

MICHELLY DELGADO PAES BARRETO

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO SOBRE
AS MODIFICAÇÕES INDUZIDAS PELA DESNUTRIÇÃO
PROTEICA PERINATAL: AVALIAÇÃO DO METABOLISMO
CARDÍACO EM RATOS ADULTOS.**

**RECIFE
2014**

MICHELLY DELGADO PAES BARRETO

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO SOBRE
AS MODIFICAÇÕES INDUZIDAS PELA DESNUTRIÇÃO
PROTEICA PERINATAL: AVALIAÇÃO DO METABOLISMO
CARDÍACO EM RATOS ADULTOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Wylla Tatiana
Ferreira e Silva

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Cláudia
Jacques Lagranha

**RECIFE
2014**

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida, CRB4-1662

B273e Barreto, Michelly Delgado Paes.
Efeito do treinamento físico moderado sobre as modificações induzidas pela desnutrição proteica perinatal: avaliação do metabolismo cardíaco em ratos / Michelly Delgado Paes Barreto. – Recife: O autor, 2014.
55 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Wylla Tatiana Ferreira e Silva.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2014.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Metabolismo. 2. Coração 3. Desnutrição. 4. Enzimas. 5. Exercício. 6. Ratos. I. Silva, Wylla Tatiana Ferreira e (Orientadora). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2014-053)

**DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
PATOLOGIA.**

AUTORA: MICHELLY DELGADO PAES BARRETO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA

NOME DA DISSERTAÇÃO: “EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO SOBRE AS MODIFICAÇÕES INDUZIDAS PELA DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL: AVALIAÇÃO DO METABOLISMO CARDÍACO EM RATOS ADULTOS”.

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. WYLLA TATIANA FERREIRA E SILVA

DATA DA DEFESA: 21 DE FEVEREIRO DE 2014.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Prof^a. Dr^a. Mariana Pinheiro Fernandes

Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva

Deus, por me amar incondicionalmente e por ter me ensinado a perseverar até o
fim.

Aos meus pais, Maria Betânia e Emericles, por estarem ao meu lado em todos os
momentos da minha vida.

À minha irmã, Tâmara Kelly, a maior incentivadora por minha inscrição na
seleção do mestrado.

À minha avó, Maria Socorro, por quem possuo profunda admiração.

Agradecimentos

À Deus, por todas as bênçãos derramadas na minha vida, por seu Amor Ágape, por sua infinita misericórdia. Obrigada, Senhor, por ter escrito esta dissertação junto comigo! Obrigada por todos os Seus ensinamentos, principalmente por me ensinar todos os dias a ser uma pessoa melhor! Obrigada, meu eterno amigo!

À Nossa Senhora, por sua intercessão. Obrigada mãe por me dar forças através do santo terço! Totus Tuus Maria.

Aos meus pais, Maria Betânia e Emicles, obrigada por toda a dedicação, cuidado, amor! Obrigada por todo sacrifício de vocês por mim, por todos os ensinamentos! Obrigada por sempre acreditarem em mim! Tenho muito orgulho de tê-los como pais. Amo muito vocês!

À Kelly, minha irmã, que mesmo morando longe se faz presente em meu dia a dia. Obrigada “Tkinha” por todos os seus incentivos e conselhos. Te amo!

A todos os meus familiares que torceram por mim. Em especial a minha avó Socorro, a minha tia Rosário (“teacher”) e aos meus primos Bárbara e Marquinhos. Obrigada pelo apoio e pelas orações! Vocês são valiosos para mim!

Aos amigos Cris, tia Ângela, Chico, Paulo Olinda, Kali, Anésia, Aninha, Betinha, Adeara, Cárlia, Cássia, Kaline, Lenes, Aliete e aos Filhos da Misericórdia, obrigada por toda a força, oração, “puxão de orelha”! Vocês são verdadeiros anjos!

Aos colegas do Mestrado, Déborah, Mariléia, Fábio, Cristiane, Paulo, Cristie, João, Jeane, Vanessa e Leda foi muito bom ter conhecido vocês. Aprendi muito com vocês!

À Déborah (Debis), obrigada não só por esses dois anos de mestrado, mas também por todo o tempo em que passamos na iniciação científica! Pode ter certeza que sua presença fez tudo se tornar menos complicado!

À Wylla, minha orientadora, obrigada pela confiança durante esse tempo!

