

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Karen Yurika Kudo

**EFEITO DA DIETA HIPOPROTEICA MATERNA DURANTE A
PRENHEZ SOBRE PARÂMETROS MITOCONDRIAIS EM
ENCÉFALO DA PROLE**

Porto Alegre

2015

Karen Yurika Kudo

**EFEITO DA DIETA HIPOPROTEICA MATERNA
DURANTE A PRENHEZ SOBRE PARÂMETROS
MITOCONDRIAIS EM ENCÉFALO DA PROLE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito parcial para obtenção de grau de bacharel em Nutrição, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora:

Profª Drª Cristiane Matté

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

KUDO, KAREN YURIKA
EFEITO DA DIETA HIPOPROTEICA MATERNA DURANTE A
PRENHEZ SOBRE PARÂMETROS MITOCONDRIAIS EM ENCÉFALO DA
PROLE / KAREN YURIKA KUDO. -- 2015.
59 f.

Orientadora: CRISTIANE MATTÉ.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Medicina, Curso de Nutrição, Porto Alegre, BR-RS,
2015.

1. Desnutrição proteica materna. 2. Cadeia
respiratória. 3. Programação metabólica. 4. Biogênese
mitocondrial. I. MATTÉ, CRISTIANE, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Karen Yurika Kudo

**EFEITO DA DIETA HIPOPROTEICA MATERNA DURANTE A PRENHEZ
SOBRE PARÂMETROS MITOCONDRIAS EM ENCÉFALO DA PROLE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito parcial para obtenção de grau de bacharel em Nutrição, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, ____ de _____ de 2015

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova o Trabalho de Conclusão de Curso **“EFEITO DA DIETA HIPOPROTEICA MATERNA DURANTE A PRENHEZ SOBRE PARÂMETROS MITOCONDRIAS EM ENCÉFALO DA PROLE”**, elaborado por Karen Yurika Kudo, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Nutrição.

Comissão Examinadora:

Profª Drª Cileide Moulin

Prof. Dr. Alexandre Amaral

Profª Drª Cristiane Matté

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos” (Isaac Newton)

AGRADECIMENTOS

Muitos foram aqueles que de forma direta ou indireta, no palco ou nos bastidores, contribuíram para o findar desta etapa da minha vida acadêmica, marcado por este projeto.

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha orientadora, Cristiane Matté que me acompanhou desde o início da minha vida acadêmica. Foram muitos anos de muita paciência, dedicação e carinho. Além de todo conhecimento científico compartilhado, uma pessoa que me orientou em todos os momentos difíceis, profissionais e pessoais. Pude contar e depositar toda minha confiança, alguém que levarei como exemplo de pessoa por toda minha vida.

Agradeço os meus pais por nunca medirem esforços pelo sucesso de seus filhos. Que viram seus filhos voarem cedo para ir em busca de seus sonhos. Obrigada por mesmo distantes e cheios de saudade, me apoiarem, sempre. Amo vocês, mais que tudo.

A minha irmã caçula, que me aguentou reclamar durante toda faculdade. Que me acompanhou madrugadas de estudo acordada, mesmo que virtualmente, apenas pela parceria. Pelas risadas, pelas besteiras, pelos conselhos, obrigada.

A minha irmã mais velha, pelo exemplo de pessoa. Dizem que o filho mais velho possui essa responsabilidade, de dar exemplo ao irmão mais novo. Obrigada por sempre ter me dado esse exemplo de esforço e dedicação nos estudos.

Agradeço à todas minhas amigas, que durante essa caminhada, compartilharam comigo momentos incríveis, momento de descontração e muita diversão. Em especial à Fernanda, que desde o início da faculdade me aguenta, foram anos de muita parceria. As minhas colegas de internato que viveram e compartilharam momentos difíceis e estressante dessa nossa jornada que está se encerrando.

Aos meus colegas do laboratório 23, principalmente à Pauline e à Carol, que me auxiliaram em vários momentos desta etapa e, também, aos alunos do laboratório 21.

E, por fim, meu muito obrigada ao meu companheiro, meu confidente, meu namorado, Victor. Agradeço toda paciência, calma e compreensão durante essa fase tão turbulenta a qual passei. Obrigada por todo amor, carinho e conselhos, obrigada por ter, literalmente, me suportado todo esse tempo. Amo você.

RESUMO

A desnutrição crônica é capaz de induzir prejuízos muitas vezes irreversíveis no desenvolvimento, sendo responsável por altos índices de mortalidade. A desnutrição proteica fetal resulta em déficit de crescimento intrauterino, podendo ocorrer modificações epigenéticas e na programação da função mitocondrial em vários órgãos da prole. Por ocorrer enquanto “*in utero*”, estabelece uma resposta permanente no feto, conduzindo a um aumento da susceptibilidade a doenças crônicas não transmissíveis na vida adulta, tais como diabetes, insuficiência cardíaca e neurodegeneração. Nosso objetivo nesse estudo foi determinar o efeito da dieta hipoproteica em filhotes de rato submetidos à intervenção nutricional nos períodos fetal e lactacional, sobre parâmetros mitocondriais no encéfalo. Ratas Wistar prenhas foram divididas em grupo controle (C), com livre acesso à ração normal com 23% de proteína; e o grupo restrição proteica (RPM), com livre acesso à dieta com 8% de proteína, ambas isocalóricas. Foram mantidas nessas dietas durante toda a gestação (21 dias) e lactação (21 dias). Após o nascimento, no dia pós-natal 0 (PN0), um grupo de filhotes foi eutanasiado, enquanto outro grupo de animais seguiu sob restrição dietética materna até o desmame (PN21). As amostras de cerebelo e córtex cerebral total foram utilizadas nas seguintes análises bioquímicas: atividade enzimática da succinato-desidrogenase (SDH), dos complexos II (succinato-2,6-dicloroindofenol (DCIP)-oxidorreductase) e IV da cadeia respiratória, níveis de superóxido mitocondrial e medida de massa mitocondrial e potencial de membrana, por meio de citometria de fluxo. O projeto foi aprovado pela CEUA/UFRGS sob o N° 25855. A desnutrição proteica ocasionou menor ganho de peso das ratas durante a gestação. Embora a dieta hipoproteica não tenha influenciado no número de filhotes por ninhada, os filhotes submetidos a uma desnutrição *in utero*, tiveram menor peso ao nascer. A dieta materna também resultou em alterações nas atividades das enzimas da cadeia respiratória no cérebro da prole. No cerebelo, obtivemos uma diminuição da atividade da SDH e do complexo IV, tanto em filhotes de 0 dias, como após lactação, assim como uma diminuição dos níveis de superóxido mitocondrial, avaliado por citometria de fluxo. Já no córtex total, tivemos alteração apenas em ratos de 21 dias, ocorrendo um aumento da atividade das enzimas da cadeia respiratória. Em conclusão, a desnutrição proteica nos períodos de gestação e lactação é capaz de induzir efeitos deletérios em estruturas cerebrais, podendo ser permanentes. Dessa forma, o desenvolvimento do encéfalo no período intrauterino é suscetível às modificações ambientais, tais como a dieta materna, induzindo uma programação metabólica que pode influenciar o risco de desenvolvimento de doenças na vida adulta.

Palavras-chave: desnutrição proteica materna, cadeia respiratória, biogênese mitocondrial, programação metabólica.

ABSTRACT

Chronic malnutrition is a major health problem, inducing irreversible impairment to development, being responsible for high mortality rates. The fetal protein malnutrition results in a deficit of intrauterine growth, which establishes a permanent response in the fetus and might increase the incidence of chronic diseases. Considering that a metabolic programming occurs "*in utero*", we believe that epigenetic modifications can occur, resulting in alterations in mitochondrial function in various organs of the offspring. Our main objective was to determine the effect of low protein diet in rat pups submitted to nutritional intervention in the fetal period and lactation, on brain mitochondrial parameters. Pregnant Wistar rats were divided into control group (C), with free access to standard diet with 23% protein; and the protein restriction group (RPM), with free access to diet with 8% protein, both isocaloric. Animals were maintained on these diets throughout pregnancy (21 days) and during the lactation period (21 days). After birth, on postnatal day 0 (PN0), a group of puppies was euthanized, while another group of animals followed in maternal dietary restriction up to weaning (PN21). Cerebellum and total cerebral cortex were used to the following biochemical analyzes: enzymatic activity of succinate dehydrogenase (SDH), respiratory chain complexes II (succinate-2,6-dichloroindophenol (DCIP)-oxidoreductase) and IV, mitochondrial superoxide levels, mitochondrial mass and membrane potential, measured by flow cytometry. The project was approved by a local ethics commission under the N° 25855. Our results showed that protein malnutrition reduced the dam weight gain during pregnancy. Although low protein diet did not influence the number of pups per litter, the puppies undergo malnutrition *in utero* had lower weight at birth. Maternal restricted diet also resulted in changes in the activities of the respiratory chain enzymes in the brain of the offspring. In the cerebellum, we found a decrease in the SDH and complex IV activities both on PN0 and PN21 rats, as well as decreased levels of mitochondrial superoxide assessed by flow cytometry. Conversely, in the total cerebral cortex, we observed increased activity of those enzymes in PN21 rats. In conclusion, protein malnutrition in pregnancy and lactation periods is able to induce deleterious effects on brain structures, concerning mitochondrial parameters. The brain development in intrauterine period is susceptible to environmental changes such as maternal diet, and this metabolic programming may influence the risk of disease development in adulthood.

Keywords: maternal protein malnutrition, respiratory chain, mitochondrial biogenesis, metabolic programming.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Adenosina difosfato

ATP – Adenosina trifosfato

CoQ – Ubiquinona

DCIP – Dicloroindofenol

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERO - Espécies reativas de oxigênio

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

FMN – Flavina mononucleotídeo

GSH - Glutathiona reduzida

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NRF-1 – Fator respiratório nuclear 1

O₂ •⁻ - Superóxido

•OH – Hidroxila

PGC-1α - Coativador de transcrição 1α do receptor ativado por proliferação peroxissomal

PPAR – Receptores ativados por proliferador de peroxissomos

SNC - Sistema nervoso central

SUMÁRIO

REFERENCIAL TEÓRICO	10
Aspectos gerais sobre desnutrição	10
Efeitos da desnutrição no sistema nervoso central	11
Programação fetal	14
Função e biogênese mitocondrial	15
Cadeia transportadora de elétrons	17
Espécies Reativas	20
JUSTIFICATIVA	21
OBJETIVOS	22
Objetivo geral	22
Objetivos específicos	22
HIPÓTESE	22
REFERÊNCIAS	24
ARTIGO ORIGINAL	29
PERSPECTIVAS	49
ANEXO I - CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA	50
ANEXO II - NORMAS DA REVISTA ANNALS OF NUTRITION AND METABOLISM	51

REFERENCIAL TEÓRICO

Aspectos gerais sobre desnutrição

A desnutrição ainda continua sendo um problema de saúde da população brasileira. Embora o perfil nutricional e educacional da população seja outro quando comparado a décadas passadas, o Brasil, assim como outros países em desenvolvimento, preocupa-se com estratégias de saúde pública, a fim de melhorar a atenção à saúde e o cuidado nutricional, promovendo a prevenção da desnutrição e segurança alimentar (SAÚDE, 2008; IYENGAR; NAIR, 2000). De acordo com estudos realizados em diferentes estados brasileiros, a desnutrição têm evidenciado uma tendência de diminuição, enquanto que a prevalência do excesso de peso está aumentando, mas sem que haja a substituição de um perfil pelo outro (BATISTA FILHO *et al*, 2009; CHAGAS *et al*, 2013) Portanto, acredita-se que o país apresenta um grande desafio para as políticas públicas de saúde no momento, pois está convivendo com essa transição nutricional, caracterizada frequentemente pela má-alimentação (BERMUDEZ; TUCKER, 2003). As transformações de ordem econômica, social e demográfica podem nos deparar com a presença da desnutrição, deficiência de micronutrientes, excesso de peso e outras doenças crônicas não transmissíveis nas mesmas comunidades, até mesmo nas mesmas famílias (STANDING COMMITTEE ON NUTRITION, 2006).

Mesmo após uma grande expansão nos serviços e programas de saúde, bem como melhora em ganhos econômicos, a principal causa da desnutrição infantil continua sendo o quadro de pobreza encontrado em algumas regiões brasileiras. Sendo associada a baixa escolaridade materna, condições precárias de moradia e saneamento, maior número de moradores na casa, assim como mães com idade inferior a 20 anos (OLINTO *et al*, 1993). A alimentação insuficiente ou inadequada e o difícil acesso à comida ainda é uma realidade brasileira (MONTE, 2000; UNICEF, 2007).

