

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS E NA HOMEOSTASE REDOX DO TECIDO
ADIPOSO DA PROLE DE RATAS WISTAR SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO
CALÓRICA DURANTE A GESTAÇÃO**

MARIANA SCORTEGAGNA CRESTANI

PORTO ALEGRE

2019

MARIANA SCORTEGAGNA CRESTANI

**ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS E NA HOMEOSTASE REDOX DO TECIDO
ADIPOSO DA PROLE DE RATAS WISTAR SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO
CALÓRICA DURANTE A GESTAÇÃO**

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, Faculdade de Medicina, Curso de Graduação em Nutrição.

Orientadora: Prof^a Dra. Martine Elisabeth Kienzle Hagen

Co-orientadora: Prof^a Dra. Cristiane Matté

PORTO ALEGRE

2019

**ALTERAÇÕES MITOCONDRIAS E NA HOMEOSTASE REDOX DO TECIDO
ADIPOSO DA PROLE DE RATAS WISTAR SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO
CALÓRICA DURANTE A GESTAÇÃO**

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, Faculdade de Medicina, Curso de Graduação em Nutrição.

Orientadora: Prof^a Dra. Martine Elisabeth Kienzle Hagen

Co-orientadora: Prof^a Dra. Cristiane Matté

Porto Alegre, 10 de dezembro de 2019

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova o Trabalho de Conclusão de Curso “**ALTERAÇÕES MITOCONDRIAS E NA HOMEOSTASE REDOX DO TECIDO ADIPOSO DA PROLE DE RATAS WISTAR SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO CALÓRICA DURANTE A GESTAÇÃO**”, elaborado por Mariana Scortegagna Crestani, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Nutrição.

Comissão Examinadora:

Prof^a Dr^a Juliana Rombaldi Bernardi (UFRGS)

Prof^a Dr^a Natividade de Sá Couto Pereira (UFRGS)

CIP - Catalogação na Publicação

Crestani, Mariana Scortegagna
ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS E NA HOMEOSTASE REDOX DO
TECIDO ADIPOSE DA PROLE DE RATAS WISTAR SUBMETIDAS À
RESTRIÇÃO CALÓRICA DURANTE A GESTAÇÃO / Mariana
Scortegagna Crestani. -- 2019.

37 f.

Orientadora: Martine Elisabeth Kienzle Hagen.

Coorientadora: 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,
2019.

1. Restrição Calórica. 2. Gestação. 3. Estresse
oxidativo. 4. Biogênese mitocondrial. 5. Programação
metabólica. I. Hagen, Martine Elisabeth Kienzle,
orient. II. Matté, Cristiane, coorient. III. Título.

RESUMO

A gestação é um período crítico do desenvolvimento, onde o ambiente materno é um importante fator modulador da saúde da prole, podendo resultar em efeitos positivos ou negativos ao longo de seu desenvolvimento pós-natal. Nesse contexto, a nutrição materna durante a gestação pode programar o organismo do feto, sendo que tanto a desnutrição quanto a supernutrição fetal estão associadas ao desenvolvimento de doenças crônicas na idade adulta. A restrição calórica moderada na idade adulta tem seus efeitos positivos bem estabelecidos, especialmente no que diz respeito à proteção contra doenças metabólicas e aumento da expectativa de vida. Entretanto pouco se sabe sobre os efeitos da restrição calórica gestacional, e seus potenciais efeitos protetores contra fatores de risco associados às doenças crônicas. Dessa forma, nosso estudo avaliou os efeitos da restrição calórica gestacional sobre o *status* redox e parâmetros mitocondriais no tecido adiposo da prole em idade adulta. Para tal, ratas Wistar adultas prenhes foram submetidas a um protocolo de restrição calórica moderada (20%) associada à suplementação de micronutrientes de forma a igualar o aporte do grupo controle. O tratamento manteve-se durante todo o período gestacional, e quando os filhotes completaram 60 dias, foram eutanasiados e amostras de tecido adiposo interescapular e retroperitoneal foram retiradas para pesagem e análises bioquímicas. Foram avaliados o conteúdo geral de espécies reativas, os níveis de superóxido mitocondrial e óxido nítrico, além da massa e potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo. A restrição calórica gestacional não alterou o peso dos filhotes, mas a porcentagem de tecido adiposo retroperitoneal nos filhotes machos mostrou-se diminuída nesse grupo. No tecido adiposo interescapular dos machos, observou-se diminuição no conteúdo de superóxido mitocondrial e aumento da massa mitocondrial, indicando maior eficiência energética e menor estresse oxidativo nesse tecido. Entretanto para as fêmeas, o tecido adiposo interescapular apresentou aumentado conteúdo de espécies reativas. Os resultados sugerem que a alimentação materna é capaz de influenciar positivamente a programação metabólica do tecido adiposo da prole. Além disso, a restrição calórica gestacional demonstrou efeito tecido e sexo dependentes sobre o desenvolvimento da prole.

ABSTRACT

Gestation is a critical period for the fetus development. In this context, maternal environment is an important modulator factor, associated with healthy or deleterious outcomes through postnatal development. In fact, maternal nutrition during pregnancy can program offspring's organism, and both fetal malnutrition and overnutrition are associated with the development of chronic diseases in adulthood. Moderate caloric restriction in adulthood has its positive effects well-defined, especially with regard to protection against metabolic diseases and lifespan extension. However, little is known about the effects of gestational caloric restriction and its protective effects on progeny against increased risk factors for chronic diseases. Therefore, our study evaluated the effects of gestational caloric restriction on redox status and mitochondrial parameters in offspring's adipose tissue at adulthood. To afford the goal, pregnant Wistar rats underwent a moderate caloric restriction protocol associated with micronutrient supplementation to match the control group. The treatment continued throughout the gestational period, and when the pups were 60 days-old, they were sacrificed and interscapular and retroperitoneal adipose tissue removed for biochemical analyzes. The general content of reactive species, mitochondrial superoxide and nitric oxide levels, as well as mitochondrial mass and membrane potential were assessed by flow cytometry. Gestational caloric restriction did not change the weight of the pups, however, the percentage of retroperitoneal adipose tissue in male pups was decreased in this group. In male interscapular adipose tissue, mitochondrial superoxide content decreased and mitochondrial mass increased, which may indicate higher energetic efficiency and lower oxidative stress in this tissue. Conversely, for female pups, interscapular adipose tissue showed an increase in the overall content of reactive species. The results suggest that maternal diet is able to positively influence the metabolic programming of adipose tissue. In addition, gestational caloric restriction presented tissue and sex-dependent effects in the pups' development.

LISTA DE ABREVIATURAS

DCNTs - Doenças Crônicas Não Transmissíveis

DM - Diabetes mellitus

DOHaD - Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (do inglês *Developmental Origins of Health and Disease*)

NO[•] - Óxido nítrico

O₂^{•-} - Radical ânion superóxido

OMS - Organização Mundial da Saúde

PND - Dia pós-natal (do inglês *postnatal day*)

RC - Restrição calórica

STEM - Sistema Transportador de Elétrons Mitocondrial

UCP1 - Proteína desacopladora 1 (do inglês *Uncoupling Protein 1*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 RESTRIÇÃO CALÓRICA	3
2.2 TECIDO ADIPOSEO	3
2.3 EFEITO DA RESTRIÇÃO CALÓRICA NO TECIDO ADIPOSEO	5
3. JUSTIFICATIVA.....	5
4. OBJETIVO	5
4.1 OBJETIVO GERAL	5
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
5.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	6
5.2 ANIMAIS.....	6
5.3 REAGENTES	7
5.4 MODELO EXPERIMENTAL	7
5.5 ENSAIOS BIOQUÍMICOS	9
5.5.1 AMOSTRAS DE TECIDO ADIPOSEO.....	9
5.5.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	9
5.5.3. CITOMETRIA DE FLUXO	9
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	10
6. RESULTADOS.....	10
6.1 PESO E PERCENTUAL DE GORDURA CORPORAL DOS FILHOTES	10
6.2 EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA MATERNA SOBRE O CONTEÚDO DE ESPÉCIES REATIVAS E PARÂMETROS MITOCONDRIAIS NO TECIDO ADIPOSEO DOS FILHOTES MACHOS.....	12
6.2.1 TECIDO ADIPOSEO INTERESCAPULAR	12
6.2.2 TECIDO ADIPOSEO RETROPERITONEAL	13

6.3 EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA MATERNA SOBRE O CONTEÚDO DE ESPÉCIES REATIVAS E PARÂMETROS MITOCONDRIAIS NO TECIDO ADIPOSEO DOS FILHOTES FÊMEAS.....	15
6.3.1 TECIDO ADIPOSEO INTERESCAPULAR	15
6.3.2 TECIDO ADIPOSEO RETROPERITONEAL	17
7. DISCUSSÃO.....	18
7.1 EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA GESTACIONAL SOBRE O PESO DOS ANIMAIS E HOMEOSTASE REDOX CEREBRAL.....	18
7.2 RESPOSTA SEXO-DEPENDENTE E A EXPANSÃO DO TECIDO ADIPOSEO.....	19
7.3 ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS	20
7.4 MODELO CONTROLE	21
8. CONCLUSÃO	22
9. REFERÊNCIAS	23
10. ANEXO I – carta de aprovação do projeto pela CEUA	28

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), globalmente em 2017, 51 milhões de crianças menores de cinco anos (7,5%) apresentavam baixo peso para estatura, enquanto que 38 milhões (5,6%) estavam acima do peso. Infelizmente, ambos os perfis estão associados ao desenvolvimento de Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNTs) na idade adulta, e a coexistência destes perfis é frequente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, representando um importante desafio para a saúde pública em escala global (WHO, 2018b). As DCNTs são a principal causa de morte no mundo, sendo responsáveis por 71% do total de óbitos em 2016 (WHO, 2018a). No Brasil, em 2015, 73% das mortes ocorridas foram causadas por DCNTs (WHO, 2017).