À Claudinha, minha co-orientadora, muito obrigada pela presença e paciência durante esses dois anos! Com você aprendi lições que vão além da bioquímica.

À Cris e a Anderson, os melhores ICs do mundo, obrigada pelo comprometimento, presença, carinho!!! Vocês são de mais! Esse trabalho tem muito de vocês também!

A todos que fazem parte do laboratório de bioquímica do CAV (Mari, Diorginis, Aline, Lu, Sandrinha, Priscila, Talita, Ramon, Regi...), grupo que possui muita harmonia e profissionalismo! Passei por bons momentos ao lado de vocês.

À Jeymesson, por todas as orientações e incentivos no estágio à docência. Obrigada por tudo!

À Sueli, obrigada pela ajuda com os animais!

A todos que fazem parte da Pós Graduação de Patologia, em especial a Prof(a) Manuela e a Margareth pela paciência e receptividade.

“É preciso ter coragem e não ter medo de sonhar coisas grandes.”
Papa Francisco

Resumo

Estudos epidemiológicos evidenciam que indivíduos desnutridos no período crítico do desenvolvimento apresentam maior risco para o aparecimento de doenças cardiovasculares quando adultos. Além disso, vem se mostrando que o treinamento físico moderado pode atuar como um agente terapêutico em inúmeras doenças cardíacas. Dessa forma, o intuito do presente estudo foi avaliar o metabolismo cardíaco usando animais de experimentação que sofreram desnutrição no período crítico do desenvolvimento e posteriormente foram treinados cronicamente em intensidade moderada. Para tal, foi avaliada a cinética das seguintes enzimas: fosfofrutoquinase (PFK), β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (β -HAD), citrato sintase (CS), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e ácido graxo sintase (FAS). Ratas gestantes da linhagem *Wistar* foram divididas em dois grupos: controle (C), dieta com caseína a 17%, e desnutrido (D), dieta com caseína a 8%. A dieta foi mantida durante a lactação. Após o desmame, apenas os ratos machos permaneceram no experimento, e todos eles passaram a alimentar-se de Labina (dieta do laboratório). Aos 60 dias de vida, os animais foram subdivididos de acordo com a prática ou não de treinamento físico de intensidade moderada: controle (C), desnutrido (D), treinado (T) e desnutrido treinado (DT). Foi seguido o protocolo experimental em esteira motorizada (8 semanas, 5 dias/semana e 60min/dia a 70%VO_{2máx}). Para atingir o valor de VO_{2máx} desejado, a velocidade, a inclinação da esteira e o tempo de exercício foram manipulados. Em torno dos 120 dias de vida, os animais foram sacrificados por decapitação, e em seguida, o coração foi retirado. Foram utilizados, em cada grupo, de 4 a 7 animais para as análises bioquímicas. A atividade cinética de cada enzima foi expressa em U/mg proteína. Para dados não paramétricos, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com pós-teste Dunns; para os dados paramétricos, foi realizado teste Anova One-Way seguido do teste Bonferroni. O nível de significância foi mantido em 5% para todas as análises. Nossos resultados mostraram que em PFK (C=2.25 $\pm$ 0.39; D=10.13 $\pm$ 2.52; T=29.87 $\pm$ 5.07; DT=4.42 $\pm$ 0.98), o grupo D tem maior atividade em relação ao grupo C, o grupo T também mostra maior atividade quando comparado ao grupo C, e o grupo DT tem menor atividade enzimática em relação ao grupo T. Em β -HAD (C=3.08 $\pm$ 0.79; D=4.86 $\pm$ 0.47; T=3.48 $\pm$ 0.57; DT=5.05 $\pm$ 1.34), não houve diferença entre os grupos. Em CS (C=3.96 $\pm$ 0.78; D=1.85 $\pm$ 0.36; T=1.47 $\pm$ 0.42; DT=2.51 $\pm$ 0.17), o grupo D apresenta menor atividade enzimática em relação ao grupo C, o grupo T também tem atividade reduzida comparado ao grupo C. Em FAS (C=15.46 $\pm$ 1.40; D=35.91 $\pm$ 7.11; T=52.39 $\pm$ 9.30; DT=31.61 $\pm$ 5.85), o grupo D teve maior atividade em relação ao grupo C, e o grupo T teve também aumento da atividade quando comparado ao grupo C. Em G6PDH (C= 4.93 $\pm$ 0.40; D=4.38 $\pm$ 0.68, T=4.41 $\pm$ 0.26; DT=5.18 $\pm$ 0.70) não houve diferença entre os grupos. As alterações nas atividades enzimáticas de ratos apenas desnutridos foram as mesmas de ratos apenas treinados. O treinamento físico moderado em ratos desnutridos pode induzir modificações no metabolismo cardíaco quanto às atividades de PFK e CS.