O termo “desnutrição” pode se referir a diferentes situações. Segundo Morgane et al. (1993), a desnutrição pode ser energética - uma deficiência global de nutrientes - ou uma “má nutrição”, a qual implica em proporções desequilibradas de um ou mais nutrientes, com níveis abaixo ou acima do recomendado. Dessa forma, uma deficiência quantitativa (energia) ou qualitativa (um ou mais nutrientes), o consumo de alimentos de má qualidade nutricional em excesso, bem como algumas doenças metabólicas que alteram de alguma forma a nutrição normal, podem ser considerados como uma má nutrição. Neste trabalho, o termo desnutrição refere-se a uma deficiência quantitativa de proteína.

A desnutrição aguda infantil pode resultar em baixo peso para idade ou para estatura, evidenciado logo no início da infância. Já a desnutrição crônica promove déficits de crescimento linear da criança, ou seja, baixa estatura para a idade (MOTTA; SILVA, 2001), que está associada a prejuízos muitas vezes irreversíveis durante a vida, tais como aumento na mortalidade, maior incidência de doenças infecciosas, prejuízo no desenvolvimento psicomotor, menor aproveitamento escolar, bem como menor capacidade produtiva na vida adulta (BLACK *et al*, 2008; ETUKUDO *et al*, 1999).

Efeitos da desnutrição no sistema nervoso central

O desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) e da capacidade cognitiva são modulados pelo potencial genético, e por inúmeros estímulos ambientais, tais como a nutrição, o exercício físico, o estresse, o consumo de álcool, o fumo, utilização de fármacos e hipóxia (KUMSTA *et al*, 2007; MORGANE *et al*, 1993). O encéfalo continua se desenvolvendo no período pós-natal, ou seja, após o nascimento, o animal ainda possui o SNC imaturo, passando por importantes mudanças tanto quantitativas como qualitativas. As mudanças quantitativas referem-se ao aumento no número

de células (hiperplasia) e as qualitativas à diferenciação e migração celular, formação e eliminação das sinapses, morte celular programada e formação de redes neuronais (ERECINSKA; CHERIAN; SILVER, 2004).

O tempo de maturação do encéfalo varia de uma espécie animal para outra. O SNC passa por uma série de estágios com uma sequência precisa, que se difere de região para região cerebral, sendo assim, o tempo de maturação do SNC depende do animal estudado (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002). Em roedores, essa fase ocorre, principalmente, no período pós-natal, mas já se inicia na última semana de gestação (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002; SCRIMSHAW; GORDON, 1968). Já em seres humanos, a fase de maturação cerebral ocorre desde o último trimestre gestacional até os primeiros anos de vida. Em humanos, os dois primeiros anos de vida são considerados períodos críticos para a depleção nutricional, pois nesta idade, a criança apresenta um crescimento acelerado do corpo e o encéfalo obtém, aproximadamente, 80% do seu tamanho adulto. Dessa forma, é evidente a importância do fornecimento adequado de nutrientes, sendo que a privação proteica pré-natal pode resultar em prejuízos no cerebelo e córtex total, tais como níveis aumentados de peroxidação lipídica e alterações nas atividades das enzimas antioxidantes do cérebro (BONATTO *et al*, 2006). Esses prejuízos podem derivar em anormalidades comportamentais, piora do funcionamento cognitivo e distúrbios no aprendizado e memória. Estudos sugerem que o mecanismo que explica essas alterações é, possivelmente, a diminuição da plasticidade cerebral, o que contribui para o impacto dos desequilíbrios nutricionais no desenvolvimento cerebral, principalmente a plasticidade restaurada que ocorre como resultado da reabilitação nutricional (PAULSEN; MOSER, 1998).

Estruturas do SNC, como, por exemplo, o córtex cerebral, o hipocampo e o cerebelo, possuem alta susceptibilidade a danos, que, quando causados pela desnutrição proteica, geralmente são permanentes ou há muita dificuldade para se reverter completamente (BRONZINO; AUSTIN-LAFRANCE; MORGANE, 1990; DEBASSIO; KEMPER, 1985). Os efeitos do

dano dependem da duração da desnutrição, das características dietéticas e do estágio de desenvolvimento cerebral em que a desnutrição ocorre (DEBASSIO; KEMPER, 1985).

O cerebelo é uma estrutura muito utilizada em estudos sobre os efeitos da desnutrição devido a sua composição simples e sua morfologia bem conhecida. A origem e o desenvolvimento cerebelar nos roedores são caracterizados por uma rápida proliferação celular pós-natal e pela composição celular mais homogênea quando comparada a outras regiões do SNC, o que facilita a correlação das alterações com processos morfológicos da estrutura (ANDERSEN, 2003). Em cerebelo de ratos, o crescimento celular ocorre a partir da proliferação celular de uma camada externa que persiste no rato até o 21º dia pós-natal. Dessa forma, tanto a proliferação quanto o crescimento celular máximo, ocorrem desde o nascimento até o final do período de amamentação (ALTMAN; DAS; SUDARSHAN, 1970; ANDERSEN, 2003)

A desnutrição proteica no período de gestação e lactação é capaz de induzir efeitos deletérios em estruturas cerebrais, com alterações químicas e/ou morfológicas que resultam em disfunção e diminuição do peso cerebral dos filhotes (FALCAO-TEBAS *et al*, 2012; KING *et al*, 2004). Esses efeitos são particularmente graves no período de proliferação e crescimento neuronal (DOBBING; SANDS, 1971). Além disso, a desnutrição proteica pode ser considerada como um fator de estresse materno, podendo predispor uma maior suscetibilidade a distúrbios neurodegenerativos (BALE, 2015). O estresse pré-natal pode causar uma diminuição da proliferação neuronal no hipocampo do feto. Após o desmame, a prole possui menor mielinização, maior comprometimento estrutural dos neurônios e atrofia dendrítica apical, também em hipocampo. Posteriormente, na adolescência e na idade adulta, a desnutrição demonstrou ainda possuir consequências no encéfalo. Alterações na neurogênese, na densidade neuronal, na arquitetura dendrítica e conectividade sináptica permanecem com o passar dos anos (BOERSMA *et al*, 2014).

Programação fetal

A programação fetal é um fenômeno que explica a existência de uma forte relação entre o meio intrauterino adverso e desenvolvimento de doenças na vida adulta. Um processo que, por ocorrer enquanto “*in utero*”, estabelece uma resposta permanente no feto, conduzindo a um aumento da susceptibilidade a doenças na vida adulta, por isso, conhecida como “a origem fetal da doença no adulto” (ARMITAGE; POSTON; TAYLOR, 2008). A programação fetal foi observada em modelos animais de insuficiência placentária induzida por meio da ligação da artéria uterina, ou por meio de modelos de manipulação dietética como, por exemplo, restrição proteica (ARMITAGE *et al*, 2004). Esses modelos animais sugerem que a programação metabólica pode aumentar as chances de sobrevivência do feto sob condições de nutrição precárias e intermitentes e resultar em um metabolismo pós-natal alterado e muitas vezes inapropriado (GOTTLIEB; DA CRUZ; BODANESE, 2008).

Sabe-se que a desnutrição proteica materna resulta em déficit de crescimento fetal (PETRY; OZANNE; HALES, 2001), podendo resultar no desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis na vida adulta, como doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes tipo 2, hiperlipidemia e obesidade. Essas condições são consequência da “programação fetal”, na qual o insulto nutricional sofrido em um período crítico do desenvolvimento fetal afetaria permanentemente o metabolismo do indivíduo (HALES; BARKER, 1992; OZANNE *et al*, 2005; OROZCO-SOLIS *et al*, 2009). Nesse sentido, os tecidos e os órgãos possuem períodos críticos de maturação e desenvolvimento. Dessa forma, agressões sofridas nesses períodos podem repercutir em alterações na estruturação fisiológica e bioquímica do indivíduo, resultando em alterações fenotípicas. Essa plasticidade refere-se à capacidade de modificação do fenótipo do indivíduo, uma adaptação fisiológica, muitas vezes essencial para a saúde, o desenvolvimento e a sobrevivência do recém-nascido (KUMSTA *et al*, 2007; RAVELLI; STEIN; SUSSER, 1976). Dentre essas adaptações podemos verificar um aumento

do *turnover* proteico, uma redução do catabolismo de aminoácidos, da síntese de ureia e da excreção de nitrogênio urinário (TORÚN; CHEW, 1994).

Em contraponto, a placenta possui extrema importância para o adequado desenvolvimento do feto quando exposto a um insulto ambiental materno. Com a privação nutricional de curto ou longo prazo durante a gestação, a placenta tem a função de proteger o feto, mantendo seu crescimento normal através de um mecanismo de autofagia placentária (BALE, 2015).

Função e biogênese mitocondrial

Estudos que visam explicar a relação da desnutrição durante a gravidez e o desenvolvimento de doenças na vida adulta, tais como diabetes e obesidade, sugerem que, em condições adversas do meio ambiente intrauterino, podem ocorrer modificações epigenéticas e programação da função mitocondrial (REUSENS; THEYS; REMACLE, 2011).

As mitocôndrias são organelas celulares responsáveis pela respiração celular, presentes nas células eucarióticas, que possuem como finalidade principal converter a energia contida nos nutrientes em uma forma bioquimicamente utilizável nas variadas reações celulares (ALBERTS, 2008). Interessantemente, a morfologia, tamanho e quantidade das mitocôndrias variam de acordo com o tecido estudado, e podem ser alteradas por diferentes estímulos, dentre os quais o exercício físico (NISOLI *et al*, 2004). Essas organelas possuem uma membrana externa e outra interna, sendo essa altamente especializada e seletiva. As membranas estão separadas por um espaço intermembranas, enquanto o conteúdo fluido compreendido pela membrana interna contém o Ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial e diversas enzimas pertencentes às

vias metabólicas oxidativas (LANOUE; SCHOOLWERTH, 1979). Essas enzimas são responsáveis, por exemplo, pela oxidação do piruvato, dos ácidos graxos (β -oxidação) e do seu produto, o acetil-CoA, via ciclo dos ácidos tricarbóxicos (NELSON; COX, 2014). As enzimas da cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa estão incrustadas na membrana mitocondrial interna (NELSON; COX, 2014; SCARPULLA, 2008).

A disfunção mitocondrial está implicada em diversas doenças humanas, incluindo diabetes, insuficiência cardíaca e neurodegeneração (GLEYZER; SCARPULLA, 2008). Portanto, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visam a modulação das vias de sinalização que controlam a função mitocondrial e sua biogênese possui elevada importância.

Com relação à biogênese mitocondrial, estudos demonstram que a restrição calórica, em mamíferos, parece modular a atividade de importantes reguladores de transcrição, afetando a atividade mitocondrial (GENARO; SARKIS; MARTINI, 2009). Nesse sentido, existe uma complexa rede de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes responsáveis pelo controle da massa e função mitocondriais, sendo eles, principalmente, receptores ativados por proliferadores de peroxissomos α (PPAR α), fator nuclear respiratório 1 (NRF-1) e fator de transcrição mitocondrial A (TFAM) (GLEYZER; SCARPULLA, 2011). O coativador de transcrição 1α do receptor ativado por proliferação peroxissomal (PGC-1 α) serve como um coativador de transcrição direta do PPAR γ . A expressão do gene PGC-1 α é induzida rapidamente pela exposição ao frio, ao exercício de curto prazo e ao jejum; condições fisiológicas conhecidas por aumentar a demanda de mitocôndrias para produzir calor e/ou Adenosina trifosfato (ATP) (TERADA *et al*, 2002). Além do seu papel na biogênese mitocondrial através da sua interação com o PPAR γ , o PGC-1 α regula outras funções, como por exemplo, controle da termogênese, do metabolismo glicídico, da oxidação de ácidos graxos e de anabolizantes mitocondriais (REUSENS; THEYS, REMACLE, 2011). NRF-1 ativa a expressão de TFAM, um fator de transcrição chave que é translocado para a mitocôndria, onde promove a biogênese mitocondrial através da replicação e transcrição do mtDNA. NRF-

1 também pode afetar a expressão de genes mitocondriais (RAMACHANDRAN; YU; GULICK, 2008).

Só muito recentemente é que foi dada atenção ao envolvimento das mitocôndrias como possíveis alvos para a programação fetal, que definirão a suscetibilidade a doenças na vida adulta. Tem sido proposto que a chave que permite a adaptação de um feto sobreviver num ambiente limitado de energia pode ser uma programação da função mitocondrial (REUSENS; THEYS, REMACLE, 2011). Durante o período de gestação, uma alteração do metabolismo e da condição nutricional da mãe é capaz de afetar a atividade mitocondrial em vários órgãos da prole, sendo que as consequências dessas alterações podem ser observadas logo após o nascimento, mas podem se agravar com o passar dos anos (SIMMONS; SUPONITSKY-KROYTER; SELAK, 2005).