Pesquisas investigando a programação precoce das doenças metabólicas na idade adulta têm elucidado diversos mecanismos pelos quais o ambiente no período inicial da vida impacta a saúde em longo prazo. Dentre esses fatores ambientais, a disponibilidade de nutrientes ao qual o feto está exposto tem consequências amplas na saúde na idade adulta. A associação entre baixo peso ao nascer e risco aumentado para desordens metabólicas está bem documentado na literatura (BARKER, 2007; GLUCKMAN; HANSON, 2004). Doenças cardiovasculares, diabetes mellitus (DM), adiposidade central, dislipidemia e hipertensão estão associadas de forma consistente ao peso ao nascer (FERNANDEZ-TWINN; OZANNE, 2010).

As DCNTs compartilham diversos fatores de risco modificáveis como: tabagismo, dieta inadequada e prática insuficiente de atividade física. Esses fatores comumente levam ao desenvolvimento de sobrepeso, obesidade, aumento da pressão arterial, colesterol elevado e finalmente à DCNT em si. Em 2016, mais de 1,9 bilhão de pessoas com 18 anos ou mais estavam acima do peso, sendo 650 milhões dessas consideradas obesas. A obesidade não é apenas um problema para adultos, no mesmo ano, 340 milhões de crianças e adolescentes de 5 a 19 anos e cerca de 40 milhões de crianças com menos de 5 anos foram consideradas com sobrepeso ou obesidade (COLLABORATION, 2017).

Oportunidades para prevenção e controle do desenvolvimento de obesidade e DCNTs ocorrem em vários estágios da vida, mas intervenções realizadas nos estágios iniciais oferecem as melhores chances de prevenção primária. Dessa forma, a OMS recomenda que políticas e planos de prevenção e controle das doenças iniciem logo no início da vida, com cuidados em saúde que iniciam na pré-concepção, atravessam o período gestacional e os primeiros anos de vida. A saúde materna e infantil está intrinsecamente ligada ao desenvolvimento de DCNTs e seus fatores de risco, especificamente porque a desnutrição pré-natal e o baixo peso ao nascer aumentam a predisposição à obesidade, pressão elevada, doenças cardiovasculares e DM na vida adulta, enquanto condições adversas durante a gestação, como obesidade materna e DM gestacional, estão associadas a riscos semelhantes na mãe e seus filhos (WHO, 2013).

Observações epidemiológicas e clínicas levaram à hipótese de que o risco de desenvolver algumas doenças crônicas na idade adulta é influenciado não apenas por fatores genéticos e de estilo de vida adulto, mas também por fatores ambientais que atuam no início do desenvolvimento. Esses fatores atuam através de modificações epigenéticas e dos processos de plasticidade do desenvolvimento (GLUCKMAN; HANSON; PINAL, 2005).

Nos últimos anos, estudos no campo das origens desenvolvimentistas da saúde e da doença, mais conhecido pela sua nomenclatura em inglês: *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD), ganharam destaque nos campos das ciências biológicas e da saúde. Isso está associado à ênfase em cuidar da saúde dos indivíduos desde a sua concepção, a fim de reduzir o risco de doenças ao longo do desenvolvimento e envelhecimento (WADHWA et al., 2009). Nesse sentido, os primeiros mil dias de vida, período desde a concepção até completar dois anos de idade, são a principal janela de vulnerabilidade ou oportunidade para modular o risco do desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis na idade adulta (LINNER; ALMGREN, 2019).

O período gestacional é crucial para o desenvolvimento e crescimento do feto. Durante esse período ocorre a programação do metabolismo fetal, associada ao estabelecimento de modificações epigenéticas, que irão influenciar o estado de saúde e a susceptibilidade às doenças na vida adulta (BALE et al., 2010). Dessa forma, os hábitos maternos durante a gestação contribuem diretamente para

adaptações no organismo da prole. Portanto, intervenções como dietas ou exercício físico no período de gestação podem representar modificações favoráveis para um crescimento saudável e promover adaptações metabólicas capazes de proteger contra o desenvolvimento de doenças na idade adulta. Nesse sentido, nosso grupo de estudo já demonstrou, em modelo animal, os efeitos de diversas intervenções gestacionais na saúde da prole, tais como: restrição calórica (RC) (STONE; CRESTANI; et al., 2019), restrição alimentar (STONE et al., 2016), dieta hipersalina (STOCHER et al., 2018), suplementação com polifenóis (AUGUST et al., 2018) e exercício de natação (KLEIN et al., 2018; KLEIN et al., 2019; MARCELINO et al., 2016; MARCELINO et al., 2015; MARCELINO et al., 2013).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 RESTRIÇÃO CALÓRICA

A RC é um modelo definido pela diminuição da ingestão diária de calorias, sem promover desnutrição, devendo ser utilizada a suplementação de micronutrientes para tal fim (CERQUEIRA; KOWALTOWSKI, 2010). Foi demonstrado que esse modelo de intervenção promove várias adaptações metabólicas no organismo referentes à mobilização de energia estocada no tecido adiposo. Em roedores, a RC moderada promoveu ativação do metabolismo energético mitocondrial no tecido adiposo branco e aumento da biossíntese de ácidos graxos no tecido adiposo marrom (OKITA et al., 2012). À medida que o organismo se torna mais dependente do metabolismo dos ácidos graxos, ocorrem mudanças no equilíbrio da lipólise e da lipogênese no tecido adiposo (LI et al., 2003; VALLE et al., 2010). Essas adaptações promovidas pela RC também acontecem quando a intervenção ocorre no período gestacional, indicando que o tecido adiposo está sujeito à programação metabólica no seu desenvolvimento (GARCIA et al., 2011; MACKAY et al., 2013).

2.2 TECIDO ADIPOSEO

As crescentes taxas de obesidade, DM e outras doenças metabólicas levaram a um aumento do interesse na fisiologia dos adipócitos. Essas células

desempenham um papel central no armazenamento de energia, controle da temperatura corporal, dos níveis de glicose sanguínea e da sensibilidade insulínica (BERRY et al., 2013).

Apesar da importante função do tecido adiposo na manutenção do equilíbrio energético, quando ocorre supernutrição crônica a capacidade de tamponamento do tecido pode ser excedida, resultando no transbordamento de lipídios do tecido adiposo e seu acúmulo patológico em outros importantes órgãos, tais como o fígado. Como os ácidos graxos e seus produtos metabólicos podem ser tóxicos, existem mecanismos homeostáticos para equilibrar finamente o armazenamento e a mobilização de lipídios, evitando seu acúmulo, potencialmente tóxico, nos órgãos periféricos (UNGER, 2002). A capacidade do tecido adiposo de compensar as variações no suprimento e demanda de energia é obtida pela integração de respostas endócrinas e metabólicas, bem como por mudanças dinâmicas na composição celular (CINTI, 2001).

O tecido adiposo branco aumenta sua capacidade de armazenamento de triglicerídeos através da hipertrofia das células adiposas ou hiperplasia do tecido por diferenciação de células progenitoras em adipócitos. Dessa forma, o risco para doenças metabólicas relacionadas à toxicidade lipídica depende mais da incapacidade desse tecido de armazenar os lipídeos circulantes que do volume de tecido adiposo (UNGER; SCHERER, 2010).

Em contraste, o tecido adiposo marrom é altamente oxidativo, contém células de gordura multiloculares com mitocôndrias em abundância que oxidam os ácidos graxos e geram calor através da proteína desacopladora 1 (UCP1). A ativação farmacológica do tecido adiposo marrom tem sido estudada como alternativa no combate à obesidade e melhora da resistência insulínica (RAVUSSIN; GALGANI, 2011).

Em humanos, o tecido adiposo marrom está localizado principalmente nas regiões supraclavicular e paravertebral, enquanto que em ratos o depósito interescapular é o mais abundante. O tecido adiposo branco é dividido em visceral e subcutâneo, sendo que o primeiro é composto pelos depósitos que envolvem os órgãos intra-abdominais (perirrenal, retroperitoneal, mesentérico), e o segundo representa os depósitos espalhados por todo o corpo sob a pele (GESTA; TSENG;

KAHN, 2007). Além disso, o excesso de tecido adiposo visceral está associado às complicações metabólicas como resistência à insulina e DM (CHOE et al., 2016).

2.3 EFEITO DA RESTRIÇÃO CALÓRICA NO TECIDO ADIPOSEO

Sugere-se que parte dos benefícios da RC são mediados pelo remodelamento do tecido adiposo. A RC ativa o metabolismo energético mitocondrial e a biossíntese de ácidos graxos no tecido adiposo branco, que funciona como um transdutor energético de glicose para lipídeos densamente energéticos. Em contraste, a RC no tecido adiposo marrom diminui a atividade do Sistema Transportador de Elétrons Mitocondrial (STEM) e aumenta a biossíntese de ácidos graxos, alterando sua função de sistema consumidor de energia para um sistema de reservatório de energia.

Em resposta à RC, o tecido adiposo branco e marrom cooperam para usar a energia efetivamente através de uma resposta diferencial da função mitocondrial (OKITA et al., 2012).