Palavras-chaves: Metabolismo. Coração. Desnutrição. Enzimas. Exercício físico. Ratos

Abstract

Epidemiological studies had shown that nutritional deficiency in the critical period development increase the vulnerability to cardiovascular diseases in adulthood, in addition experimental and epidemiological studies indicate that the moderate physical training can be a therapeutic agent in many heart diseases. Thereby, this study had the intention of evaluate the heart metabolism using experimental animals that were malnourished (i.e low-protein diet) in the critical period development and after were trained chronically in moderate intensity. For this study we evaluated the kinetic of the following enzymes: phosphofructokinase (PFK), β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (β -HAD), citrate synthase (CS), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and fatty acid synthase (FAS). Pregnant rats were divided in two groups: Control (C), 17% casein diet, and undernutrition (U), 8% casein diet. The low-protein diet was maintained during the lactation. After the weaning, only male animals stayed in the experiment and they were fed by Labina (standard diet). At the age of 60 days of birth, the animals were further divided according to physical training in moderate intensity: Control (C), undernutrition (U), trained (T) and undernutrition trained (UT). The experimental protocol was carried-on in treadmill (5 weekly sessions of 60 minutes per 8 weeks at 70% of VO_{2max}). To achieve the VO_{2max} intended, the velocity, the incline of the treadmill and the exercise time were manipulated according previous studies. Around age of 120 days, the animals were sacrificed by decapitation, and the heart was removed. In each group, was used between four and seven rats in the biochemical analyses. The analysis of the enzymes activity was performed according specific reference for each enzyme. For nonparametric data were used Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test, for parametric data, were used Anova One-Way test and Bonferroni post-test. The values were expressed in mean and standard error of mean ($X \pm SEM$). The significance level was maintained in 5%. Our results showed that in PFK ($C=2.25 \pm 0.39$; $U=10.13 \pm 2.52$; $T=29.87 \pm 5.07$; $UT=4.42 \pm 0.98$), U group had higher enzymatic activity than C group, T group also show higher activity than C, UT group had smaller enzymatic activity than T group. In β -HAD ($C=3.08 \pm 0.79$; $U=4.86 \pm 0.47$; $T=3.48 \pm 0.57$; $UT=5.05 \pm 1.34$), there was not differences enter the groups. In CS ($C=3.96 \pm 0.78$; $U=1.85 \pm 0.36$; $T=1.47 \pm 0.42$; $UT=2.51 \pm 0.17$), U group show smaller enzymatic activity than C group, T group had also reduced activity than C. In FAS ($C=15.46 \pm 1.40$; $U=35.91 \pm 7.11$; $T=52.39 \pm 9.30$; $UT=31.61 \pm 5.85$), U group had greater activity than C group, T group had also higher activity than C. In G6PDH ($C= 4.93 \pm 0.40$; $U=4.38 \pm 0.68$, $T=4.41 \pm 0.26$; $UT=5.18 \pm 0.70$) there was not differences enter the groups. The enzymatic alteration in sedentary undernutrition rats were the same in normonutrition trained rats. The moderate physical training in undernutrition rats can induce alteration in cardiac metabolism by PFK and CS activities.

Keywords: Metabolism. Heart. Enzymes. Malnutrition. Physical Exercise. Rats

Lista de abreviações e Siglas

Acetil CoA	Acetil Coenzima A
ACS	Acil-Coa sintase
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina do soro bovino
CS	Citrato sintase
DTNB	Ácido 5,5 ditiobis (2-nitro-benzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAS	Ácido graxo sintase
G6PDH	Glicose 6-fosfato desidrogenase
GPAT	Glicerol-3 fosfato acil-transferase
LDH	Lactato desidrogenase
NADH	Nicodinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
PFK	Fosfofrutoquinase
RPM	Rotações por minuto
SCD	Stearoil-CoA desaturase
VO₂máx	Captação máxima de oxigênio
β-HAD	β-hydroxiacil-Coa desidrogenase