Estudos com mesmo protocolo de desnutrição proteica gestacional, mostraram que o insulto nutricional ocasionou alterações nos parâmetros mitocondriais em ilhotas pancreáticas da prole, ocorrendo uma diminuição da codificação gênica mitocondrial de uma subunidade da ATP-sintase, com conseqüente redução da capacidade de produção de ATP através da fosforilação oxidativa, o que pode predispor à intolerância à glicose (THEYS *et al*, 2009). No fígado e no músculo esquelético, o conteúdo de DNA mitocondrial, assim como a expressão do gene codificado pelo DNA mitocondrial também foram reduzidos em ratos submetidos à desnutrição proteica fetal (PARK *et al*, 2003).

Cadeia transportadora de elétrons

Uma série de funções do organismo necessita de energia para sua realização. Síntese de neurotransmissores, vias de sinalização celular, expressão gênica, síntese de hormônios, entre outros, são exemplos de funções que, para seu bom funcionamento, precisam de energia celular

obtida com oxidação de substâncias através da respiração celular. Sabe-se que o principal combustível da célula para processos que requerem energia é o ATP, que, por meio de hidrólise fornece energia às reações bioquímicas e impulsiona reações com delta de energia livre desfavorável (NELSON; COX, 2014).

Como já comentado anteriormente, a mitocôndria é a principal fonte de ATP em organismos aeróbios. Nela ocorrem os processos de oxidação de acetil-CoA no ciclo de Krebs, com conseqüente redução das coenzimas Flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) em FADH_2 e NADH.H^+ , respectivamente. Outras fontes dessas coenzimas são a oxidação de ácidos graxos, que também ocorre na mitocôndria, a oxidação de aminoácidos e a via glicolítica citosólica. Essas coenzimas são reoxidadas na cadeia respiratória, responsável pela transferência de elétrons até o aceptor final, oxigênio, resultando em água. A energia de transferência dos elétrons é conservada como um gradiente de prótons, que são acumulados no espaço intermembranas. O gradiente eletroquímico é utilizado para a síntese de ATP na fosforilação oxidativa, catalisada pela ATP-sintase (NELSON; COX, 2014).

A cadeia respiratória é formada por quatro complexos. De uma forma geral, os complexos I e II são responsáveis pela transferência dos elétrons para a ubiquinona a partir dos doadores NADH, no complexo I, e do succinato, no complexo II. Em seqüência, o complexo III catalisa o transporte dos elétrons da ubiquinona até o citocromo *c* e, por fim, o complexo IV transfere os elétrons do citocromo *c* até o oxigênio (NELSON; COX, 2014).

No complexo I, a transferência de elétrons do NADH para a ubiquinona (CoQ) forma ubiquinol (QH_2). A NADH-desidrogenase, componente do complexo I, é responsável pela reoxidação do NADH e tem como grupo prostético a flavina mononucleotídeo (FMN), que, assim como o FAD, é um derivado da riboflavina. Ao receber dois prótons e dois elétrons é reduzido a FMNH_2 . Através da NADH-desidrogenase ocorre o bombeamento de quatro

prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas (NELSON; COX, 2014; LIEBERMAN; MARKS; SMITH, 2008; BERG *et al.*, 2007).

O complexo II é formado pela succinato-desidrogenase (SDH), alguns centros de Fe-S e pelo citocromo b560. A SDH é uma enzima responsável pela oxidação do succinato a fumarato, com a geração de FADH₂. Com a transferência dos elétrons e prótons do succinato para o FAD, ocorre a redução deste a FADH₂, que permanece no complexo como grupo prostético, e dá sequência à cadeia transportadora de elétrons via redução da CoQ. A glicerol-fosfato-desidrogenase e a acil-CoA-desidrogenase, via proteína transferidora de elétrons, também são enzimas que catalisam a transferência de elétrons do FADH₂ para CoQ, reduzindo a QH₂ (NELSON; COX, 2014; LIEBERMAN; MARKS; SMITH, 2008; BERG *et al.*, 2007)

O complexo III é responsável pela transferência de elétrons do ubiquinol para o citocromo c, ocorrendo o bombeamento de mais quatro prótons para o espaço intermembranas. E, por fim, o complexo IV, recebe os 4 elétrons, um a um do citocromo c e os doa para o oxigênio molecular que, ao receber os 4 prótons provenientes da matriz, é convertido em 2 moléculas de água (NELSON; COX, 2014)

O bombeamento de prótons pela cadeia respiratória mitocondrial forma um gradiente eletroquímico, o qual é utilizado pela ATP-sintase como uma força motriz, para a formação de ATP, a partir de adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico. O ATP é transportado para fora da mitocôndria com o concomitante transporte de ADP para dentro da mitocôndria, através de um sistema antiporte QH₂ (NELSON; COX, 2014; BERG *et al.*, 2007).

A demanda de ATP varia de acordo com o estado fisiológico, e com o tecido. O cérebro é um tecido de alta demanda energética, mesmo estando em repouso, representando em torno de 20% do consumo de todo organismo. Dessa forma, deficiências no funcionamento normal da cadeia respiratória mitocondrial, com conseqüente diminuição da síntese de ATP, pode acarretar em sérios prejuízos ao tecido. Além disso, sabe-se que alterações na cadeia respiratória podem ocasionar morte celular e,

possivelmente, diminuir a longevidade (ANKARCRONA *et al*, 1995; CADENAS; DAVIES, 2000).

Espécies Reativas

As espécies reativas são produzidas naturalmente no metabolismo, e possuem muitas funções fisiológicas relevantes tais como a sinalização celular, a defesa do organismo pelo sistema imune, a vasodilatação e a neurotransmissão (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Quando produzidas em excesso, ou não eliminadas adequadamente pelas defesas antioxidantes, podem gerar uma condição conhecida como estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Estudos que relacionam os efeitos da desnutrição sobre o estresse oxidativo demonstram que o desequilíbrio entre a geração de radicais livres e a capacidade antioxidante pode ter um significativo efeito na patofisiologia da desnutrição proteica (GOLDEN, 2002).

Os radicais livres de oxigênio são capazes de reagir com outras moléculas por possuírem um elétron desemparelhado em sua órbita externa, possibilitando a retirada de elétrons de outras moléculas, o que resulta na modificação estrutural dessa molécula (YU, 1994). A respiração mitocondrial utiliza cerca de 85 a 90% do oxigênio consumido, através da cadeia de transporte de elétrons, enquanto o restante é utilizado por oxidases e oxigenases, além de reações químicas de oxidação diretas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A respiração mitocondrial é a principal fonte de radicais livres de oxigênio, especialmente o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), formado pela redução monoelétrica do O_2 . Esse radical livre é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma espécie reativa de oxigênio (ERO) não radicalar, pela enzima superóxido-dismutase. O peróxido de hidrogênio é eliminado por diferentes sistemas enzimáticos, dentre eles a catalase, glutathiona-peroxidase, peroxirredoxinas e tioredoxinas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A deficiência na atividade enzimática pode resultar

em acúmulo de H_2O_2 , que, na presença de íons Fe^{2+} ou Cu^+ , pode gerar um dos mais danosos radicais livres, o hidroxil ($\cdot OH$), via reações de Fenton e Haber-Weiss, respectivamente (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Além das enzimas antioxidantes citadas acima, as células contam ainda com os antioxidantes não-enzimáticos obtidos da dieta ou sintetizados endogenamente, tais como as vitaminas C e E, polifenóis, ácido úrico, creatina, e glutathione (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O cérebro é um tecido com alta demanda metabólica, e altamente suscetível ao ataque oxidativo. Alguns dos fatores que contribuem para essa característica são: alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados nas membranas, alta concentração de ferro, deficiência em alguns tipos de antioxidantes, e alto consumo de oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O córtex cerebral, o hipocampo e o cerebelo são altamente susceptíveis a alterações no estado oxidativo quando submetidos à desnutrição proteica, tanto pré como pós-natal. Estudos que avaliaram tais alterações demonstraram um aumento nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e do índice de peroxidação lipídica no cerebelo e córtex cerebral, assim como uma diminuição na atividade da catalase em ratos que sofreram desnutrição proteica intrauterina (BONATTO *et al*, 2006; EVANS, 1993; FEOLI *et al*, 2006; GARCIA; RODRIGUEZ-MALAVER; PENALOZA, 2005).

JUSTIFICATIVA

Considerando a forte relação entre o meio intrauterino adverso e o possível envolvimento da programação metabólica mitocondrial no desenvolvimento de doenças na vida adulta e que, atualmente, encontramos estudos que avaliam os efeitos da desnutrição proteica na produção de espécies reativas, alterações nas atividades enzimáticas antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em cérebros de ratos adultos e que poucos visam avaliar o efeito da dieta hipoproteica materna nos

filhotes, acreditamos que estudos os quais verifiquem parâmetros mitocondriais como, a atividade enzimática da cadeia respiratória, biogênese e massa mitocondrial da prole submetida à desnutrição proteica *in utero*, complementariam a literatura, esclarecendo os efeitos do consumo de proteína inadequado durante a gestação.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito da dieta hipoproteica sobre parâmetros mitocondriais no encéfalo de filhotes de rato submetidos à intervenção nutricional no período fetal e lactacional.

Objetivos específicos

- Avaliar a atividade enzimática da SDH, dos complexos II e IV da cadeia transportadora de elétrons, em amostras encefálicas de filhotes de mães submetidas à dieta restrita em proteínas no período gestacional e lactacional.
- Verificar o efeito da desnutrição proteica pré-natal e lactacional sobre os níveis de superóxido mitocondrial, medida de massa mitocondrial e potencial de membrana em cerebelo e córtex cerebral de ratos, utilizando citometria de fluxo.

HIPÓTESE

Considerando que o desenvolvimento do SNC no período intrauterino e lactacional é suscetível a modificações ambientais, tais como a dieta materna, e que essa programação metabólica pode influenciar o risco de doenças na vida adulta, acredita-se que uma restrição proteica durante a gestação pode ocasionar alterações definitivas no feto, como, por exemplo, uma alteração na função e biogênese mitocondrial.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. Molecular biology of the cell. **ed 5th ed. New York, Garland Science; [London : Taylor & Francis, distributor], 2008.**

ALTMAN, J.; DAS, G.D.; SUDARSHAN, K. The influence of nutrition on neural and behavioral development. I. Critical review of some data on the growth of the body and the brain following dietary deprivation during gestation and lactation. **Developmental psychobiology**, 3:281-301, 1970.

ANDERSEN, S.L. Trajectories of brain development: Point of vulnerability or window of opportunity? **Neuroscience and biobehavioral reviews**, 27:3-18, 2003.

ANKARCORONA, M. *et al.* Glutamate-induced neuronal death: A succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron**, 15:961-973, 1995.

ARMITAGE, J.A. *et al.* Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: How strong is the evidence from experimental models in mammals? **The Journal of physiology**, 561:355-377, 2004.

ARMITAGE, J.A.; POSTON, L.; TAYLOR, P.D. Developmental origins of obesity and the metabolic syndrome: The role of maternal obesity. **Frontiers of hormone research**, 36:73-84, 2008.

BALE, T.L. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. **Nature reviews Neuroscience**, 16:332-344, 2015.

BATISTA FILHO, M. *et al.* Anemia e obesidade: um paradoxo da transição nutricional brasileira. **Cadernos de saúde pública**, 24:247-257, 2008.

BERG, J.M. *et al.* Biochemistry. **ed 6th ed. New York, W. H. Freeman; Basingstoke: Palgrave [distributor], 2007.**

BERMUDEZ, O.I. & TUCKER, K.L. Trends in dietary patterns of latin american populations. **Cadernos de saúde pública**, 19 Suppl 1:S87-99, 2003.

BLACK, R.E. *et al.* Maternal and child undernutrition: Global and regional exposures and health consequences. **Lancet**, 371:243-260, 2008.

BOERSMA, G.J. *et al.* Long-term impact of early life events on physiology and behaviour. **Journal of neuroendocrinology**, 26:587-602, 2014.

BONATTO, F. *et al.* Effects of maternal protein malnutrition on oxidative markers in the young rat cortex and cerebellum. **Neuroscience letters**, 406:281-284, 2006.

BRONZINO, J.D.; AUSTIN-LAFRANCE, R.J.; MORGANE, P.J. Effects of prenatal protein malnutrition on perforant path kindling in the rat. **Brain research**, 515:45-50, 1990.

CADENAS, E. & DAVIES, K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free radical biology & medicine**, 29:222-230, 2000.