3. JUSTIFICATIVA

A literatura apresenta vasta evidência dos benefícios da RC quando realizada na vida adulta. Entretanto, no que diz respeito à RC no período gestacional e seus efeitos na prole, os estudos tendem a apresentar efeitos negativos, sobretudo por avaliarem protocolos de restrição alimentar que resultam na ocorrência de desnutrição. Considerando as crescentes taxas de sobrepeso, obesidade e doenças metabólicas mundiais, buscamos avaliar se um protocolo de RC gestacional, que não resulte em desnutrição, traria benefícios à saúde da prole em longo prazo.

4. OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da RC gestacional moderada sobre parâmetros de homeostase redox e biogênese mitocondrial no tecido adiposo da prole em idade adulta.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Mensurar a produção de espécies reativas, superóxido mitocondrial e óxido nítrico, massa e potencial de membrana mitocondrial através de citometria de fluxo no tecido adiposo interescapular e retroperitoneal da prole, aos 60 dias pós-natal, de ratas submetidas à RC moderada durante o período gestacional.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os experimentos com os animais foram conduzidos seguindo os cuidados preconizados pelas diretrizes governamentais oficiais conforme a lei nº 11.794/2008 e as diretrizes do CONCEA (Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos - DBCA) e eutanásia (Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA), indicadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS). Também foram seguidas normativas internacionais como o *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (publicação do NIH Nº 80-23, revisado em 1996) e as normas do *Canadian Council on Animal Care* (CCAC). O projeto foi submetido à avaliação da Comissão de Pesquisa do Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS (COMPESQ/ICBS/UFRGS) e da CEUA/UFRGS, sendo aprovado sob o número 30044.

5.2 ANIMAIS

Para a execução desse projeto de pesquisa foram utilizados 32 filhotes Wistar (16 machos e 16 fêmeas) provenientes do acasalamento de machos (35 animais) adultos de 60-90 dias de vida e fêmeas (70 animais) nulíparas de 60 dias de vida. Para cálculo do número amostral foi considerada uma taxa de prenhez de 35% (aprovada em projetos anteriores pela CEUA-UFRGS) e levada em consideração a necessidade do dobro de mães controle para realocação da prole RC, em PND0, com mães controle, a fim de evitar o efeito da RC durante o período de amamentação. De forma a evitar o "efeito ninhada" da comparação entre animais de

mesma ninhada, em cada técnica foram utilizados um macho e uma fêmea de cada ninhada.

Os animais adultos, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação Animal do Departamento de Bioquímica da UFRGS – Porto Alegre/Brasil, foram mantidos em ciclo de 12h/12h, claro/escuro, à temperatura constante de 22 ± 1 °C, com acesso à água *ad libitum* e à ração comercial de acordo com o modelo animal. Para o acasalamento, os animais foram agrupados na proporção 2 fêmeas para 1 macho durante 48h. A verificação de prenhez foi realizada pela observação de espermatozoides no lavado vaginal, e ausência de leucócitos. Os animais permaneceram 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) até o desmame (PND21), após, filhotes machos e fêmeas foram alocados em caixas separadas em número de 4-5 animais por caixa. No dia pós-natal 60 foram eutanasiados e amostras de tecido adiposo dissecadas para análises bioquímicas.

5.3 REAGENTES

Os reagentes utilizados foram adquiridos da SIGMA® Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA), Invitrogen® (Molecular Probes, Eugene, OR - USA) e Cellsignaling® (Danvers, MA, USA).

5.4 MODELO EXPERIMENTAL

As ratas prenhes foram divididas em dois grupos: (1) controle, com oferta de ração comercial (22% de proteínas) e água *ad libitum* durante todo o período gestacional e (2) RC, sendo submetidas à RC moderada, com oferta de ração comercial reduzida em 20% em relação ao consumo do grupo controle e água *ad libitum*. Os animais do grupo RC foram suplementados com fórmula contendo micronutrientes na mesma proporção que a ração comercial, de forma a igualar o consumo do grupo controle (5 mL de fórmula contém a mesma quantidade de micronutrientes contida em 10 g de ração), por meio de gavagem com agulha própria para o fim. As ratas provenientes do grupo controle receberam veículo

(sucralose 1%) também via gavagem, a fim de submeter os animais ao mesmo estresse.

As ratas foram pesadas diariamente para controle de ganho de peso. A ração do grupo controle também foi pesada diariamente, a fim de quantificar a ingestão dos animais desse grupo e utilizar como parâmetro para restrição de 20% do grupo RC, com adequação ao peso de cada animal.

Após a verificação de prenhez as fêmeas foram alojadas em grupos de 3 animais por caixa e próximo ao fim do período gestacional foram acomodados individualmente para o parto. A prole proveniente de mães RC foi acomodada com mães controle, a fim de evitar o efeito da RC no período de lactação. Os filhotes das mães controle também foram alojados com mães controle diferentes, proporcionando estresse igual entre os grupos. As ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes, e os filhotes excedentes eutanasiados por decapitação com tesoura afiada.

Os filhotes foram deixados com a mãe até o fim do período de amamentação (PND21). Após, a prole proveniente de ambos os grupos, foi acomodada em grupos de 4 animais por caixa, separados em machos e fêmeas, de acordo com o grupo controle ou RC, até o momento da eutanásia. Durante o período pós-natal, todos os animais foram alimentados *ad libitum*, a fim de verificar, neste estudo, apenas o possível efeito da RC gestacional.

Em PND 60, todos os animais foram eutanasiados por decapitação, em guilhotina apropriada para roedores. Todas as eutanásias foram realizadas em sala destinada a tal fim, limpa e com presença de exaustor, reduzindo o odor de sangue e, conseqüentemente, o estresse dos animais. Os animais foram alocados em suas caixas em sala anexa, acondicionados de forma a não sentir o odor de sangue, até o momento em que foram levados à sala de eutanásia para realização do procedimento. O procedimento foi realizado por pesquisadores treinados e utilizando todos os equipamentos de segurança individuais.

5.5 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

5.5.1 AMOSTRAS DE TECIDO ADIPOSEO

As amostras de tecido adiposo provenientes dos depósitos interescapular e retroperitoneal foram retiradas e dissecadas em placa de Petri sobre gelo, em seguida foram pesados e preparadas para utilização nos ensaios bioquímicos.

5.5.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de tecido adiposo foram dissociadas em tampão PBS pH 7,4 contendo 1 mg% de colagenase IV e centrifugadas a 1500 RPM durante 5 minutos a temperatura de 4 °C para a remoção da colagenase. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet contendo as células foi ressuspenso em PBS. A solução contendo as células foi filtrada (filtro com poro de 40 µm; SPL Lifesciences Co., Naechon-Myeon Pocheon, South Korea), e distribuída em tubos para a incubação com as sondas moleculares para posterior análise em citômetro de fluxo (BD FACSCalibur®).

5.5.3. CITOMETRIA DE FLUXO

Os níveis de espécies reativas foram determinados através da incubação com 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA; Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO - USA) durante 20 minutos à 37 °C, na ausência de luz. Os níveis de óxido nítrico foram determinados através da incubação com diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-diclorofluoresceína (DAF-DA; Invitrogen®, Molecular Probes, Eugene, OR - USA), durante 60 minutos à 37 °C, na ausência de luz. Os níveis de superóxido mitocondrial ($O_2^{\cdot-}$), massa e potencial de membrana mitocondrial foram determinados através da incubação com MitoSOX™ Red® durante 20 minutos, MitoTracker® Green FM durante 45 minutos e MitoTracker® Red CM-H2XRos durante 45 minutos (Invitrogen®, Molecular Probes, Eugene, OR - USA), respectivamente e nas mesmas condições acima descritas. Os eventos/células foram adquiridos em citômetro de fluxo, previamente calibrado utilizando uma amostra de controle negativo, onde 30.000 eventos/células foram analisados. Os

dados foram analisados através do software FlowJo (Ashland, OR). Os resultados estão expressos como fluorescência relativa média em relação ao grupo controle.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados inicialmente pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk para avaliar distribuição normal da amostra. Posteriormente pelo teste *t* de *Student* para dados paramétricos e teste de Mann-Whitney para dados não-paramétricos. Todos os dados foram avaliados pelo programa GraphPad 6.0. As diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

Os dados apresentados a seguir são referentes às análises realizadas em amostras de tecido adiposo interescapular e retroperitoneal dos filhotes machos e fêmeas de ratas submetidas à RC durante a gestação. O grupo controle recebeu dieta *ad libitum*.

6.1 PESO E PERCENTUAL DE GORDURA CORPORAL DOS FILHOTES

Foram medidos o peso corporal e o peso total dos depósitos de gordura interescapular e retroperitoneal dos filhotes aos 60 dias pós-natal. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e RC no peso corporal dos filhotes machos [$t(38)=1,522$; $p=0,1364$] e fêmeas [$t(42)=1,645$; $p=0,1075$] (Figura 1).