Sumário

1. APRESENTAÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Breve Introdução sobre Desenvolvimento Cardíaco e Metabolismo	14
2.2 Desnutrição perinatal, período crítico do desenvolvimento	15
2.3 Treinamento Físico	16
3. OBJETIVOS	18
3.1 Geral	18
3.2 Específicos	18
4. MÉTODOS.....	18
4.1 Animais e formação dos grupos experimentais	18
4.2 Manipulação da dieta.....	19
4.3 Protocolo de treinamento físico.....	21
4.4 Coleta dos tecidos	23
4.5 Análises bioquímicas	23
4.5.1 Preparo do homogeneizado do tecido cardíaco para utilização nas técnicas bioquímicas... 23	
4.5.2 Dosagem de proteína	23
4.5.3 Determinação da atividade cinética da fosfofrutoquinase (E.C. 2.7.1.11)	24
4.5.4 Determinação da atividade cinética da β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (β -HAD) (E.C. 1.1.1.35)	24
4.5.5 Determinação da atividade cinética da citrato sintase (E.C. 1.1.1.49)	24
4.5.6 Determinação da Atividade Cinética da Ácido graxo sintase (E.C. 2.3.1.85).....	25
4.5.7 Determinação da atividade cinética da Glicose 6-fosfato desidrogenase (E.C. 1.1.1.49)	25
4.6 Análise estatística.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
REFERÊNCIAS	28
APÊNDICE - ARTIGO.....	33
ANEXOS.....	53

1. APRESENTAÇÃO

O sistema cardiovascular tem papel fundamental na distribuição de nutrientes e de oxigênio para o embrião (BUCKINGHAM, MEILHAC, 2005). As porções atriais e ventriculares trabalham em conjunto para fornecer o fluxo sanguíneo adequado para todos os órgãos do corpo atendendo às necessidades metabólicas em resposta às interferências do meio externo, mantendo, desse modo, a homeostase (BUCKINGHAM, MEILHAC, 2005; MOORE, PERSAUD, 2008). No coração de indivíduos saudáveis, cerca de 70% do acetil-coenzima A (acetil-CoA) provém da β -oxidação dos ácidos graxos; o restante, provém da glicólise (STANLEY, RECCHIA, 2005). O acetil-CoA é encaminhado para a via do ácido cítrico ou ciclo de Krebs para fornecer intermediários que alimentará a cadeia transportadora de elétrons para síntese de novas moléculas de ATP. É fundamental, o adequado funcionamento dessas vias para que ocorra a fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, a produção energética necessária para que o indivíduo realize suas atividades do dia-a-dia.

Estudos indicam que a má nutrição é um dos fatores não genéticos que mais interferem no desenvolvimento normal dos órgãos (MORGANE et al., 1993). Segundo estudos epidemiológicos no Brasil, há uma estreita relação entre desnutrição no período perinatal e desenvolvimento de doenças na fase adulta (SAWAYA et al., 1995; SAWAYA et al., 2003). A desnutrição durante a gestação, período crítico do desenvolvimento, pode provocar malefícios para o indivíduo adulto como obesidade, diabetes e hipertensão arterial (BARKER, et al., 1989; PHILLIPS, 2001; OKEN, GILLMAN, 2003; GONZALEZ et al., 2006), com alteração estrutural e bioquímica (NOBACK, EISENMAN, 1981). A literatura afirma que há uma relação entre o peso ao nascer e a incidência de doenças cardiovasculares (BARKER, 1998).

Por outro lado, estudos propõem que mudanças no estilo de vida como dieta equilibrada e prática regular de exercício físico podem prevenir o aparecimento dessas afecções (IVANOVIC, CASTRO, IVANOVIC 1996; WHO, 2003; SCHRAMM et al., 2004; GUPTA, 2008). O exercício físico realizado regularmente, além de predispor a sensação de bem-estar (LOBSTEIN, MOSBACHER, ISMAEL, 1983), melhora o funcionamento da “bomba” cardíaca; favorecendo, desse modo, o retorno venoso e a atividade metabólica. Se o exercício físico passa a ocorrer com periodização e intensidade de esforço controlada é referido como treinamento físico (POLLOCK, 1973). Quanto à classificação, o treinamento físico é classificado em leve, moderado e intenso, de acordo com o consumo máximo de oxigênio (POLLOCK, MICHAEL, 1973). A literatura vem mostrando que o treinamento

físico moderado na fase adulta reverte no coração as injúrias provocadas pela desnutrição protéica perinatal de acordo com análises morfológicas (OSBORNE et al., 1992; PELLICCIA, CULASSO, 1999). No entanto, estudos a cerca do efeito do treinamento físico sobre o metabolismo cardíaco de indivíduos desnutridos são escassos.