CHAGAS, D.C. *et al.* Prevalência e fatores associados à desnutrição e ao excesso de peso em menores de cinco anos nos seis maiores municípios do Maranhão, **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 16(1):146-156, 2013.

DEBASSIO, W.A. & KEMPER, T.L. The effects of protein deprivation on neuronal migration in rats. **Brain research**, 352:191-196, 1985.

DOBBING, J. & SANDS, J. Vulnerability of developing brain. Ix. The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth-spurt. **Biology of the neonate**, 19:363-378, 1971.

ERECINSKA, M.; CHERIAN, S.; SILVER, I.A. Energy metabolism in mammalian brain during development. **Progress in neurobiology**, 73:397-445, 2004.

ETUKUDO, M. *et al.* Biochemical changes and liver tissue pathology in weanling wistar albino rats with protein-energy malnutrition (pem). **African journal of medicine and medical sciences**, 28:43-47, 1999.

EVANS, P.H. Free radicals in brain metabolism and pathology. **British medical bulletin**, 49:577-587, 1993.

FALCAO-TEBAS, F. *et al.* Maternal low-protein diet-induced delayed reflex ontogeny is attenuated by moderate physical training during gestation in rats. **The British journal of nutrition**, 107:372-377, 2012.

FEOLI, A.M. *et al.* Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. **Nutrition**, 22:160-165, 2006.

GARCIA, Y.J.; RODRIGUEZ-MALAVAR, A.J.; PENALOZA, N. Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices. **Journal of neuroscience methods**, 144:127-135, 2005.

GENARO, P.S.; SARKIS, K.S.; MARTINI, L.A. O efeito da restrição calórica na longevidade. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 53:667-672, 2009.

GLEYZER, N. & SCARPULLA, R.C. Pgc-1-related coactivator (prc), a sensor of metabolic stress, orchestrates a redox-sensitive program of inflammatory gene expression. **The Journal of biological chemistry**, 286:39715-39725, 2011.

GOLDEN, M.H. The development of concepts of malnutrition. **The Journal of nutrition**, 132:2117S-2122S, 2002.

GOTTLIEB, M.G.V.; DA CRUZ, I.B.M.; BODANESE, L.C. Origem da síndrome metabólica: Aspectos genético-evolutivos e nutricionais. **Scientia Medica**, 18:31-38, 2008.

HALES, C.N. & BARKER, D.J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: The thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, 35:595-601, 1992.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. **New York, Oxford University**, 2007.

IYENGAR, G.V. & NAIR, P.P. Global outlook on nutrition and the environment: Meeting the challenges of the next millennium. **The Science of the total environment**, 249:331-346, 2000.

KING, R.S. *et al.* Effects of prenatal protein malnutrition and acute postnatal stress on granule cell genesis in the fascia dentata of neonatal and juvenile rats. **Brain research Developmental brain research**, 150:9-15, 2004.

KUMSTA, R. *et al.* Cortisol and acth responses to psychosocial stress are modulated by corticosteroid binding globulin levels. **Psychoneuroendocrinology**, 32:1153-1157, 2007.

LANOUE, K.F. & SCHOOLWERTH, A.C. Metabolite transport in mitochondria. **Annual review of biochemistry**, 48:871-922, 1979.

LIEBERMAN, M.; MARKS, A.D.; SMITH, C.M. Marks' basic medical biochemistry : A clinical approach. **ed 3rd ed. Philadelphia, Pa. ; London, Lippincott Williams & Wilkins**, 2008.

MONTE, C.M.G. Desnutrição: Um desafio secular à nutrição infantil. **Jornal de Pediatria**, 76:285-297, 2000.

MORGANE, P.J. *et al.* Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, 17:91-128, 1993.

MORGANE, P.J.; MOKLER, D.J.; GALLER, J.R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, 26:471-483, 2002.

MOTTA, M.E.F.A. & SILVA, G.A.P. Desnutrição e obesidade em crianças: Delineamento do perfil de uma comunidade de baixa renda. **Jornal de Pediatria**, 77:288-294, 2001.

NELSON, D.L. & COX, M.M. Princípios de bioquímica de Lehninger. **ed 6th. Porto Alegre, Artmed**, 2014.

NISOLI, E. *et al.* Mitochondrial biogenesis by no yields functionally active mitochondria in mammals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 101:16507-16512, 2004.

NUTRITION SCO. Diet-related chronic diseases and double burden of malnutrition in west africa. **London: United Nations System; (Standing Committee on Nutrition News, 33)**, 2006.

OROZCO-SOLIS, R. *et al.* Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. **Physiology & behavior**, 96:481-492, 2009.

OZANNE, S.E. *et al.* Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin-signalling protein expression. **Diabetologia**, 48:547-552, 2005.

PARK *et al.* Fetal and early postnatal protein malnutrition cause long-term changes in rat liver and muscle mitochondria. **The Journal of nutrition**, 133(10):3085-3090, 2003.

PAULSEN, O. & MOSER, E.I. A model of hippocampal memory encoding and retrieval: Gabaergic control of synaptic plasticity. **Trends in neurosciences**, 21:273-278, 1998.

PETRY, C.J.; OZANNE, S.E.; HALES, C.N. Programming of intermediary metabolism. **Molecular and cellular endocrinology**, 185:81-91, 2001.

RAMACHANDRAN, B.; YU, G.; GULICK, T. Nuclear respiratory factor 1 controls myocyte enhancer factor 2a transcription to provide a mechanism for coordinate expression of respiratory chain subunits. **The Journal of biological chemistry**, 283:11935-11946, 2008.

RAVELLI, G.P.; STEIN, Z.A.; SUSSER, M.W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **The New England journal of medicine**, 295:349-353, 1976.

REUSENS, B.; THEYS, N.; REMACLE, C. Alteration of mitochondrial function in adult rat offspring of malnourished dams. **World journal of diabetes**, 2:149-157, 2011.

SAÚDE, M.D. Operational manual for health and educational professionals: Healthy food promotion in schools, 2008.

SCARPULLA, R.C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. **Physiological reviews**, 88:611-638, 2008.

SCRIMSHAW, N.S. & GORDON, J.E. Nutrition Foundation (New York), Massachusetts Institute of Technology (Cambridge Mass.): Malnutrition, learning and behavior: Proceedings of an international conference cosponsored by the nutrition foundation, inc., and the massachusetts institute of technology

held at cambridge, massachusetts march 1 to 3, 1967. Cambridge Mass. ; London, The M.I.T. Press, 1968.

SIMMONS, R.A.; SUPONITSKY-KROYTER, I.; SELAK, M.A. Progressive accumulation of mitochondrial DNA mutations and decline in mitochondrial function lead to beta-cell failure. **The Journal of biological chemistry**, 280:28785-28791, 2005.

TERADA, S. *et al.* Effects of low-intensity prolonged exercise on pgc-1 mrna expression in rat epitrochlearis muscle. **Biochemical and biophysical research communications**, 296:350-354, 2002.

THEYS, N. *et al.* Maternal low-protein diet alters pancreatic islet mitochondrial function in a sex-specific manner in the adult rat. **American journal of physiology**, 297(5): 1516-1525, 2009.

TORÚN, B. & CHEW, F. Protein-energy malnutrition. **Modern Nutrition in Health and Disease**. 2:950-76, 1994.

UNICEF. The state of the world's children 1998: A unicef report. Malnutrition: Causes, consequences, and solutions. **Nutrition reviews**, 56:115-123, 1998.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological reviews**, 74:139-162, 1994.

ARTIGO ORIGINAL

**“EFEITO DA DIETA HIPOPROTEICA MATERNA DURANTE A PREENHEZ E LACTAÇÃO
SOBRE PARÂMETROS MITOCONDRIAIS NO ENCÉFALO DA PROLE”**

Periódico de escolha:

Annals of Nutrition and Metabolism

Abreviatura: Ann Nutr Metab

Fator de Impacto: 2.747

ISSN: 0250-6807 (Print)

e-ISSN: 1421-9697 (Online)

EFEITO DA DIETA HIPOPROTEICA MATERNA DURANTE A PRENHEZ E LACTAÇÃO SOBRE PARÂMETROS MITOCONDRIAIS NO ENCÉFALO DA PROLE

Karen Yurika Kudo¹; Pablo Couto¹; Pauline Maciel²; Caroline Klein²;
Belisa Parmeggiani², Guilhian Leipnitz^{1,2}, Cristiane Matté^{1,2}

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil;

² Programa de Pós graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil;

Endereço para correspondência: Cristiane Matté, PhD, Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo (Laboratório 23), CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil, Telefone: +55 51 3308 5548, Fax: +55 51 3308 5535, [e-mail: matte@ufrgs.br](mailto:matte@ufrgs.br).

RESUMO

A desnutrição é capaz de induzir prejuízos muitas vezes irreversíveis no desenvolvimento, sendo responsável por altos índices de mortalidade. A desnutrição proteica fetal resulta em déficit de crescimento intrauterino, podendo ocorrer modificações epigenéticas e na programação da função mitocondrial em vários órgãos da prole. Por ocorrer enquanto “*in utero*”, estabelece uma resposta permanente no feto, conduzindo a um aumento da susceptibilidade a doenças crônicas não transmissíveis na vida adulta. Nosso objetivo foi determinar o efeito da dieta hipoproteica em filhotes de rato submetidos à intervenção nutricional nos períodos fetal e lactacional, sobre parâmetros mitocondriais no encéfalo. Ratas Wistar prenhas foram divididas em grupo controle, com livre acesso à ração normal (23% de proteína); e o grupo restrição proteica, com livre acesso à dieta hipoproteica (8% de proteína), isocalóricas. Permaneceram nessas dietas durante toda a gestação e lactação. Após o nascimento (PN0), um grupo de filhotes foi eutanasiado, enquanto outro grupo seguiu sob restrição dietética materna até o desmame (PN21). O cerebelo e córtex cerebral total foram utilizadas nas seguintes análises bioquímicas: atividade enzimática da succinato-desidrogenase (SDH), dos complexos II (succinato-2,6-dicloroindofenol (DCIP)-oxidorreductase) e IV da cadeia respiratória, níveis de superóxido mitocondrial e medida de massa mitocondrial e potencial de membrana, por meio de citometria de fluxo. O projeto foi aprovado pela CEUA/UFRGS sob o N° 25855. A desnutrição proteica ocasionou menor ganho de peso das ratas durante a gestação. Embora a dieta hipoproteica não tenha influenciado no número de filhotes por ninhada, os filhotes submetidos a uma desnutrição *in utero*, tiveram menor peso ao nascer. A dieta materna também resultou em alterações nas atividades das enzimas da cadeia respiratória no cérebro da prole. No cerebelo, obtivemos uma diminuição da atividade da SDH e do complexo IV, tanto em filhotes de 0 dias, como após lactação, assim como uma diminuição dos níveis de superóxido mitocondrial, avaliado por citometria de fluxo. Já no córtex total, tivemos alteração apenas em ratos de 21 dias, ocorrendo um aumento da atividade das enzimas da cadeia respiratória. Em conclusão, a desnutrição proteica nos períodos de gestação e lactação é capaz de induzir efeitos deletérios em estruturas cerebrais, podendo ser permanentes. Dessa forma, o desenvolvimento do encéfalo no período intrauterino é suscetível às modificações ambientais, tais como a dieta materna, induzindo uma programação metabólica que pode influenciar o risco de desenvolvimento de doenças na vida adulta.

Palavras-chave: desnutrição proteica materna, cadeia respiratória, biogênese mitocondrial, programação metabólica.

INTRODUÇÃO

Mesmo com as mudanças e transformações de ordem econômica, social e demográfica, a desnutrição infantil continua sendo um problema de saúde em algumas localidades brasileiras. Estratégias de saúde pública e programas que garantam a segurança alimentar ainda constituem uma preocupação para a política nacional [1, 2], pois a alimentação insuficiente ou inadequada e o difícil acesso à comida continuam sendo uma realidade brasileira [3, 4]. A desnutrição pode ser definida como uma deficiência global de nutrientes ou uma má nutrição, a qual implica em proporções desequilibradas de um ou mais nutrientes, com níveis abaixo ou acima do recomendado [5]. Ocorrendo essa deficiência ou desequilíbrio nutricional na infância, as consequências podem resultar em baixo peso para idade ou para estatura, assim como um déficit de crescimento linear da criança, ou seja, baixa estatura para idade [6]. Essas alterações estão associadas a maior mortalidade, maior incidência de doenças infecciosas, prejuízo no desenvolvimento psicomotor, menor aproveitamento escolar e menor capacidade produtiva na idade adulta, prejuízos muitas vezes irreversíveis durante a vida [7, 8].