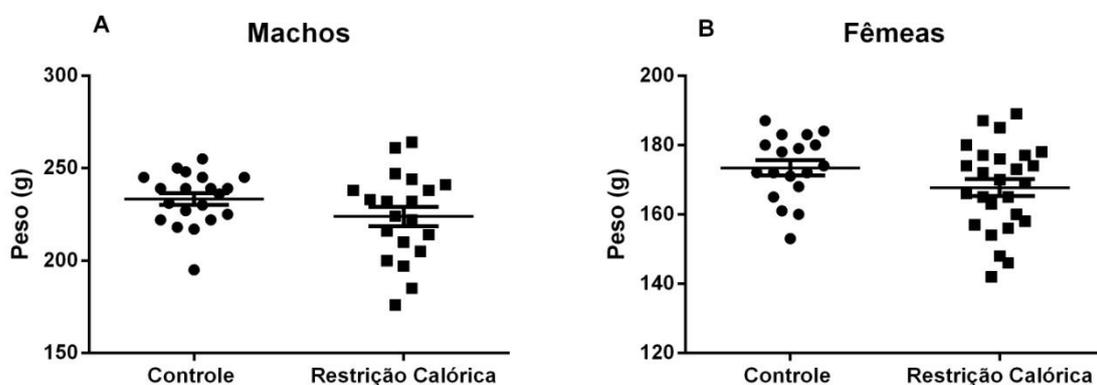


Figura 1. Efeito da RC gestacional sobre o peso corporal dos filhotes machos e fêmeas no dia pós-natal 60. A análise foi realizada pelo teste *t* de *Student* e os resultados expressos em média \pm EP (n= 18-26 animais/grupo).

O percentual (%) dos depósitos de tecido adiposo interescapular em relação ao peso corporal não foram alterados significativamente em filhotes machos [t(18)=0,1906; p=0,8510] e fêmeas [t(17)=1,801; p=0,0895]. Entretanto, o percentual dos depósitos de tecido adiposo retroperitoneal nos filhotes machos diminuiu em relação ao grupo controle [t(18)=3,000; p=0,0077], sem alteração no mesmo depósito adiposo para os filhotes fêmeas [t(18)=0,2448; p=0,8094] (Figura 2).

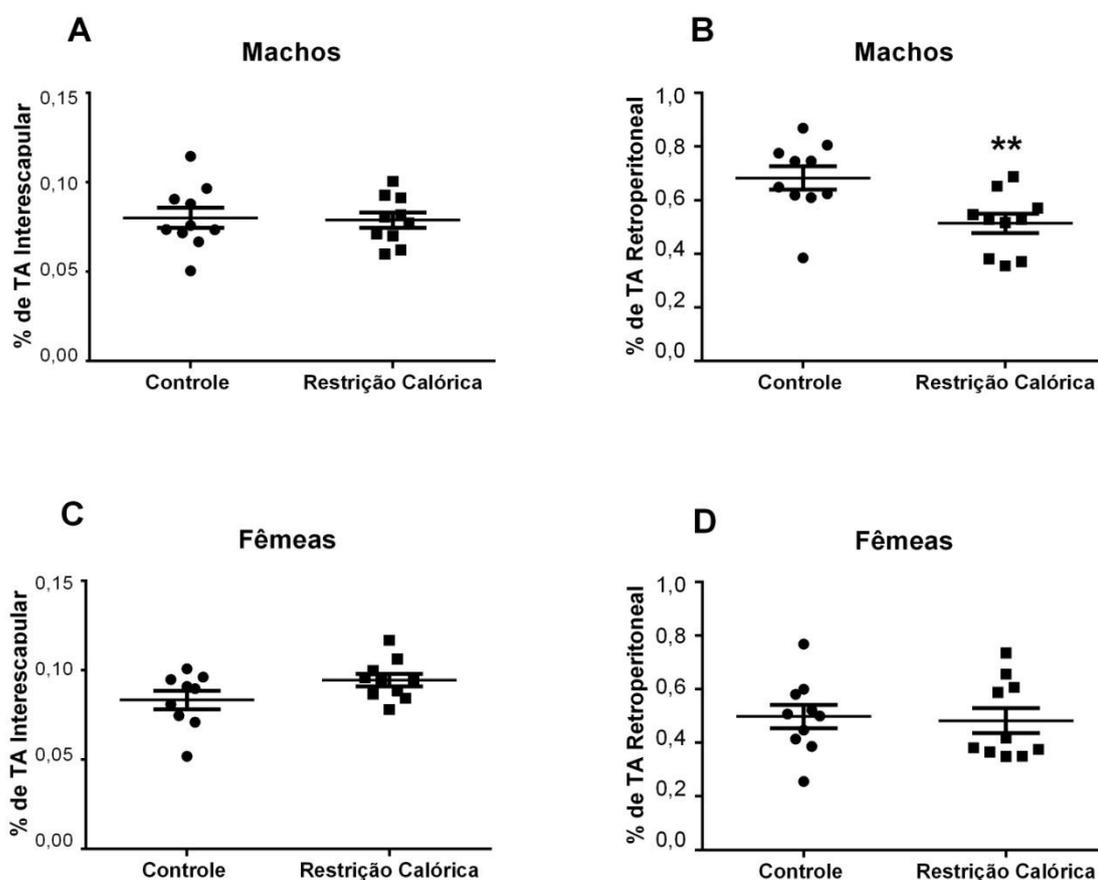


Figura 2. Efeito da RC gestacional sobre o % de tecido adiposo (TA): A) interescapular e B) retroperitoneal em relação ao peso corporal total dos filhotes machos e C) interescapular e D) retroperitoneal em relação ao peso corporal total dos filhotes fêmeas no dia pós-natal 60. A análise foi realizada pelo teste *t* de *Student* e os resultados expressos em média \pm EP (n= 9-10 animais/grupo). **p<0,01.

6.2 EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA MATERNA SOBRE O CONTEÚDO DE ESPÉCIES REATIVAS E PARÂMETROS MITOCONDRIAIS NO TECIDO ADIPOSEO DOS FILHOTES MACHOS

A RC gestacional promoveu diferentes modificações no conteúdo de espécies reativas e parâmetros mitocondriais nos diferentes depósitos adiposos avaliados nos filhotes machos aos 60 dias pós-natal. As amostras de tecido adiposo interescapular e retroperitoneal foram analisadas por meio de citometria de fluxo.

6.2.1 TECIDO ADIPOSEO INTERESCAPULAR

A figura 3 demonstra os resultados obtidos a partir das análises realizadas no tecido adiposo interescapular da prole. A RC gestacional não alterou o conteúdo geral de espécies reativas [t(12)=0,1243; p=0,9032], acessado pela oxidação da DCFH, nem o conteúdo de óxido nítrico [t(14)=1,769; p=0,0987], medido através da sonda DAF-FM®. O conteúdo de superóxido mitocondrial, medido através da sonda MitoSox®, esteve diminuído no grupo RC [U= 4,000; p=0,0034].

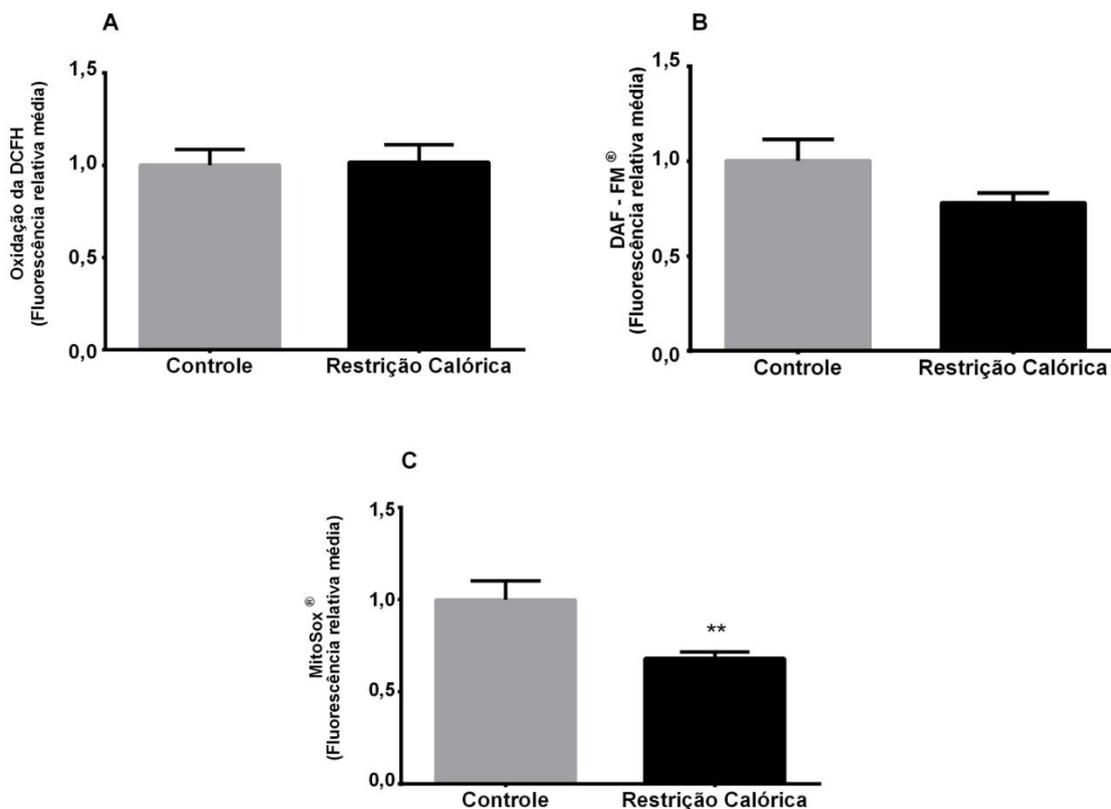


Figura 3. Efeito da RC gestacional sobre: A) oxidação da 2'7'-diclorofluoresceína (DCFH), B) conteúdo de óxido nítrico (DAF-FM®) e C) conteúdo de superóxido mitocondrial (MitoSox®) no tecido adiposo interescapular dos filhotes machos no dia pós-natal 60. A análise foi realizada pelo teste t de Student ou teste U de Mann Whitney e os resultados expressos em média ± EP (n= 7-8 animais/grupo). **p<0,01.