Desse modo, o presente estudo testou a hipótese de que o treinamento físico de intensidade moderada é capaz de reverter ou amenizar os danos causados pela desnutrição perinatal no metabolismo cardíaco de ratos adultos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Breve Introdução sobre Desenvolvimento Cardíaco e Metabolismo

Em vertebrados, a formação do sistema cardiovascular inicia-se logo após a implantação embrionária, sendo o coração o primeiro órgão interno que começa a trabalhar (DRENCKHAHN, DELBRÜCK, 2009). O batimento cardíaco tem início a partir da formação do tubo cardíaco (GRANADOS-RIVERON, BROOK, 2012). Ocorre em ratos e humanos por volta de 8,5 dias e 21 dias após a fecundação, respectivamente (CHEN et al., 2010; SADLER, 2011). Para isso, no início do desenvolvimento fetal, os cardiomiócitos, células musculares cardíacas, diferenciam-se e, em seguida, as contrações musculares ocorrem (NAKAJIMA et al., 2011); estimulando, com isso, o crescimento e a morfogênese cardíaca (BURGGREN, 2004). A contração ventricular do tubo cardíaco diferentemente do coração maduro é assimétrica (FOROUHAR et al., 2006) e não há volume sistólico residual (MOORMAN, CHRISTOFFELS, 2003), já que existe oclusão completa da luz do tubo (SEDMERA, MCQUINN, 2008).

Estudos mostram que a proliferação de cardiomiócitos, além de ser o principal mecanismo responsável pelo aumento do tamanho cardíaco (SAIKI et al., 1997; SEDMERA et al., 2002), é necessário para o desenvolvimento embrionário (NAKAJIMA et al., 2011). Sem essa proliferação e diferenciação progressiva das células cardíacas, o embrião não irá sobreviver, pois à medida que o feto cresce, um maior volume sanguíneo será preciso para distribuir os nutrientes e oxigênio para o corpo (NAKAJIMA et al., 2011).

O coração, além de ser o órgão que mais consome oxigênio, em torno de 8 a 15 ml O₂ min / 100g coração, também é a estrutura do corpo que mais necessita de energia (SCOLLETTA, BIAGIOLI, 2010). Diariamente, o coração bate aproximadamente 100.000 vezes, bombeando cerca de 10 toneladas de sangue para o corpo; para isso, 6 kg de adenosina – trifosfato (ATP) serão gastos (ABOZGUIA et al., 2009). Devido à alta demanda energética, é preciso que haja continuamente a produção de ATP, visto que o coração não possui reserva de energia (OPIE, 1969; OPIE, 1974; STANLEY, 2005; LOPASCHUK et al., 2010). Durante a embriogênese, a maior parte do ATP produzido para atender as necessidades dos cardiomiócitos provém da glicólise e da produção de lactato (LOPASCHUK et al., 2010). Uma vez maduras, essas células cardíacas encontrarão na oxidação dos ácidos graxos a maior

parte de energia requerida para seu funcionamento (STANLEY, 2005; LOPASCHUK et al., 2010).

O aporte energético cardíaco é mantido basicamente por três componentes: o primeiro, pela utilização dos substratos glicose ou ácido graxo, obtidos através do consumo alimentar e degradados através da glicólise e da β -oxidação, respectivamente (SCOLLETTA, BIAGIOLI, 2010); o segundo, fosforilação oxidativa, processo de produção de energia na cadeia respiratória mitocondrial (SCOLLETTA, BIAGIOLI, 2010), que envolve transferência de elétrons, consumo de O_2 e fosforilação de ADP em ATP (ROSCA, HOPPEL, 2010); e o terceiro, transporte de ATP para as miofibrilas, consideradas o “motor” cardíaco (SCOLLETTA, BIAGIOLI, 2010), através de creatina quinase que cataliza a transferência de fosfato do ATP para a creatina, e, por difusão facilitada, a isoforma desta enzima conduz fosfato de alta energia para a miofibrila (BESSMAN, GEIGER, 1981).