Existe uma forte relação entre o meio intrauterino adverso e o desenvolvimento de doenças na vida adulta [9]. Essa relação é explicada por um fenômeno conhecido por “programação fetal” que, por ocorrer enquanto “*in utero*”, estabelece uma resposta permanente no feto, conduzindo a um aumento da susceptibilidade a doenças na vida adulta [10]. A desnutrição proteica fetal resulta em déficit de crescimento intrauterino [11] e no aumento do risco de desenvolvimento de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes tipo 2, hiperlipidemia e obesidade. Dessa forma, a “programação fetal” é uma resposta ao insulto nutricional sofrido em um período crítico do desenvolvimento, afetando permanentemente o metabolismo do indivíduo [12-14]. Os estudos que visam explicar a origem fetal da doença no adulto sugerem que, em condições adversas do meio ambiente intrauterino, podem ocorrer modificações epigenéticas e uma programação da função

mitocondrial [15]. Só muito recentemente é que foi dada atenção ao envolvimento das mitocôndrias como possíveis alvos para a programação fetal. A mitocôndria exerce uma série de funções no metabolismo humano, desde a síntese de ATP até o controle da morte celular por apoptose, e danos em sua integridade e funcionalidade podem interferir na viabilidade celular [16]. O comprometimento da função mitocondrial tem grandes implicações para doenças como diabetes, insuficiência cardíaca e neurodegeneração [16, 17]. Com relação à biogênese mitocondrial, estudos demonstram que a restrição calórica, em mamíferos, parece modular a atividade de importantes reguladores de transcrição, afetando a atividade mitocondrial [18]. Durante o período de gestação, uma alteração do metabolismo e da condição nutricional da mãe é capaz de afetar a atividade mitocondrial em vários órgãos da prole, sendo que as consequências dessas alterações podem ser observadas logo após nascimento, mas podem se agravar com o passar dos anos [19]. Em adição, a desnutrição proteica também altera o status antioxidante celular, já que se tem observado alterações nas concentrações das defesas antioxidantes não-enzimáticas, principalmente da glutathiona (GSH) [20]. Estudos que relacionam os efeitos da desnutrição sobre o estresse oxidativo demonstram que o desequilíbrio entre a geração de radicais livres e a capacidade antioxidante pode ter um significativo efeito na fisiopatologia da desnutrição proteica [21, 22]. O cérebro é especialmente sensível ao estresse oxidativo, pois apresenta alta taxa de atividade metabólica, alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados, regiões ricas em ferro e moderados níveis de antioxidantes [23].

Dessa forma, com o pressuposto de que a chave que permite a adaptação de um feto sobreviver num ambiente limitado de energia pode ser uma programação da função mitocondrial e que a desnutrição proteica pré-natal pode ser capaz de promover alterações na atividade mitocondrial em vários órgãos da prole, acreditamos que mais estudos são necessários para elucidar se o metabolismo mitocondrial está envolvido no mecanismo pelo qual a desnutrição proteica exerce seus efeitos deletérios. Regiões como o córtex cerebral e o cerebelo são altamente susceptíveis a

alterações no estado oxidativo quando submetidos à desnutrição proteica, tanto pré como pós-natal [21, 22], podendo ocasionar deficiências no funcionamento normal da cadeia respiratória mitocondrial, com consequente diminuição da síntese de ATP [24]. Considerando o exposto, nosso trabalho tem como objetivo verificar o efeito da desnutrição proteica pré-natal e lactacional sobre parâmetros mitocondriais no córtex total e cerebelo da prole.

MÉTODOS

Animais e Reagentes

Foram utilizados ratos Wistar (34 fêmeas e 17 machos adultos de 90 dias para o acasalamento, 68 filhotes machos) provenientes do biotério do Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS. Os animais foram mantidos à temperatura constante de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ com acesso a alimento, de acordo com o grupo o qual pertence e à água *ad libitum*. Os animais ficaram durante todo o período de estudo em sala destinada para tratamento e manipulação de animais, no biotério do Departamento de Bioquímica. A prole foi mantida com a mãe em caixa individual (41 x 34 x 16 cm) forrada com maravalha até o desmame aos 21 dias de vida pós-natal.

A utilização de animais seguiu as normativas nacionais que regem o uso de animais em pesquisa, a Lei 11.794/2008 e as Resoluções Normativas do CONCEA, incluindo o princípio dos 3R's (*reduction, replacement, and refinement*). Todos os esforços foram realizados a fim de reduzir o número de animais utilizados nesse estudo, bem como reduzir a dor e o estresse durante os experimentos. O protocolo experimental foi aprovado na CEUA, de acordo com carta em anexo sob o N° 25855.

Os reagentes utilizados para as técnicas descritas a seguir foram adquiridos da empresa SIGMA® Chemical Co. (St.Louis, Missouri, USA) e Invitrogen (Carlsbad, USA).

Modelo Experimental

Ratas Wistar adultas foram colocadas em caixas com machos na proporção de 1 macho para 2 fêmeas durante a fase noturna e, assim, o dia seguinte foi considerado o primeiro dia de gestação. As ratas grávidas foram alojadas em grupos de três ratas por caixa, e próximo ao dia de nascimento dos filhotes as ratas foram alojadas em caixa individuais para o parto.

Os animais foram divididos em grupo controle (C), com livre acesso à ração normal com 23% de proteína e o grupo restrição proteica (RPM), com livre acesso à dieta com 8% de proteína, ambas isocalóricas (Tabela 1).

Tabela 1. Composição das dietas

	CONTROLE	HIPOPROTEICA
Ingredientes (g)		
Proteína	230,00	80,00
Amido de milho	676,00	826,60
Óleo de soja	50,00	50,00
Mistura de vitaminas**	4,00	4,00
Mistura de minerais**	40,00	40,00
Análise		
Energia Total (kcal)	4070,4	4070,4
Proteína %	23,0%	8,0%
Carboidrato %	66,0%	81,0%
Lipídios %	11,0%	11,0%

** As misturas de sais e vitaminas foram formuladas de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition Rodents Diets, AIN-93G*, nas mesmas quantidades da dieta controle [25].

As ratas Wistar foram mantidas nessas dietas durante toda a gestação (21 dias) e durante o período de lactação (21 dias). Diariamente e durante todo o período experimental as ratas foram avaliadas quanto ao peso corporal, para avaliação de perda ou ganho de peso. Completamos diariamente 100g de ração e pesamos no dia seguinte no mesmo horário a quantidade de ração residual, possibilitando avaliação do consumo alimentar das ratas Wistar.

Após o nascimento (PN0), um grupo de filhotes foi eutanasiado, enquanto outro grupo de animais seguiu sob restrição dietética materna até o desmame (PN21), e, então, foram eutanasiados por decapitação sem anestesia.

As estruturas cerebelo e córtex cerebral total foram dissecadas, sendo utilizadas imediatamente (parâmetros avaliados por citometria) ou armazenadas a -80°C e descongeladas quando oportuno (avaliação da atividade da cadeia respiratória).

Ensaio Bioquímicos

Atividade das enzimas da cadeia respiratória

As amostras foram homogeneizadas (1:20, v/v) em tampão SET (sacarose 250 mM, EDTA 2 mM e trisma base 10 mM) pH 7,4 e centrifugados a $800 \times g$ por 10 min a 4°C e o sobrenadante utilizado para a determinação das atividades enzimáticas.

A atividade da SDH e do complexo II (succinato-2,6-dicloroindofenol (DCIP)-oxidoreductase) foi medida espectrofotometricamente a 600 nm [26].

A atividade da citocromo c oxidase (complexo IV) foi medida de acordo com Rustin et al. [27] por um decréscimo na absorvância devido à oxidação do citocromo c a 550 nm.

Parâmetros de biogênese mitocondrial, medida de massa mitocondrial e potencial de membrana mitocondrial

O tecido foi dissociado em tampão PBS pH 7,4 contendo 1 mg% de colagenase e 0,5 mg% de DNase. Os níveis de superóxido mitocondrial, o potencial de membrana e o número de mitocôndrias foram determinados por meio de citometria de fluxo utilizando-se as sondas moleculares da marca Invitrogen®, MitoSOX® Red, MitoTracker® Red CM-H₂XRos e

MitoTracker® Green FM, respectivamente [28]. Os protocolos utilizados seguiram as diretrizes dos fabricantes, com algumas modificações desenvolvidas em nosso laboratório para adaptação das técnicas. Foi realizada a análise de 10.000 eventos no citômetro, e a quantificação foi realizada por meio do software FlowJo®.

Concentração de proteínas

A determinação da concentração proteica foi realizada utilizando-se albumina bovina sérica como padrão, de acordo com Lowry *et al.* [29].

Análise Estatística

Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias, seguido do teste de Tukey, quando o F teste foi significativo. Os dados foram avaliados pelo programa Graph Pad 6.0. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

A dieta hipoproteica materna reduz o ganho de peso durante a gestação

A figura 1 mostra a média de ganho de peso das ratas durante a gestação (21 dias). O grupo C apresentou ganho contínuo de peso, enquanto que o grupo RPM teve seu peso diminuído nas primeiras semanas de gestação e uma pequena recuperação até o parto, entretanto não evidenciamos diferenças estatísticas ($p > 0,05$ em todos os tempos avaliados).

Em relação às ninhadas, embora não tenhamos verificado diferença no número de filhotes por ninhada nos diferentes grupos (média das normotratadas de 9 filhotes/ninhada e das hipotratadas de 8 filhotes/ninhada), tivemos diferença na média dos pesos. Os filhotes que sofreram a desnutrição proteica no período fetal tiveram menor peso ao nascer comparado aos controles ($t(9)=2,488$; $p < 0,05$).

A restrição proteica pré-natal e lactacional altera a atividade das enzimas da cadeia respiratória em cerebelo e córtex cerebral da prole

No cerebelo verificamos uma diminuição da atividade enzimática da SDH (Figura 2A) em relação ao controle no grupo restrição proteica, em amostras de ratos de 0 [$t(7)=2,952$, $p=0,0121$] e 21 dias [$t(6)=4,800$, $p=0,0007$], enquanto não houve diferença significativa na atividade do complexo II ($p > 0,05$; Figura 2B). A citocromo oxidase é considerada uma marcadora da atividade de toda a cadeia respiratória, e encontrou-se diminuída no cerebelo de ratos de 0 [$t(6)=3,019$, $p=0,0129$] e 21 dias [$t(6)=7,056$, $p < 0,0001$] submetidos à restrição proteica prenatal, mostrado pela Figura 2C.

No entanto, no córtex total a dieta hipoproteica materna causou um aumento na atividade enzimática da SDH (Figura 3A) [$t(7)=2,184$, $p=0,049$] e do complexo IV (Figura 3C) [$t(6)=4,346$, $p=0,0015$] em amostras de ratos de 21 dias de vida, embora não tenha tido diferença significativa entre os grupos nos animais neonatos ($p > 0,05$).

Em relação aos parâmetros de massa mitocondrial e potencial de membrana mitocondrial medidos em cerebelo e córtex cerebral, avaliados por citometria de fluxo utilizando as sondas MitoTracker® Green e MitoTracker® CMX-H-Red respectivamente, não foi encontrada diferença estatística entre os filhotes dos grupos com dieta materna normo ou hipoproteica nas duas idades avaliadas (Figuras 4AB e 5AB; $p > 0,05$).

A restrição proteica materna reduz a síntese de superóxido mitocondrial cerebelar na prole

A dieta hipoproteica induziu uma diminuição nos níveis de superóxido mitocondrial no cerebelo dos filhotes em ambos os períodos analisados (Figura 4C), demonstrada pelo aumento do número de eventos com alta fluorescência marcado com MitoSox® Red e avaliado por citometria de fluxo. Essa redução foi estatisticamente significativa quando comparada com o grupo controle em ratos logo após o nascimento [$t(7)=2,747$, $p=0,0177$] e após o desmame [$t(9-10)=2,504$, $p=0,0228$].

A dieta hipoproteica não modificou os níveis de superóxido mitocondrial no córtex total em ambos os períodos em comparação ao grupo de dieta materna normoproteica (PN0 e 21; $p > 0,05$).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O presente estudo teve como objetivo descrever efeitos da desnutrição proteica, imposta nos períodos gestacional e lactacional, sobre parâmetros mitocondriais em córtex total e cerebelo, a curto e médio prazo. Os resultados neste trabalho permitem concluir que a desnutrição proteica materna durante a gestação e lactação pode ocasionar adaptações e alterações metabólicas nos filhotes. Verificamos a redução da atividade da cadeia respiratória em cerebelo, acompanhada pela diminuição nos níveis de superóxido mitocondrial. O córtex cerebral apresentou um aumento na atividade da cadeia respiratória apenas em ratos de 21 dias de idade.