Na figura 4 estão representadas a massa e o potencial de membrana mitocondrial do tecido adiposo interescapular, os parâmetros foram acessados pelas sondas MitoTracker Green® e MitoTracker Red®, respectivamente. Observou-se aumento estatisticamente significativo apenas da massa mitocondrial [U= 1,000; p=0,0023], sem alteração estatisticamente significativa no potencial de membrana mitocondrial [U= 18,00; p=0,2678].

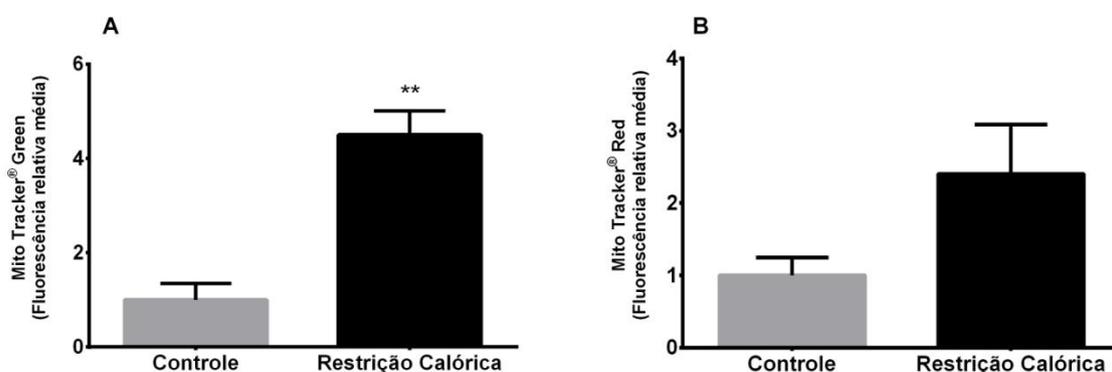


Figura 4. Efeito da RC gestacional sobre: A) massa mitocondrial e B) potencial de membrana mitocondrial no tecido adiposo interescapular dos filhotes machos no dia pós-natal 60. A análise foi realizada pelo teste U de Mann Whitney e os resultados expressos em média ± EP (n= 6-8 animais/grupo). **p<0,01.

6.2.2 TECIDO ADIPOSEO RETROPERITONEAL

Ainda para os filhotes machos, a RC gestacional não alterou o conteúdo geral de espécies reativas [t(13)=1,688; p=0,1153], acessado pela oxidação da DCFH, o conteúdo de óxido nítrico [t(14)=1,228; p=0,2395], medido através da sonda DAF-FM®, nem o conteúdo de superóxido mitocondrial [t(14)=2,098; p=0,0545] medido através da sonda MitoSox®, no tecido adiposo retroperitoneal (figura 5).

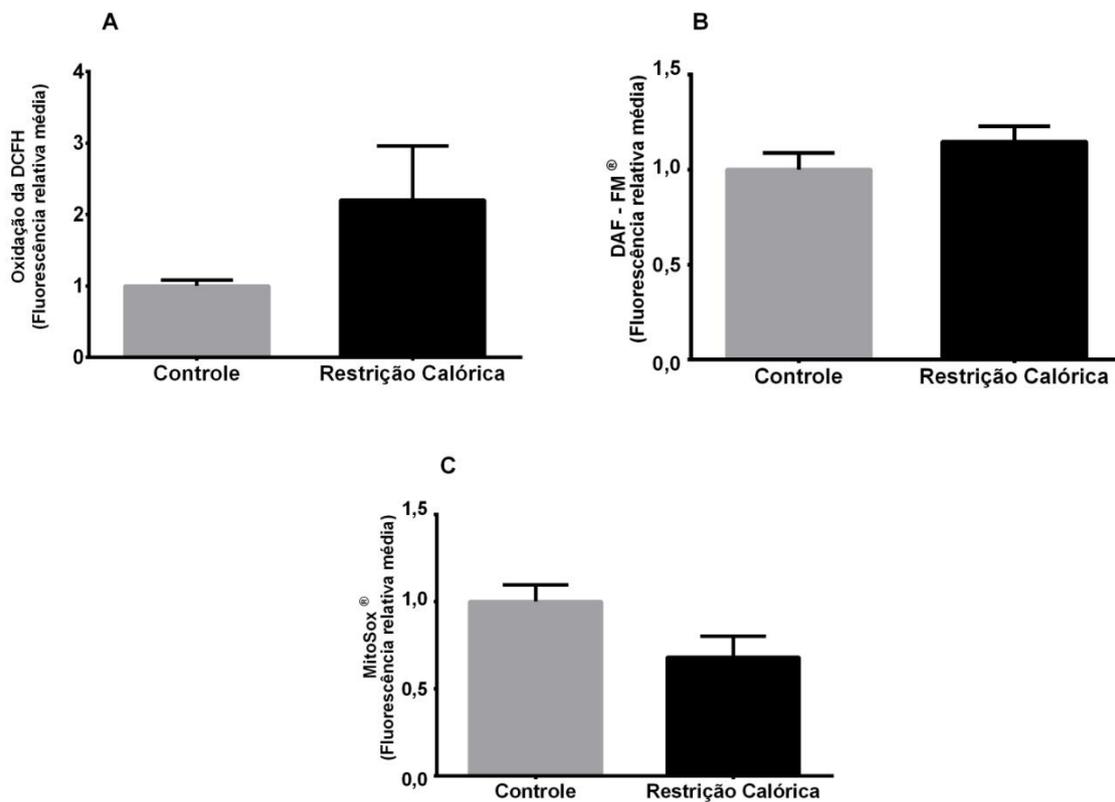


Figura 5. Efeito da RC gestacional sobre: A) oxidação da 2'7'-diclorofluoresceína (DCFH) e B) conteúdo de superóxido mitocondrial (MitoSox[®]) no tecido adiposo retroperitoneal dos filhotes machos no dia pós-natal 60. A análise foi realizada pelo teste *t* de *Student* e os resultados expressos em média \pm EP (n= 7-8 animais/grupo).

Da mesma forma, a massa [$t(13)=0,4642$; $p=0,6502$] e o potencial de membrana mitocondrial [$t(14)=0,3355$; $p=0,7422$] do tecido adiposo retroperitoneal, acessados pelas sondas MitoTracker Green[®] e MitoTracker Red[®], respectivamente, não sofreram alteração.

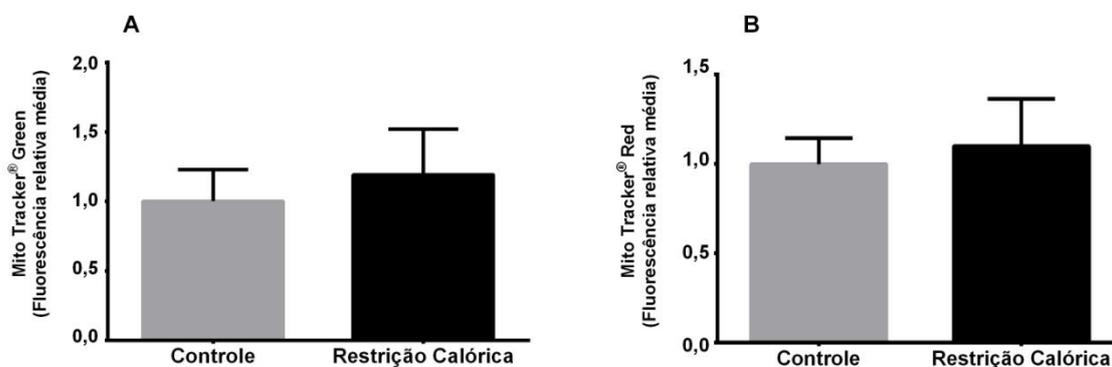


Figura 6. Efeito da RC gestacional sobre: A) massa mitocondrial e B) potencial de membrana mitocondrial no tecido adiposo retroperitoneal dos filhotes machos no dia pós-natal 60. A análise foi realizada pelo teste *t* de *Student* e os resultados expressos em média \pm EP (n= 7-8 animais/grupo).

6.3 EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA MATERNA SOBRE O CONTEÚDO DE ESPÉCIES REATIVAS E PARÂMETROS MITOCONDRIAIS NO TECIDO ADIPOSE DOS FILHOTES FÊMEAS

Nas fêmeas a RC gestacional promoveu modificações diferentes daquelas observadas nos filhotes machos, observando-se um menor número de alterações nos parâmetros avaliados.

6.3.1 TECIDO ADIPOSE INTERESCAPULAR

Como demonstrado na figura 7, a RC gestacional promoveu aumento significativo do conteúdo geral de espécies reativas [U= 0,0; p= 0,0012], acessado pela oxidação da DCFH, no tecido adiposo interescapular. Os níveis de óxido nítrico [t(14)=0,2903; p=0,7758], medido através da sonda DAF-FM[®], e superóxido mitocondrial [U=14,50;p= 0,3869], medido através da sonda MitoSox[®], não foram alterados.