2.2 Desnutrição perinatal, período crítico do desenvolvimento

Estudos indicam que o organismo em desenvolvimento é passível de sofrer influências de fatores externos e vir a apresentar modificações bioquímicas e estruturais (MORGANE et al., 2002). Essa fase de susceptibilidade, em que ocorrem multiplicação e diferenciação celular, recebe a denominação de período crítico do desenvolvimento (DOBBING, SAND 1985; MORGANE et al., 2002).

Em humanos, o período de susceptibilidade no coração ocorre entre a terceira até a quinta semana de gestação e na segunda semana gestacional de camundongos (GARCIA-MARTINEZ, SCHOENWOLF, 1993; SADLER, 2000) e ratos (CARMO et al., 2004). Nesse período, a exposição a situações adversas tais como exposição a fármacos e desequilíbrio nutricional, exige do organismo uma série de adaptações necessárias à sobrevivência (HANSON, GLUCKMAN, 2005; PENALOZA, ARIAS-STELLA, 2007; PORRELLO, WIDDOP, 2008) como a diminuição na taxa de divisão celular, com possibilidade de alterar a “plasticidade” da estrutura e função dos sistemas orgânicos (BARKER, CLARK, 1997; DENNISON, FALL, 1997) ou mesmo a redistribuição de fluxo sanguíneo.

Esse fenômeno biológico pelo qual um estímulo, quando aplicado em fases críticas do desenvolvimento, pode levar a modificações permanentes na estrutura e função dos tecidos é conhecido como “plasticidade durante o desenvolvimento” ou “origem desenvolvimentista da saúde e da doença” (GLUCKMAN, HANSON, 2007).

Indivíduos mal nutridos no início da vida, onde o período de crescimento ocorre de forma acelerada, apresenta sérias mudanças nas quais o organismo poderá ajustar-se para sobreviver (GLUCKMAN, HANSON, 2004; HANSON, SCOGIN, 2008; HANSON, GLUCKMAN, 2008; HANSON, GODFREY, 2008; KUMON, et al., 2010). Sob tais condições, o organismo sacrifica o desenvolvimento de tecidos musculares e adiposos a fim de poupar danos ao sistema nervoso, como consequência, há redução da glicólise e também alteração dos receptores de insulina (OZANNE, HALES, 1999, 2002). Com o resultado desses ajustes, o corpo pode passar a apresentar resistência a esse hormônio (OZANNE, HALES, 1999, 2002). Estudos com humanos mostram que as mudanças provocadas durante o período crítico de desenvolvimento, devido à carência nutricional, podem provocar síndrome metabólica com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em idades mais avançadas (REMACLE, BIESWAL, 2011). Em avaliações realizadas por Barker et al (1989,1990 e 1993) e por HALES et al (1991) com homens e mulheres de Hertfordshire (no Reino Unido), nascidos no período de 1911 a 1932, demonstraram que aqueles que apresentavam baixo peso ao nascer exibiram maior prevalência quanto à hipertensão (BARKER et al.,1990), diabetes tipo 2 (HALES et al.,1991), síndrome metabólica (BARKER et al., 1993) e mortalidade por doenças cardiovasculares (BARKER et al., 1989), em relação as pessoas nascidas na mesma época com peso normal.

Estudo tem mostrado que a restrição proteica durante o período crítico de desenvolvimento altera o metabolismo cardíaco, aumentando os componentes glicolíticos (TAPPIA et al. 2013).

2.3 Treinamento Físico

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO) (2011), as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo. Em 2008, cerca de 17 milhões de pessoas vieram a óbito devido a complicações cardíacas (WHO, 2011). Contudo, a prática regular de atividade física tem sido recomendada ou utilizada para a prevenção e tratamento de vários tipos de doenças cardíacas (PATE et al., 1995; ERIKSSON, TAIMELA, KOIVISTO, 1997; FLETCHER et al., 2001; WHELTON et al., 2002), com o objetivo de tornar o sistema cardiovascular mais eficiente (LOIMAALA et al., 2003).

Atividade física é qualquer movimento corporal produzido pela contração músculo-esquelético que resulte em gasto energético (CASPERSEN, POWELL, CHRISTENSON, 1985). Embora o exercício físico também leve a gasto energético, eles não são sinônimos (CASPERSEN, POWELL, CHRISTENSON, 1985). Quando a atividade física passa a ser com intensidade e tempo controlados, então denominamos exercício físico (POLLOCK, 1973). Quando o exercício físico é realizado de forma sistemática é referido como treinamento físico, podendo ser classificado como leve, moderado e intenso (POLLOCK, 1973). A literatura relata que o treinamento físico moderado está associado à melhoria da capacidade física e ao aumento do metabolismo oxidativo (BRUM, et al., 2004). Em ratos que foram submetidos à lactação, a resposta crônica do treinamento físico leva à redução da frequência cardíaca, o que é benéfico ao coração (NEGRÃO, et al., 1992; MEDEIROS, et al., 2004), já que a taquicardia, na maioria das vezes, está relacionada ao desenvolvimento de cardiopatias (SECCARECIA, MENOTTI, 1992).