A dieta hipoproteica gestacional causou uma redução no ganho de massa corporal nas mães, e principalmente em seus filhotes. O baixo peso corporal em ratos submetidos à desnutrição proteica é um fenômeno conhecido e largamente relatado na literatura [11, 30, 31]. O insulto nutricional durante a gestação, neste caso uma dieta com 8% de proteína, demonstrou que a mãe encontrou meios de fornecimento adequado de proteínas ao feto, por meio do estímulo ao catabolismo endógeno, podendo interferir no seu próprio ganho de peso na tentativa de compensar a falta de proteínas provenientes da dieta [32].

O estado nutricional materno é decisivo no desenvolvimento fetal, alterando a expressão genômica, por meio de modificações epigenéticas, podendo ter consequências permanentes na vida adulta do filhote [9, 33]. Essas alterações provenientes de uma programação metabólica com fins adaptativos repercutem no risco de desenvolvimento de diversas enfermidades na vida adulta, tais como diabetes, doenças neuropsiquiátricas e cardiovasculares [9, 18, 33, 34]. Em nosso estudo, a dieta com baixo teor de proteína durante a gestação implicou em uma programação metabólica do feto, ocasionando alterações na atividade enzimática da cadeia respiratória no cerebelo. Os resultados foram encontrados tanto em filhotes de 0 dias de vida como em 21 dias. Ou seja, os efeitos encontrados logo após o nascimento, permaneceram após a lactação, isso nos pressupõe que a dieta hipoproteica afeta a prole já no período *in utero*, o qual estabelece uma resposta permanente no feto, assim como afirmam Armitage et al. [10], tornando-se mais evidentes após amamentação. Outros estudos, os quais avaliaram a atividade da citocromo-oxidase, SDH e NADH-desidrogenase em ratos submetidos a desnutrição proteica 30 dias após o período de lactação, também demonstraram uma diminuição significativa das atividades enzimáticas da cadeia respiratória quando comparado ao grupo com dieta normoproteica [35]. A inibição da atividade da cadeia respiratória pode reduzir o potencial de membrana, e conseqüentemente a síntese de ATP pela fosforilação oxidativa [36]. Os resultados obtidos nesse trabalho, utilizando a sonda marcadora do potencial de membrana, não demonstraram diferença de

potencial mitocondrial, entretanto a síntese de superóxido mitocondrial encontra-se reduzida, corroborando com os dados da literatura [24].

A principal fonte celular de superóxido é a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, onde até 5% do O_2 é incompletamente reduzido pelos complexos I e III, gerando o radical superóxido (O_2^{\bullet}) [23, 37]. Esse radical livre pode reagir com outras espécies reativas como o óxido nítrico (NO^{\bullet}) produzindo peroxinitrito, ou ser reduzido a peróxido de hidrogênio pela enzima superóxido-dismutase, a qual está presente na mitocôndria na isoforma ligada ao íon manganês. O peróxido de hidrogênio é uma espécie reativa que possui a capacidade de atravessar membranas biológicas, e apesar de ser pouco reativo, pode gerar o altamente reativo radical hidroxil ($^{\bullet}OH$) via reações de Fenton (Fe^{2+}) ou Haber-Weiss (Cu^+), que possui a capacidade de oxidar proteínas, DNA e lipídeos [23]. Um elaborado sistema enzimático atua sobre o peróxido de hidrogênio, a fim de evitar a síntese de hidroxil, cujas principais representantes são as enzimas catalase, glutathiona-peroxidase, tioredoxinas e peroxirredoxinas [23, 37]. Além do papel danoso exercido pelas espécies reativas, participando muitas vezes da indução de morte celular, elas também possuem um papel fisiológico protetor, mediando a sinalização celular de diversos estímulos, promovendo, por exemplo, o aumento da capacidade antioxidante celular [23, 24] e a comunicação da mitocôndria com o restante da célula [38, 39]. Dessa forma, a redução na síntese de superóxido mitocondrial ou o aumento da sua eliminação, podem resultar em disfunção celular [24, 38, 39]. A diminuição pode estar associada à modulação da atividade das enzimas antioxidantes mitocondriais, tais como a superóxido-dismutase, glutarredoxinas e peroxirredoxinas [23].

Em contrapartida, observamos um aumento da atividade enzimática da cadeia respiratória em córtex cerebral e apenas nos animais submetidos à restrição proteica no período pré-natal e lactacional. O aumento na atividade da cadeia respiratória não foi acompanhado por alterações nos níveis de superóxido mitocondrial. Ao nascer, os filhotes não apresentaram diferença significativa, o que nos faz acreditar que o efeito da dieta

hipoproteica *in utero* não foi suficiente para induzir qualquer alteração, somente revelada após a lactação, na forma de uma possível biogênese mitocondrial, que pode representar uma adaptação fisiológica do feto essencial para sua sobrevivência diante ao insulto ambiental. Este fenômeno está descrito na literatura como “plasticidade fenotípica”, conceituado como a capacidade de o indivíduo modificar o fenótipo de acordo com alterações ambientais [40]. Nesse contexto, a desnutrição perinatal é um dos fatores ambientais mais bem caracterizados como indutor de plasticidade fenotípica [40, 41].

Acreditamos que a diferença de resposta nas diferentes estruturas cerebrais pode estar relacionada à função intrínseca de cada região, refletindo em alterações funcionais. Nesse sentido, o cerebelo contribui para o controle da postura e do equilíbrio, coordenação dos movimentos voluntários e aprendizado motor [42, 43], enquanto o córtex cerebral centraliza funções diversas como memória, atenção, percepção, linguagem e controle motor [44]. Por fim, considerando que o desenvolvimento do SNC no período intrauterino é suscetível às modificações ambientais, tais como a dieta materna, e que essa programação metabólica pode influenciar o risco de doenças na vida adulta, acreditamos que nossos resultados possam contribuir para elucidar os mecanismos pelos quais a restrição proteica interfere no metabolismo mitocondrial.

Referências

- 1 Iyengar GV, Nair PP: Global outlook on nutrition and the environment: Meeting the challenges of the next millennium. *The Science of the total environment* 2000;249:331-346.
- 2 Saúde Md: Operational manual for health and educational professionals: Healthy food promotion in schools. .
- 3 Monte CMG: Desnutrição: Um desafio secular à nutrição infantil. *Jornal de Pediatria* 2000;76:285-297.
- 4 UNICEF: The state of the world's children 1998: A unicef report. Malnutrition: Causes, consequences, and solutions. *Nutrition reviews* 1998;56:115-123.
- 5 Motta MEFA, Silva GAP: Desnutrição e obesidade em crianças: Delineamento do perfil de uma comunidade de baixa renda. *Jornal de Pediatria* 2001;77:288-294.
- 6 Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, Caulfield LE, de Onis M, Ezzati M, Mathers C, Rivera J, Maternal, Child Undernutrition Study G: Maternal and child undernutrition: Global and regional exposures and health consequences. *Lancet* 2008;371:243-260.
- 7 Etukudo M, Agbedana O, Akang E, Osifo B: Biochemical changes and liver tissue pathology in weanling wistar albino rats with protein-energy malnutrition (pem). *African journal of medicine and medical sciences* 1999;28:43-47.
- 8 Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR: Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 2002;26:471-483.
- 9 Bale TL: Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nature reviews Neuroscience* 2015;16:332-344.
- 10 Armitage JA, Poston L, Taylor PD: Developmental origins of obesity and the metabolic syndrome: The role of maternal obesity. *Frontiers of hormone research* 2008;36:73-84.
- 11 Petry CJ, Ozanne SE, Hales CN: Programming of intermediary metabolism. *Molecular and cellular endocrinology* 2001;185:81-91.
- 12 Hales CN, Barker DJ: Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: The thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992;35:595-601.
- 13 Ozanne SE, Jensen CB, Tingey KJ, Storgaard H, Madsbad S, Vaag AA: Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin-signalling protein expression. *Diabetologia* 2005;48:547-552.
- 14 Orozco-Solis R, Lopes de Souza S, Barbosa Matos RJ, Grit I, Le Bloch J, Nguyen P, Manhaes de Castro R, Bolanos-Jimenez F: Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiology & behavior* 2009;96:481-492.
- 15 Reusens B, Theys N, Remacle C: Alteration of mitochondrial function in adult rat offspring of malnourished dams. *World journal of diabetes* 2011;2:149-157.
- 16 Lane RK, Hilsabeck T, Rea SL: The role of mitochondrial dysfunction in age-related diseases. *Biochimica et biophysica acta* 2015

- 17 Gleyzer N, Scarpulla RC: Pgc-1-related coactivator (prc), a sensor of metabolic stress, orchestrates a redox-sensitive program of inflammatory gene expression. *The Journal of biological chemistry* 2011;286:39715-39725.
- 18 Genaro PS, Sarkis KS, Martini LA: O efeito da restrição calórica na longevidade. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2009;53:667-672.
- 19 Simmons RA, Suponitsky-Kroyter I, Selak MA: Progressive accumulation of mitochondrial DNA mutations and decline in mitochondrial function lead to beta-cell failure. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:28785-28791.
- 20 Golden MH: The development of concepts of malnutrition. *The Journal of nutrition* 2002;132:2117S-2122S.
- 21 Bonatto F, Polydoro M, Andrades ME, Conte da Frota ML, Jr., Dal-Pizzol F, Rotta LN, Souza DO, Perry ML, Fonseca Moreira JC: Effects of maternal protein malnutrition on oxidative markers in the young rat cortex and cerebellum. *Neurosci Lett* 2006;406:281-284.
- 22 Feoli AM, Siqueira IR, Almeida L, Tramontina AC, Vanzella C, Sbaraini S, Schweigert ID, Netto CA, Perry ML, Goncalves CA: Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. *Nutrition* 2006;22:160-165.
- 23 Halliwell B, Gutteridge JMC: *Free radicals in biology and medicine*. New York, Oxford University, 2007.
- 24 Murphy MP: How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009;417:1-13.
- 25 Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, 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. *The Journal of nutrition* 1993;123:1939-1951.
- 26 Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ: Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 1985;153:23-36.
- 27 Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A: *Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies*. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 1994;228:35-51.
- 28 Marcelino TB, Longoni A, Kudo KY, Stone V, Reck A, de Assis A, Scherer EB, da Cunha MJ, Wyse AT, Pettenuzzo LF, Leipnitz G, Matte C: Evidences that maternal swimming exercise improves antioxidant defenses and induces mitochondrial biogenesis in brain of young wistar rats. *Neuroscience* 2013
- 29 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 1951;193:265-275.
- 30 Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG: Permanent reduction in heart and kidney organ growth in offspring of undernourished rat dams. *American journal of obstetrics and gynecology* 2005;193:1224-1232.
- 31 Chen JH, Martin-Gronert MS, Tarry-Adkins J, Ozanne SE: Maternal protein restriction affects postnatal growth and the expression of key proteins involved in lifespan regulation in mice. *PLoS One* 2009;4:e4950.
- 32 Frazer JF, Huggett AS: The partition of nutrients between mother and conceptuses in the pregnant rat. *Dental student* 1971;49:783-788.

- 33 Zohdi V, Lim K, Pearson JT, Black MJ: Developmental programming of cardiovascular disease following intrauterine growth restriction: Findings utilising a rat model of maternal protein restriction. *Nutrients* 2015;7:119-152.
- 34 Monk C, Spicer J, Champagne FA: Linking prenatal maternal adversity to developmental outcomes in infants: The role of epigenetic pathways. *Development and psychopathology* 2012;24:1361-1376.
- 35 Olowookere JO: Cytochrome oxidase status in protein-energy-deficient rats. *Ann Nutr Metab.* 1986;30(1):47-53
- 36 Nelson DL, Cox MM: *Princípios de bioquímica de Lehninger*, ed 6th. Porto Alegre, Artmed, 2014.
- 37 Kowaltowski A, de Souza-Pinto N, Castilho R, Vercesi A: Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2009;47:333-343.
- 38 Droge W: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews* 2002;82:47-95.
- 39 Hurd TR, Prime TA, Harbour ME, Lilley KS, Murphy MP: Detection of reactive oxygen species-sensitive thiol proteins by redox difference gel electrophoresis: Implications for mitochondrial redox signaling. *J Biol Chem* 2007;282:22040-22051.
- 40 Gluckman PD, Hanson MA, Pinal C: The developmental origins of adult disease. *Maternal & child nutrition* 2005;1:130-141.
- 41 Barker DJ: The developmental origins of adult disease. *European journal of epidemiology* 2003;18:733-736.
- 42 Shmuelof L, Krakauer JW: Are we ready for a natural history of motor learning? *Neuron* 2011;72:469-476.
- 43 Penhune VB, Steele CJ: Parallel contributions of cerebellar, striatal and m1 mechanisms to motor sequence learning. *Behav Brain Res* 2012;226:579-591.
- 44 Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM: *Principles of neural science*, ed 4th ed. New York ; London, McGraw-Hill, Health Professions Division, 2000.