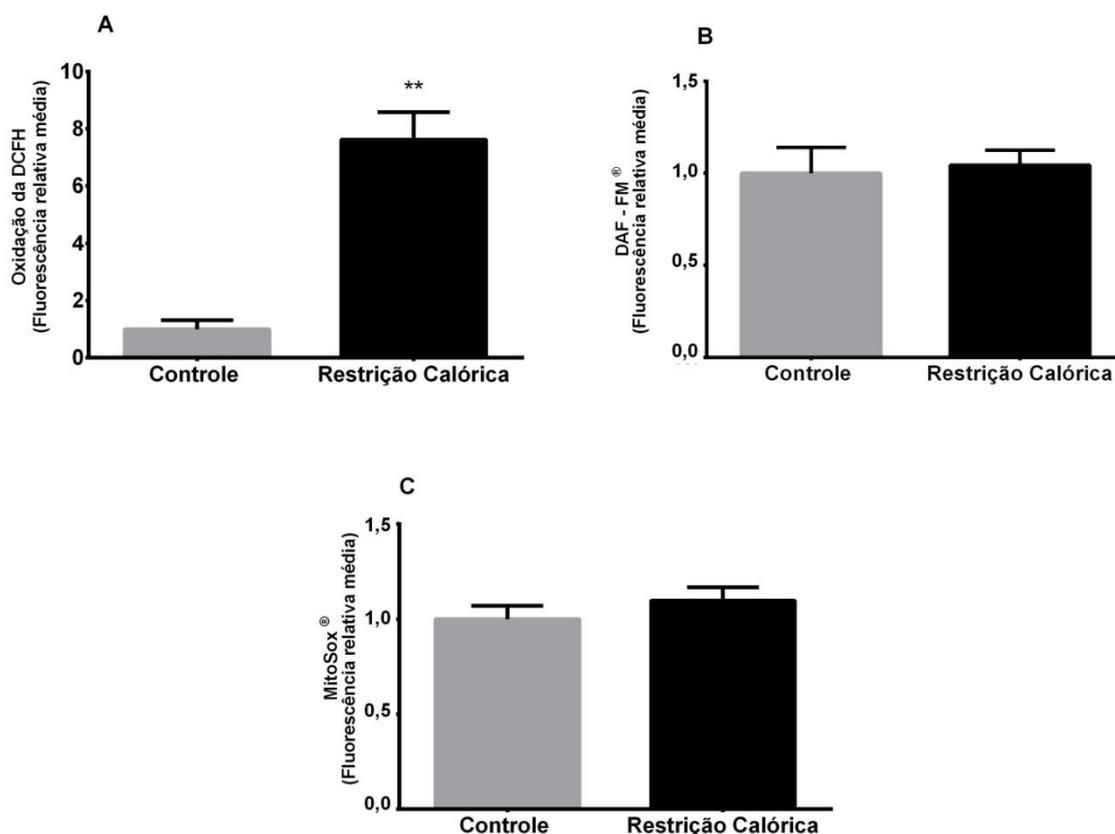


Figura 7. Efeito da RC gestacional sobre: A) oxidação da 2'7'-diclorofluoresceína (DCFH), B) conteúdo de óxido nítrico (DAF-FM[®]) e C) conteúdo de superóxido mitocondrial (MitoSox[®]) no tecido adiposo interescapular dos filhotes fêmeas no dia pós-natal 60. A análise foi realizada pelo teste *t* de Student ou teste U de Mann Whitney e os resultados expressos em média \pm EP (n= 6-9 animais/grupo). **p<0,01.

Os parâmetros mitocondriais também não sofreram alterações no tecido adiposo interescapular. A massa mitocondrial [t(14)=0,1243; p=0,5269], acessada pela sonda MitoTracker Green[®], e o potencial de membrana mitocondrial [t(14)=0,5544; p=0,5880], acessado pela sonda MitoTracker Red[®], permaneceram iguais ao grupo controle, conforme demonstrado na figura 8.

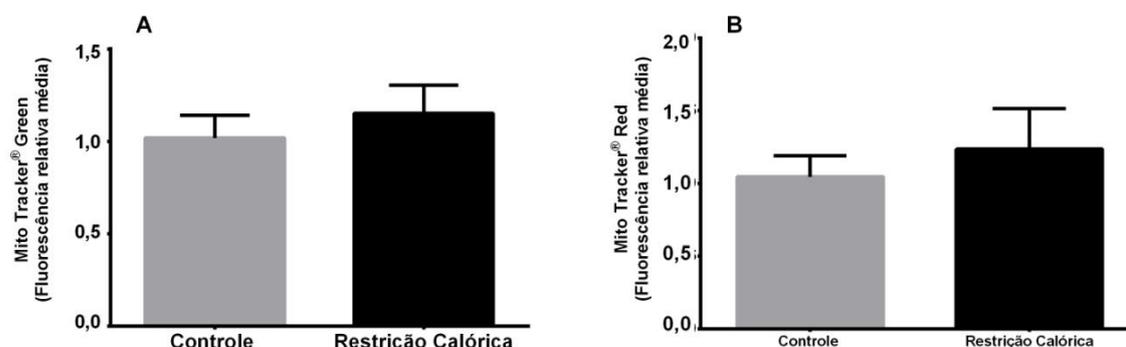


Figura 8. Efeito da RC gestacional sobre: A) massa mitocondrial e B) potencial de membrana mitocondrial no tecido adiposo interescapular dos filhotes fêmeas no dia pós-natal 60. A análise foi realizada pelo teste *t* de *Student* e os resultados expressos em média ± EP (n= 7-9 animais/grupo).

6.3.2 TECIDO ADIPOSEO RETROPERITONEAL

A RC gestacional não alterou o conteúdo geral de espécies reativas [t(14)=0,9512; p=0,3576], acessado pela oxidação da DCFH, o conteúdo de óxido nítrico [t(14)=1,425; p=0,1760], medido através da sonda DAF-FM®, nem o conteúdo de superóxido mitocondrial [t(14)=0,5572; p=0,5862], medido através da sonda MitoSox®, no tecido adiposo retroperitoneal das fêmeas (figura 9).

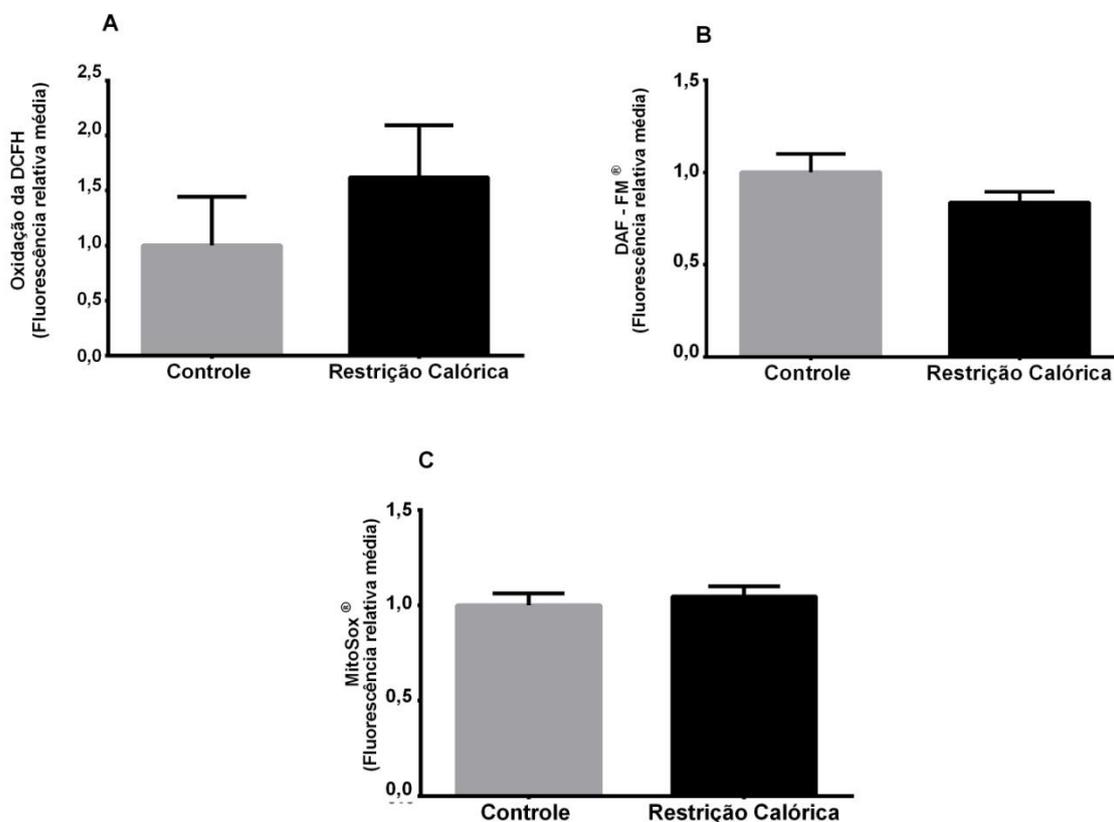


Figura 9. Efeito da RC gestacional sobre: A) oxidação da 2'7'-diclorofluoresceína (DCFH), B) conteúdo de óxido nítrico (DAF-FM®) e C) conteúdo de superóxido mitocondrial (MitoSox®) no tecido adiposo retroperitoneal dos filhotes fêmeas no dia pós-natal 60. A análise foi realizada pelo teste *t* de *Student* e os resultados expressos em média ± EP (n= 8 animais/grupo).

