133, n. 10, p. 3085-3090, Out. 2003.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J. Lab. Clin. Med.**, Saint Louis. v. 70, n. 1, p. 158-69, Jul. 1967.

QASEM, R. J.; CHERALA, G. Maternal protein restriction during pregnancy and lactation in rats imprints long-term reduction in hepatic lipid content selectively in the male offspring.

Nutr. Res., New York. v. 30, p. 410–417, Jun. 2010.

REEVES, P. G. *et al.* 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. Nov.**, Springfield. v. 123, n. 11, p. 1939-1951, Nov. 1993.

SAWAYA, A. L. *et al.* Obesity and malnutrition in a Shantytown population in the city of São Paulo, Brazil. **Obes. Res.**, Baton Rouge. v. 3, n. 2, p. 107s-115s, Set. 1995.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **RBME.**, São Paulo. v. 10, n. 10, p. 308-313, Jul/Ago. 2004.

SILVEIRA, P. P. *et al.* Developmental origins of health and disease (dohad) origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (dohad) DOHaD, programming, Barker hypothesis. **J. Pediatr.**, Rio de Janeiro. v. 83, n. 6, p. 494-504, Agos. 2007.

SKINNER, M. K. *et al.* Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. **Trends. Endocrinol. Metab.**, New York. v. 21, p. 214–222, Abr. 2010.

SKINNER, M. K. Environmental epigenetic transgenerational inheritance and somatic epigenetic mitotic stability. **Epigenetics.**, Georgetown. v. 6, p. 838–842, Jul. 2011.

TRIVIÑO, T.; ABIB, S. C. V. Anatomia cirúrgica do fígado. **Acta Cirúrgica Brasileira.**, São Paulo. v. 18, n. 5, p. 407, Out. 2003.

THAMOTHARAN, M. *et al.* Transgenerational inheritance of the insulin resistant phenotypes in embryo- transferred intrauterine growth-restricted adult female rat offspring. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, Bethesda Md. v. 292, p. E1270–E1279, Mai. 2007.

TORRENS, C. *et al.* First evidence for transgenerational vascular programming in the rat protein restriction model. **J. Physiol.**, Londres. v. 543, p. 41P–42P, Ago. 2002.

TOSCANO, A. E. *et al.* Do malnutrition and fluoxetine neonatal treatment program alterations in heart morphology? **Life Sci.**, Amsterdam. v. 82, n. 21-22, p.1131-1136, Mai. 2008.

TOSCANO, A. E. *et al.* Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. **Nutrition.**, Tarrytown. v. 24, n. 3, p. 270-278, Mar. 2008.

VANDEGEHUCHTE, M. B.; JANSSEN, C. R. Epigenetics in an ecotoxicological context. **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.**, Amsterdam. v.764–765, p.36–45, Abr. 2014.

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

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

VIEAU, D. Perinatal nutritional programming of health and metabolic adult disease. **World J Diabetes.**, Villeneuve. v. 2, n. 9, p. 133-136, Set. 2011.

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.**, Vasco de Quiroga. v. 566, p. 225–236, Abr. 2005.

ZANATTA, A. *et al.* Neurochemical evidence that the metabolites accumulating in 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency induce oxidative damage in cerebral cortex of young rats. **Cell Mol Neurobiol.**, New York. v. 33, p. 137-146, Set. 2013.

ZHANG, T. Y. *et al.* Maternal programming of defensive responses through sustained effects on gene expression. **Biol Psychol.**, Amsterdam. v. 73, p. 72-89, Jul. 2006.

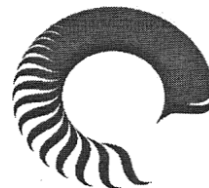
ANEXO A

Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves,
s/n 50670-420 / Recife - PE -
Brasil fones: (55 81) 2126 8840 1

2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



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 Process 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,



PRUa VascO celos
SIAPE 2199635

ANEXO B



CCB: Integrar para desenvolver

Universidade Federal de Pernambuco
Centro Acadêmico de Vitória
Vitória de Santo Antão, PE, Brasil - 55608-680
Tel /Fax 55-81. 3523 3351
e-mail: gpressoascav.ufpe@gmail.com

De: Mariana Pinheiro Fernandes – Professor Adjunto II do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco e Claudia Jacques Lagranha - Professor Adjunto III do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco

Declaração

Eu, Mariana Pinheiro Fernandes, gostaria de informar que o projeto de pesquisa de iniciação científica sendo este o mesmo projeto de TCC, realizado pela aluna Gizele Santiago de Moura Silva, teve a minha orientação científica e está vinculado a um projeto de doutorado já aprovado pelo comitê de Ética da UFPE (Processo nº 23076.018417/2013-73), sob coordenação da Professora Claudia Jacques Lagranha, que é co-orientadora de Gizele. Declaro que foram utilizados os mesmos animais, no entanto, para o projeto de iniciação científica foi utilizado o fígado e no projeto de doutorado, o tronco encefálico, como uma forma de aproveitar ao máximo diferentes tecidos do animal, uma vez que trata-se do mesmo modelo experimental.

Atenciosamente,

Mariana Pinheiro Fernandes

Mariana P. Fernandes
Centro Acadêmico de Vitória - UFPE
Professor Adjunto / Núcleo de Educação
Física e Ciências do Esporte
SIAPE - 1805683

Orientadora

Claudia Jacques Lagranha

Claudia Jacques Lagranha
Professora Adjunta
SIAPE 1802315
Núcleo de Educação Física e Ciência do Esporte
Centro Acadêmico de Vitória/UFPE

Co- orientadora