Legendas

Figura 1. Gráfico comparativo do ganho de massa corporal durante a gestação dos grupos normoproteico e hipoproteico. Os resultados foram expressos como média + erro padrão para um n=6-7 (Teste T múltiplo). C: controle; RPM: restrição proteica materna

Figura 2. Efeito da dieta hipoproteica materna na atividade enzimática da SDH (A), do complexo II (B) e do complexo IV (C) em cerebelo de ratos de 0 e 21 dias. Os resultados foram expressos como média + erro padrão para um n=6-7. Diferença do controle, *p<0,05; ***p<0,001 (ANOVA de duas vias, seguido do teste de Tukey). C: controle; RPM: restrição proteica materna

Figura 3. Efeito da dieta hipoproteica materna na atividade enzimática da SDH (A), do complexo II (B) e do complexo IV (C) em córtex total de ratos de 0 e 21 dias. Os resultados foram expressos como média + erro padrão para um n=6-7. Diferença do controle, *p<0,05; **p<0,01 (ANOVA de duas vias, seguido do teste de Tukey). C: controle; RPM: restrição proteica materna

Figura 4. Efeito da dieta hipoproteica materna sobre a massa mitocondrial (A), o potencial de membrana mitocondrial (B) e os níveis de superóxido mitocondrial (C) em cerebelo de ratos de 0 e 21 dias. Os resultados foram expressos como média + erro padrão para um n=7-10. Diferença do controle, *p<0,05 (ANOVA de duas vias, seguido do teste de Tukey). C: controle; RPM: restrição proteica materna

Figura 5. Efeito da dieta hipoproteica materna sobre a massa mitocondrial (A), o potencial de membrana (B) e os níveis de superóxido (C) em córtex total de ratos de 0 e 21 dias. Os resultados foram expressos como média + erro padrão para um n=7-10 (ANOVA de duas vias). C: controle; RPM: restrição proteica materna