Da mesma forma, os parâmetros mitocondriais no tecido adiposo retroperitoneal das fêmeas não foram alterados. Conforme demonstrado na figura 10, a massa mitocondrial [t(14)=0,4587; p=0,6535], acessada pela sonda MitoTracker Green®, e o potencial de membrana mitocondrial [U= 19,00; p= 0,3203],

acessado pela sonda MitoTracker Red[®], do grupo RC permaneceram iguais ao grupo controle.

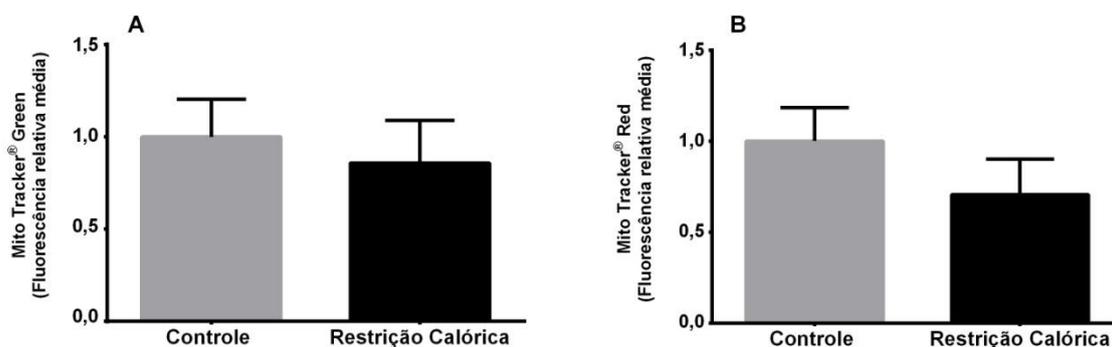


Figura 10. Efeito da RC gestacional sobre: A) massa mitocondrial e B) potencial de membrana mitocondrial no tecido adiposo retroperitoneal dos filhotes fêmeas no dia pós-natal 60. A análise foi realizada pelo teste *t* de Student ou teste U de Mann Whitney e os resultados expressos em média \pm EP (n= 7-8 animais/grupo).

7. DISCUSSÃO

7.1 EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA GESTACIONAL SOBRE O PESO DOS ANIMAIS E HOMEOSTASE REDOX CEREBRAL

Estudos prévios de nosso grupo demonstraram que a RC gestacional com suplementação de micronutrientes promoveu efeitos positivos na prole ao longo do seu desenvolvimento (STONE; MAURMANN; et al., 2019). As fêmeas submetidas à RC gestacional apresentaram menor ganho de peso a partir do nono dia de gestação e o tamanho das ninhadas e o peso dos filhotes do grupo RC em PND0 permaneceram iguais ao grupo controle. Esses dados contrapõem preocupações frequentes em protocolos de RC gestacional que resultam em desnutrição. Nosso modelo não resultou em prejuízos à taxa de fertilidade das ratas do grupo RC. Além disso, a manutenção do peso igual aos filhotes controle em PND0 exclui a preocupação do baixo peso ao nascer, o que poderia estar relacionado ao desenvolvimento de doenças metabólicas na idade adulta.

Outros achados de nosso grupo dizem respeito à homeostase redox em estruturais cerebrais dos filhotes submetidos à RC intrauterina (STONE; CRESTANI; et al., 2019). Observou-se diminuição da função mitocondrial em diversas estruturas cerebrais logo no nascimento dos filhotes (PND0), entretanto, ao longo do

desenvolvimento adaptações nessas estruturas resultaram em aumento do potencial de membrana e da massa mitocondriais na idade adulta dos animais (PND60). É importante ressaltar que a função mitocondrial diminuída em PND0 não acarretou prejuízos ao desenvolvimento neuromotor dos animais. Além disso, os animais adultos apresentaram diminuição da preferência por alimentos hiperpalatáveis. Esse fato associado aos resultados desse trabalho, onde observou-se manutenção do peso dos animais do grupo RC iguais ao grupo controle, e inclusive diminuição do percentual de tecido adiposo retroperitoneal nos filhotes machos, evidenciam os efeitos positivos da RC moderada gestacional. Essa evidência indica que os filhotes não apresentam características de fenótipo poupador, como maior ganho de peso ao longo da vida e, conseqüentemente, excesso de peso na idade adulta.

Nosso modelo se enquadra como RC moderada, sendo que a única alteração entre os grupos é o número de calorias ingeridas e não o conteúdo de micronutrientes da dieta. Acreditamos que a RC pode trazer benefícios para a próxima geração, evitando doenças metabólicas crônicas. Investigar quais mecanismos moleculares estão envolvidos nas adaptações provocadas pela RC gestacional, podem ser úteis para a pesquisa clínica.

7.2 RESPOSTA SEXO-DEPENDENTE E A EXPANSÃO DO TECIDO ADIPOSEO

Neste trabalho observamos efeito sexo dependente da RC gestacional. Os machos se mostraram mais suscetíveis à intervenção, apresentando diferenças significativas tanto no tecido adiposo interescapular quanto no retroperitoneal. As fêmeas por sua vez, tiveram aumento do conteúdo de espécies reativas no tecido adiposo interescapular, mas não apresentaram alterações nos demais parâmetros avaliados.

Estes achados eram esperados, visto que distúrbios metabólicos do tecido adiposo apresentam respostas sexo-dependentes, e essas diferenças se tornam mais proeminentes ao longo do envelhecimento. Garcia-Carrizo e colaboradores (2017) avaliaram as características do tecido adiposo de ratos Wistar ao longo do seu envelhecimento e observaram aumento gradual dos depósitos de gordura inguinal, mesentérica e retroperitoneal, além do conteúdo total de DNA, de acordo com o aumento da idade (7-14 meses de idade) nas fêmeas. Já para os machos

esses parâmetros atingiram valores estáveis aos sete meses de idade sem aumento posterior. Neste mesmo período, os machos começaram a apresentar alterações metabólicas como resistência insulínica, maior trigliceridemia e maior conteúdo hepático de triglicerídeos enquanto as fêmeas se mostraram protegidas dessas complicações (GARCIA-CARRIZO et al., 2017).

Esse efeito protetor pode ser explicado pelo aumento do tecido adiposo das fêmeas, que parece se dar por hiperplasia (aumento do número de células), já que foi observado aumento gradual no DNA total. Os machos apresentaram estabilização do conteúdo de DNA nos depósitos de gordura aos sete meses de idade, além de apresentarem adipócitos maiores e sinais de infiltração de macrófagos aos 14 meses de idade, o que caracteriza expansão do tecido adiposo por hipertrofia (aumento do tamanho da célula), sendo essa a forma mais perigosa de ganho de gordura, estando associada a complicações metabólicas (CHOE et al., 2016).

Esses resultados estão de acordo com a hipótese da expansibilidade do tecido adiposo, que afirma que a falha na capacidade expansiva do tecido adiposo, ao invés da obesidade *per se*, é um fator importante envolvido na origem da síndrome metabólica (VIRTUE; VIDAL-PUIG, 2010).

Em nosso trabalho observamos diminuição do percentual de tecido adiposo retroperitoneal nos filhotes machos aos 60 dias de idade. A partir disso supomos que a RC gestacional atue como fator protetor contra o aumento hipertrófico do tecido adiposo, que tende a ocorrer nos machos ao longo do envelhecimento, conseqüentemente diminuindo as chances de desenvolver complicações metabólicas associadas, como: resistência à insulina, hipertrigliceridemia, deposição lipídica hepática e inflamação do tecido adiposo.

7.3 ALTERAÇÕES MITOCONDRIAS

A RC gestacional apresentou resultados mais proeminentes no tecido adiposo interescapular dos filhotes machos. Esse tecido é representativo da gordura marrom, portanto caracterizado por um número elevado de mitocôndrias e UCP1. Estudo prévio demonstrou menor ativação mitocondrial nesse tecido quando aplicado protocolo de RC em idade adulta (OKITA et al., 2012). E avaliando protocolo de RC

de 20%, sem suplementação de micronutrientes, durante a primeira metade do período gestacional (1º ao 12º dia), Palou e colaboradores (2015) encontraram redução significativa dos níveis de proteína UCP1 no tecido adiposo marrom da prole de machos e fêmeas aos 25 dias de idade, indicando capacidade termogênica diminuída (PALOU et al., 2015).

Em nosso trabalho, observamos o contrário, a RC gestacional diminuiu a produção de superóxido mitocondrial. Um menor fluxo de elétrons e vazamentos de prótons pelo STEM está associado à menor geração de espécies reativas e consequente atenuação dos danos causados por elas (JASTROCH et al., 2010). Também observamos aumento da massa mitocondrial no tecido adiposo interescapular dos machos. Segundo López-Lluch e colaboradores (2006) as mitocôndrias sob condições de RC apresentam menor consumo de oxigênio, reduzem o potencial de membrana e geram menos espécies reativas de oxigênio, ao mesmo tempo que mantêm sua produção de ATP elevada (LOPEZ-LLUCH et al., 2006).

Nossos resultados sugerem maior ativação e eficiência mitocondrial decorrente da RC gestacional no tecido adiposo interescapular dos machos. Esses efeitos podem ser atribuídos ao aumento da biogênese mitocondrial induzida pela RC (JORNAYVAZ; SHULMAN, 2010), ou ainda pela formação de supercomplexos entre complexos individuais do STEM (GAO; CANTO; HOUTKOOPEL, 2014; KIM et al., 2015). Essa organização permite aumento da atividade catalítica dos complexos, que transferem elétrons com maior eficiência por canalização do substrato, resultando em menor vazamento de elétrons e prevenindo a produção de espécies reativas na mitocôndria (JANG; JAVADOV, 2018).