A prática do treinamento físico aeróbico estimula a formação de sarcômeros do miocárdio e a síntese de proteínas que têm por função melhorar a atividade contrátil do coração (STUEWE et al, 2000). Essas adaptações servem para aumentar a força máxima do miocárdio como também melhora a capacidade de consumo de energia pelo coração tornando-o mais econômico (STUEWE et al, 2000).

Com o treinamento físico de intensidade moderada e de longa duração, ocorre o estímulo para o aumento da capacidade oxidativa no músculo (ZONDERLAND et al., 1999). Essas mudanças, provavelmente, são reflexos de alterações que ocorrem nos substratos e nas enzimas, como a fosfofrutoquinase, envolvida nas reações de oxidação da glicose (ZONDERLAND et al., 1999).

Embora a literatura evidencie os malefícios que o indivíduo adulto pode vir apresentar devido à desnutrição perinatal, pouco se sabe a respeito dos efeitos que a restrição protéica poderá provocar no metabolismo cardíaco. Visto a importância do assunto, este trabalho pretende ainda investigar como atuará bioquimicamente o treinamento físico moderado em ratos que sofreram restrição proteica durante a gestação e a lactação.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos da desnutrição protéica perinatal e do treinamento físico moderado na vida adulta sobre o metabolismo cardíaco em ratos adultos.

3.2 Específicos

Avaliar, no coração, o efeito da desnutrição protéica perinatal e do treinamento físico moderado sobre a atividade cinética das seguintes enzimas:

- 1) Fosfofrutoquinase (PFK);
- 2) β -hidroaxil-CoA desidrogenase (β -HAD);
- 3) Citrato sintase (CS);
- 4) Glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH);
- 5) Ácido graxo sintase.

4. MÉTODOS

4.1 Animais e formação dos grupos experimentais

Foram utilizados ratos machos albinos da linhagem *Wistar* provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em sala com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo claro-escuro invertido de 12/12h (luz das 17:00 h às 05:00 h) e com livre acesso à alimentação e à água.

Para obtenção de neonatos, foram acasalados animais machos e fêmeas nulíparas (proporção 1:2), com idade entre 90 e 120 dias e com peso entre 220 e 260 g. A gestação foi determinada pela técnica de esfregaço vaginal. Esta consiste na coleta da secreção vaginal para verificar a presença de espermatozóides (MARCONDES, BIANCHI, TANNO, 2002). Uma vez detectado o estado de prenhez, as ratas foram acomodadas individualmente em gaiolas de polipropileno com dimensão de 46x32x21 cm, recebendo dieta à base de caseína para formação de dois grupos experimentais: Controle (C: caseína 17%) e Desnutrido (D: caseína 8%) (PASSOS, RAMOS, MOURA, 2000).

Durante a lactação, as mães receberam dieta à base de caseína. Após o desmame, aos 21 dias de vida, somente os filhotes machos foram utilizados no experimento. Estes passaram a receber LABINA. Aos 60 dias de vida, os animais foram subdivididos em quatro grupos de acordo com a prática ou não de treinamento físico: Controle (C), caseína 17%; Desnutrido (D), caseína 8%; Treinado (T), caseína 17%; Desnutrido Treinado (DT), caseína 8% (Fig. 1).