FIGURA 1

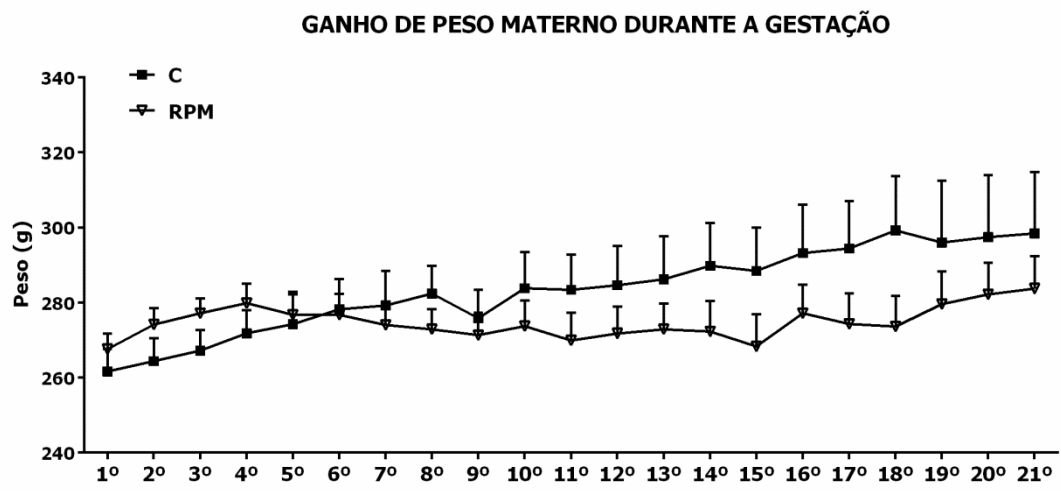


FIGURA 2

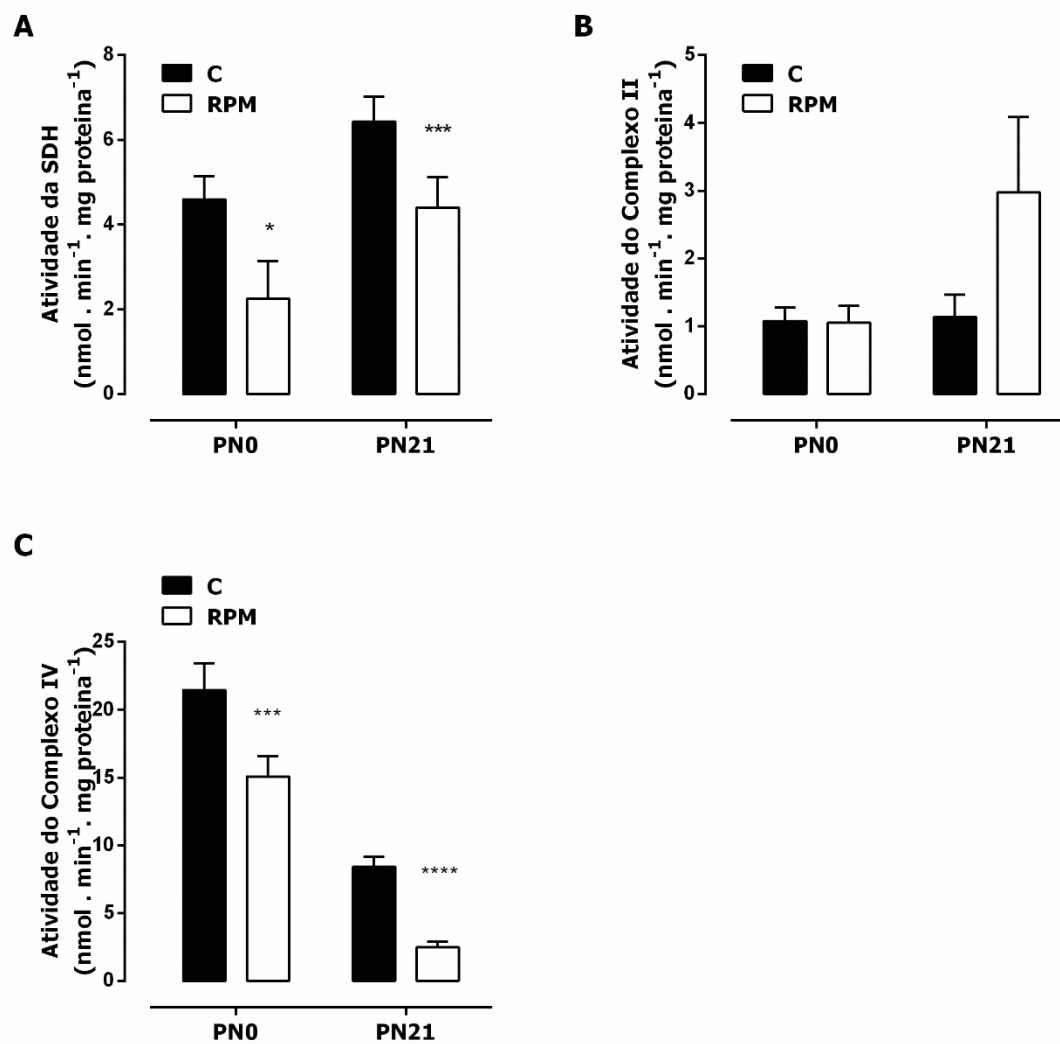


FIGURA 3

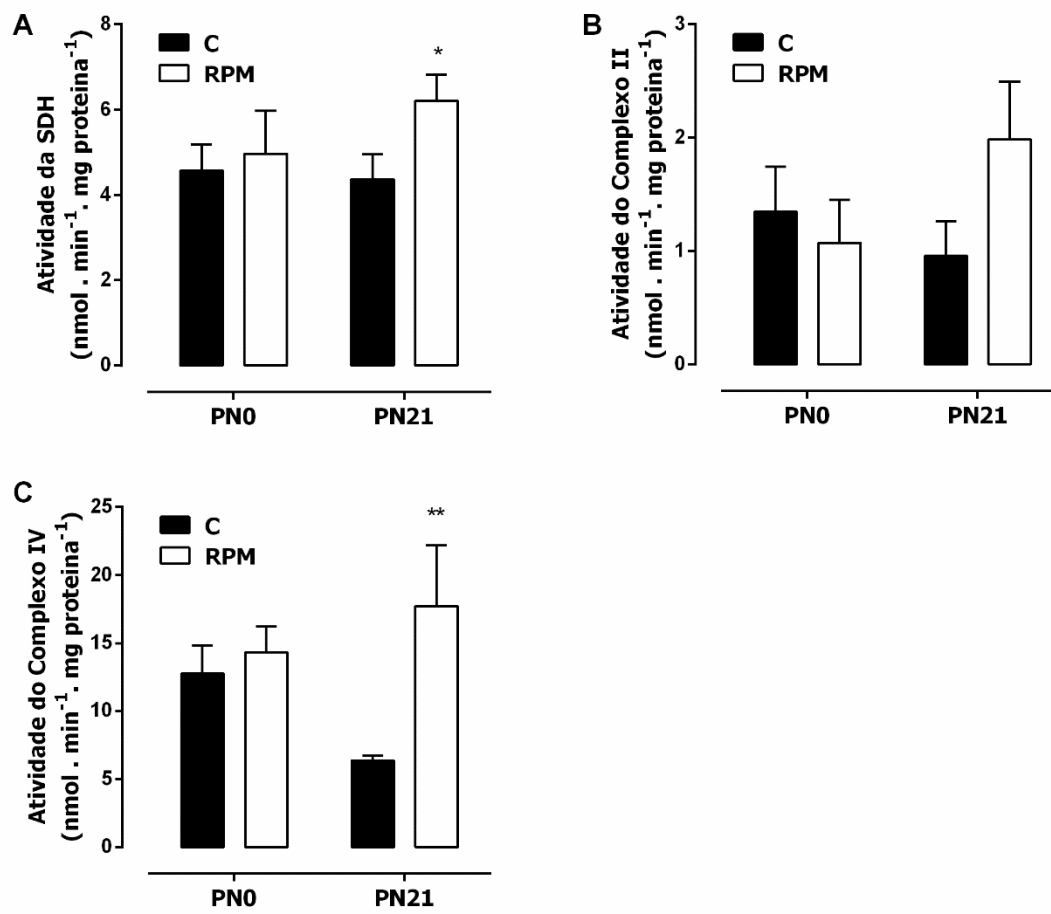


FIGURA 4

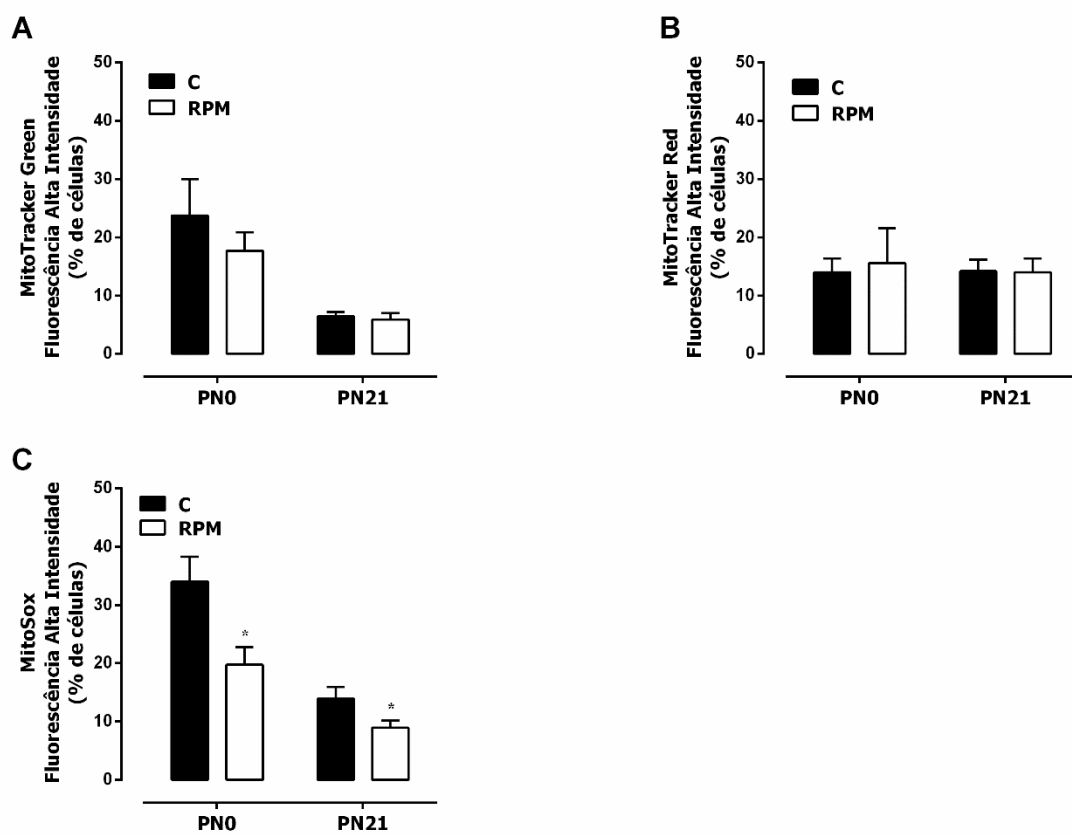
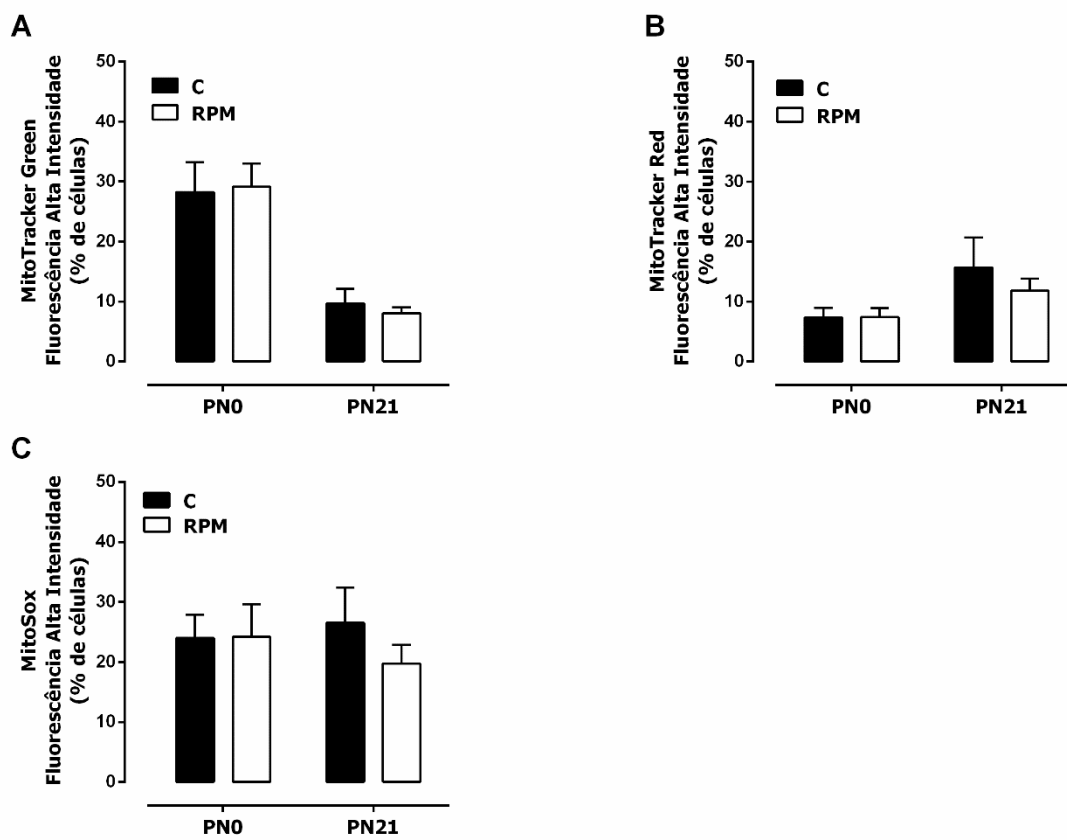


FIGURA 5



PERSPECTIVAS

Avaliar os mecanismos de controle da biogênese mitocondrial, tais como PGC-1 α , TFAM e NRF-1.

Avaliar, também, as atividades das demais enzimas do complexo da cadeia transportadora de elétrons.

ANEXO I - CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA

U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais

**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 25855

Título: Efeito da dieta hipoproteica materna durante a prenhez sobre parâmetros mitocondriais em encéfalo da prole

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

CRISTIANE MATTE - coordenador desde 01/01/2014
THIAGO BELTRAM MARCELINO - pesquisador desde 01/01/2014
KAREN YURIKA KUDO - pesquisador desde 01/01/2014
VINICIUS STONE SILVA - pesquisador desde 01/01/2014
Pauline Maciel August - pesquisador desde 01/01/2014

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 07/04/2014 - Sala I do Gabinete do Reitor - Prédio da Reitoria - Campus Centro - UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 72 ratos Wistar(8 machos adultos, 16 ratas prenhas e 48 filhotes), de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 23 de Abril de 2014

STELA MARIS KUZE RATES
Coordenador da comissão de ética

ANEXO II - NORMAS DA REVISTA ANNALS OF NUTRITION AND METABOLISM

Conditions

All manuscripts are subject to editorial review. Manuscripts are received with the explicit understanding that they are not under simultaneous consideration by any other publication. Submission of an article for publication implies the transfer of the copyright from the author to the publisher upon acceptance. Accepted papers become the permanent property of 'Annals of Nutrition and Metabolism' and may not be reproduced by any means, in whole or in part, without the written consent of the publisher. It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce illustrations, tables, etc. from other publications.

Types of Articles

The journal consists of the following sections:

Original Papers are full-length research papers which will be considered for the journal. These articles cover topics relevant to clinical studies. Basic and experimental work appears only if directly related to clinical issues (max. 3,000 words).

Review Articles/Systematic Reviews Reviews in which a specific field is reviewed through an exhaustive literature survey. An Abstract is required and should be divided into Background, Summary and Key Messages. Review Articles should consist of a maximum of 4,000 words.

Commentaries and Viewpoint of an editorial nature may be submitted to the journal. In these communications, usual manuscript subdivisions do not apply and a summary statement is not needed; however, a very brief reference list may be included (max. 500 words).

Meeting Reports are brief summaries of scientific meetings in the field of nutrition and metabolism. Authors should write to the Editor inquiring about potential interest before submitting the paper (max. 1,500 words).

Letters to the Editor are encouraged if they directly concern articles previously published in this journal or clinical subjects related to the matters discussed. The Editor reserves the right to submit copies of such letters to the authors of the articles concerned prior to publication in order to permit them to respond in the same issue of the journal (max. 500 words).

Editorials are usually invited by the Editor (max. 1,000 words). Please send suggestions to the Editor.

Conflicts of Interest

Authors are required to disclose any sponsorship or funding arrangements relating to their research and all authors should disclose any possible conflicts of interest. Conflict of interest statements will be published at the end of the article.

Ethics

Published research must comply with the guidelines for human studies and animal welfare regulations. Authors should state that subjects have given their informed consent and that the study protocol has been approved by the institute's committee on human research. Further, they should also state that animal experiments conform to institutional standards.

Plagiarism Policy

Whether intentional or not, plagiarism is a serious violation. We define plagiarism as a case in which a paper reproduces another work with at least 25% similarity and without citation. If evidence of plagiarism is found before/after acceptance or after publication of the paper, the author will be offered a chance for rebuttal. If the arguments are not found to be satisfactory, the manuscript will be retracted and the author sanctioned from publishing papers for a period to be determined by the responsible.

Arrangement

Title page: The first page of each paper should indicate the title, the authors' names, the institute where the work was conducted, and a short title for use as

running

head.

NB: Authors wishing to preserve the phonetic meaning of diacritics (PubMed reduces diacritics to their root characters) must spell their names accordingly when submitting manuscripts (e.g. Müller should be Mueller)

Full address: The exact postal address of the corresponding author complete with postal code must be given at the bottom of the title page. Please also supply phone and fax numbers, as well as e-mail address.

Key words: Please supply 3–10 key words in English that reflect the content of the paper.

Abstract of Reviews: Should be divided into the following subsections: Background, Summary and Key Messages. The Background should provide a brief clinical context for the review and is followed by the Summary, which should include a concise description of the main topics covered in the text. The Key Messages encapsulate the main conclusions of the review

Abstract: Each paper needs an abstract of up to 200 words. It should be structured as follows:

Background/Aims: What is the major problem that prompted the study?

Methods: How was the study performed?

Results: Most important findings?

Conclusions: Most important conclusion?

Footnotes: Avoid footnotes.

Tables and illustrations: Tables are part of the text. Place them at the end of the text file. Illustration data must be stored as separate files. Do not integrate figures into the text. Electronically submitted b/w half-tone and color illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800–1,200 dpi.

Color Illustrations

Online edition: Color illustrations are reproduced free of charge. In the print version, the illustrations are reproduced in black and white. Please avoid referring to the colors in the text and figure legends.

Print edition: Up to 6 color illustrations per page can be integrated within the text at CHF 960.00 per page.

References

In the text identify references by Arabic numerals [in square brackets]. Material submitted for publication but not yet accepted should be noted as 'unpublished data' and not be included in the reference list. The list of references should include only those publications which are cited in the text. Do not alphabetize; number references in the order in which they are first mentioned in the text. The surnames of the authors followed by initials should be given. There should be no punctuation other than a comma to separate the authors. Preferably, cite all authors. Abbreviate journal names according to the Index Medicus system. Also see International Committee of Medical Journal Editors: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals (www.icmje.org).

Examples

(a) *Papers published in periodicals:*
Chatel J-M, Bernard H, Orson FM: Isolation and characterization of two complete Ara h 2 isoforms cDNA. Int Arch Allergy Immunol 2003;131: 14–18.

(b) *Papers published only with DOI numbers:*
Theoharides TC, Boucher W, Spear K: Serum interleukin-6 reflects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. Int Arch Allergy Immunol DOI: 10.1159/000063858.

(c) *Monographs:*

Matthews DE, Farewell VT: Using and Understanding Medical Statistics, ed 3, revised. Basel, Karger, 1996.

(d) Edited books:
DuBois RN: Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer; in Dannenberg AJ, Dubois RN (eds): COX-2. Prog Exp Tum Res. Basel, Karger, 2003, vol 37, pp 124–137.

Reference Management Software: Use of EndNote is recommended for easy management and formatting of citations and reference lists.

Digital Object Identifier (DOI)S. Karger Publishers supports DOIs as unique identifiers for articles. A DOI number will be printed on the title page of each article. DOIs can be useful in the future for identifying and citing articles published online without volume or issue information. More information can be found at www.doi.org

Supplementary Material

Supplementary material is restricted to additional data that are not necessary for the scientific integrity and conclusions of the paper. Please note that all supplementary files will undergo editorial review and should be submitted together with the original manuscript. The Editors reserve the right to limit the scope and length of the supplementary material. Supplementary material must meet production quality standards for Web publication without the need for any modification or editing. In general, supplementary files should not exceed 10 MB in size. All figures and tables should have titles and legends and all files should be supplied separately and named clearly. Acceptable files and formats are: Word or PDF files, Excel spreadsheets (only if the data cannot be converted properly to a PDF file), and video files (.mov, .avi, .mpeg).

Author's Choice™

Karger's Author's Choice™ service broadens the reach of your article and gives all users worldwide free and full access for reading, downloading and printing at www.Karger.com. The option is available for a one-time fee of CHF 3,000.00, which is a permissible cost in grant allocation. More information can be found at www.karger.com/authors_choice.

NIH-Funded Research

The U.S. National Institutes of Health (NIH) mandates under the NIH Public Access Policy that final, peer-reviewed manuscripts appear in its digital database within 12 months of the official publication date. As a service to authors, Karger submits your manuscript on your behalf to PubMed Central (PMC) immediately upon publication. It usually receives a PMCID within approximately a month and will appear in PMC after 12 months. For those selecting our premium [Author's Choice](#)™ service, the usual embargo will be overridden, accelerating the accessibility of your work. More details on NIH's Public Access Policy are available [here](#).

Self-Archiving

Karger permits authors to archive their pre-prints (i.e. pre-refereeing) or post-prints (i.e. final draft post-refereeing) on their personal or institution's servers, provided the following conditions are met: Articles may not be used for commercial purposes, must be linked to the publisher's version, and must acknowledge the publisher's copyright. Authors selecting Karger's [Author's Choice](#)™ feature, however, are also permitted to archive the final, published version of their article, which includes copyediting and design improvements as well as citation links.

Page Charges

There are no page charges for papers of 3 or fewer printed pages (including tables, illustrations and references). Each additional complete or partial page is charged to the author at CHF 325.00. The allotted size of a paper is equal to approx. 10 manuscript pages (including tables, illustrations and references).

Proofs

Unless indicated otherwise, proofs are sent to the first-named author and should be returned with the least possible delay. Alterations made in proofs, other than the correction of printer's errors, are charged to the author.

Reprints

Order forms and a price list are sent with the proofs. Orders submitted after the issue is printed are subject to considerably higher prices.