7.4 MODELO CONTROLE

Para além dos benefícios já elucidados da RC, é importante ressaltar que os animais utilizados como modelo controle nesse estudo, devido seu ambiente de vida no laboratório, são sedentários e superalimentados (MARTIN et al., 2010). Esse fato pode representar uma limitação do estudo, entretanto, esse modelo mimetiza o estilo de vida de grande parte da população mundial atualmente, inclusive gestantes, considerando as crescentes taxas de obesidade (WHO, 2018).

8. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que a alimentação materna influencia no desenvolvimento do tecido adiposo fetal através da programação metabólica. A RC gestacional alterou positivamente parâmetros oxidativos e mitocondriais no tecido adiposo, de forma sexo dependente. Esses resultados podem colaborar para o entendimento da RC gestacional moderada como possível fator protetor contra o desenvolvimento de doenças metabólicas na idade adulta, mediado em parte pelo tecido adiposo. Entretanto, a realização de estudos translacionais é necessária para suportar o uso da RC na prática clínica.

9. REFERÊNCIAS

AUGUST, P. M. et al. Effect of maternal antioxidant supplementation and/or exercise practice during pregnancy on postnatal overnutrition induced by litter size reduction: Brain redox homeostasis at weaning. **Int J Dev Neurosci**, v. 71, p. 146-155, Dec 2018.

BALE, T. L. et al. Early life programming and neurodevelopmental disorders. **Biol Psychiatry**, v. 68, n. 4, p. 314-9, Aug 15 2010.

BARKER, D. J. The origins of the developmental origins theory. **J Intern Med**, v. 261, n. 5, p. 412-7, May 2007.

BERRY, D. C. et al. The developmental origins of adipose tissue. **Development**, v. 140, n. 19, p. 3939-49, Oct 2013.

CERQUEIRA, F. M.; KOWALTOWSKI, A. J. Commonly adopted caloric restriction protocols often involve malnutrition. **Ageing Res Rev**, v. 9, n. 4, p. 424-30, Oct 2010.

CHOE, S. S. et al. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 7, p. 30, 2016.

CINTI, S. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. **Proc Nutr Soc**, v. 60, n. 3, p. 319-28, Aug 2001.

COLLABORATION, N. C. D. R. F. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. **Lancet**, v. 390, n. 10113, p. 2627-2642, Dec 16 2017.

FERNANDEZ-TWINN, D. S.; OZANNE, S. E. Early life nutrition and metabolic programming. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1212, p. 78-96, Nov 2010.

GAO, A. W.; CANTO, C.; HOUTKOOPE, R. H. Mitochondrial response to nutrient availability and its role in metabolic disease. **EMBO Mol Med**, v. 6, n. 5, p. 580-9, May 2014.

GARCIA-CARRIZO, F. et al. Sexual Dimorphism in the Age-Induced Insulin Resistance, Liver Steatosis, and Adipose Tissue Function in Rats. **Front Physiol**, v. 8, p. 445, 2017.

GARCIA, A. P. et al. Moderate caloric restriction during gestation in rats alters adipose tissue sympathetic innervation and later adiposity in offspring. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e17313, Feb 18 2011.

GESTA, S.; TSENG, Y. H.; KAHN, C. R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 242-56, Oct 19 2007.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. **Science**, v. 305, n. 5691, p. 1733-6, Sep 17 2004.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; PINAL, C. The developmental origins of adult disease. **Matern Child Nutr**, v. 1, n. 3, p. 130-41, Jul 2005.

JANG, S.; JAVADOV, S. Current Challenges in Elucidating Respiratory Supercomplexes in Mitochondria: Methodological Obstacles. **Front Physiol**, v. 9, p. 238, 2018.

JASTROCH, M. et al. Mitochondrial proton and electron leaks. **Essays Biochem**, v. 47, p. 53-67, 2010.

JORNAYVAZ, F. R.; SHULMAN, G. I. Regulation of mitochondrial biogenesis. **Essays Biochem**, v. 47, p. 69-84, 2010.

KIM, S. E. et al. Upregulation of cytochrome c oxidase subunit 6b1 (Cox6b1) and formation of mitochondrial supercomplexes: implication of Cox6b1 in the effect of calorie restriction. **Age (Dordr)**, v. 37, n. 3, p. 9787, Jun 2015.

KLEIN, C. P. et al. Swimming exercise before and during pregnancy: Promising preventive approach to impact offspring s health. **Int J Dev Neurosci**, v. 71, p. 83-93, Dec 2018.

KLEIN, C. P. et al. Physical Exercise During Pregnancy Prevents Cognitive Impairment Induced by Amyloid-beta in Adult Offspring Rats. **Mol Neurobiol**, v. 56, n. 3, p. 2022-2038, Mar 2019.

LI, Y. et al. Visceral fat: higher responsiveness of fat mass and gene expression to calorie restriction than subcutaneous fat. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 228, n. 10, p. 1118-23, Nov 2003.

LINNER, A.; ALMGREN, M. Epigenetic programming-The important first 1000 days. **Acta Paediatr**, Oct 11 2019.

LOPEZ-LLUCH, G. et al. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 6, p. 1768-73, Feb 7 2006.

MACKAY, H. et al. Rats perinatally exposed to food restriction and high-fat diet show differences in adipose tissue gene expression under chronic caloric restriction. **Adipocyte**, v. 2, n. 4, p. 237-45, Oct 1 2013.

MARCELINO, T. B. et al. Behavioral benefits of maternal swimming are counteracted by neonatal hypoxia-ischemia in the offspring. **Behav Brain Res**, v. 312, p. 30-8, Oct 1 2016.

MARCELINO, T. B. et al. Effect of maternal exercise on biochemical parameters in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. **Brain Res**, v. 1622, p. 91-101, Oct 5 2015.

MARCELINO, T. B. et al. Evidences that maternal swimming exercise improves antioxidant defenses and induces mitochondrial biogenesis in the brain of young Wistar rats. **Neuroscience**, v. 246, p. 28-39, Aug 29 2013.

MARTIN, B. et al. "Control" laboratory rodents are metabolically morbid: why it matters. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 14, p. 6127-33, Apr 6 2010.

OKITA, N. et al. Differential responses of white adipose tissue and brown adipose tissue to caloric restriction in rats. **Mech Ageing Dev**, v. 133, n. 5, p. 255-66, May 2012.

PALOU, M. et al. Moderate calorie restriction during gestation programs offspring for lower BAT thermogenic capacity driven by thyroid and sympathetic signaling. **Int J Obes (Lond)**, v. 39, n. 2, p. 339-45, Feb 2015.

RAVUSSIN, E.; GALGANI, J. E. The implication of brown adipose tissue for humans. **Annu Rev Nutr**, v. 31, p. 33-47, Aug 21 2011.

STOCHER, D. P. et al. Maternal high-salt diet alters redox state and mitochondrial function in newborn rat offspring's brain. **Br J Nutr**, v. 119, n. 9, p. 1003-1011, May 2018.

STONE, V. et al. Food restriction during pregnancy alters brain's antioxidant network in dams and their offspring. **Free Radic Res**, v. 50, n. 5, p. 530-41, 2016.

STONE, V. et al. Gestational caloric restriction improves redox homeostasis parameters in the brain of Wistar rats: a screening from birth to adulthood. **J Nutr Biochem**, v. 67, p. 138-148, May 2019.

STONE, V. et al. Gestational caloric restriction with micronutrients supplementation does not delay development and promotes feeding behavior benefits. **Nutr Neurosci**, p. 1-11, Oct 14 2019.

UNGER, R. H. Lipotoxic diseases. **Annu Rev Med**, v. 53, p. 319-36, 2002.

UNGER, R. H.; SCHERER, P. E. Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to lipotoxicity. **Trends Endocrinol Metab**, v. 21, n. 6, p. 345-52, Jun 2010.

VALLE, A. et al. Modulation of white adipose tissue proteome by aging and calorie restriction. **Aging Cell**, v. 9, n. 5, p. 882-94, Oct 2010.

VIRTUE, S.; VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. **Biochim Biophys Acta**, v. 1801, n. 3, p. 338-49, Mar 2010.

WADHWA, P. D. et al. Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. **Semin Reprod Med**, v. 27, n. 5, p. 358-68, Sep 2009.

WHO. **Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020**. Geneva: World Health Organization. 2013

Noncommunicable Diseases Progress Monitor. Geneva: World Health Organization. 2017

Noncommunicable diseases country profiles 2018. Geneva: World Health Organization. 2018a

World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva: World Health Organization. 2018b

ANEXO I – carta de aprovação do projeto pela 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: 30044

Título: Efeito da restrição calórica durante o período gestacional sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos mitocondriais em ratos

Vigência: 05/11/2015 à 30/09/2019

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

CRISTIANE MATTE - coordenador desde 05/11/2015
VINICIUS STONE SILVA - Aluno de Doutorado desde 05/11/2015

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 25/01/2016 - Sala 330 do Anexo I do Prédio da Reitoria - Campus Centro- Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 187 ratos Wistar machos (60-90 dias de vida), 374 fêmeas adultas (60 dias de vida), e 704 filhotes provenientes do Biotério do departamento de Bioquímica da UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Segunda-Feira, 7 de Março de 2016

BRUNO CASSEL NETO
Vice Pró-Reitor de Pesquisa