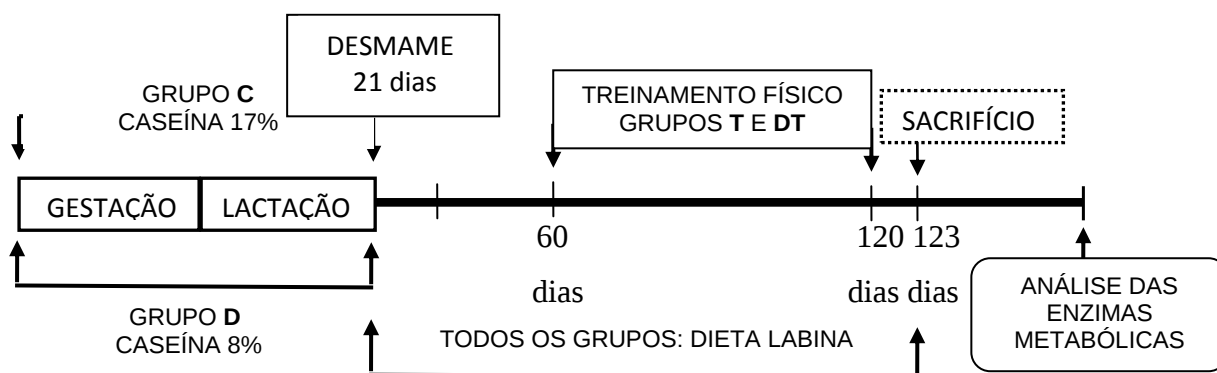


Figura 1. Desenho experimental representando a formação dos diferentes grupos (controle, desnutrido, treinado e desnutrido treinado) quanto à manipulação da dieta e do treinamento físico, e o período em que foram sacrificados.

Os procedimentos realizados para manejo e cuidado dos animais estão de acordo com as normas do Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas – UFPE sob o número de protocolo 23076.016335/2012-11.

4.2 Manipulação da dieta

Durante a gestação e a lactação, as ratas do grupo controle (C) receberam dieta normoprotéica a base de caseína a 17%, enquanto as ratas do grupo desnutrido (D) receberam dieta hipoprotéica a base de caseína a 8% (Tabela 1). A caseína utilizada possuía 85% de pureza. Após o desmame, os animais receberam dieta de biotério: LABINA. (Tabela 2).

Tabela 1: Composição das dietas (8% e 17% de proteína).

Ingredientes	1 Kg de Ração	
	8 %	17%
Caseína	79,3 g	179,3 g
Mix vitamínico*	10 g	10 g
Mix mineral #	35 g	35 g
Celulose	50 g	50 g
Bitartarato de colina	2,5 g	2,5 g
DL-Metionina	3,0 g	3,0 g
Óleo de soja	70 ml	70 ml
Amido de milho	750,2 g	650,2 g

* Mix vitamínico contendo (mg/kg de dieta): retinol, 12; colecalciferol, 0.125; tiamina, 40; riboflavina 30; ácido pantotênico, 140; piridoxina, 20; inositol, 300; cyanocobalamin, 0.1; menadiona, 80; ácido nicotínico, 200; colina, 2720; ácido fólico, 10; ácido p-aminobenzoico, 100; biotina, 0.6.

Mix mineral contendo (mg/kg de dieta): CaHPO_4 , 17200; KCl, 4000; NaCl, 4000; MgO, 420; MgSO_4 , 2000; Fe_2O_3 , 120; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 98; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 20; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 80; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.16; KI, 0.32.

Fonte: REEVES, NIELSEN, 1993.

Tabela 2: Composição dos nutrientes da dieta LABINA (Purina Brasil) utilizada na alimentação dos animais após o desmame.

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

* Composicao basica: milho, farelo de trigo, farelo de soja, farinha de carne, farelo de arroz cru, carbonato de calcio, fosfato de bicalcico, sal, pre-mix.

Fonte: PURINA BRASIL

4.3 Protocolo de treinamento físico

Os animais dos grupos treinado e desnutrido treinado foram submetidos a um programa de treino físico moderado, em esteira Motorizada EP-131/Insight Equipamentos Ltda (Figura 2) e seguiram o seguinte protocolo experimental : 8 semanas, 5 dias/semana e 60 min/dia a 70% do $VO_{2máx}$. (Figura 3); (Tabela 03) (LEANDRO et al., 2007).



Figura2. Esteira motorizada (Treadmill: Millenium – Imbramed). Fonte: LEANDRO et al., 2007.

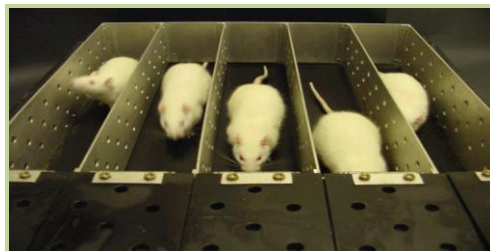


Figura 3: Animais em treinamento físico moderado.

De acordo com o protocolo utilizado, a intensidade inicial do treino foi leve e aumentada progressivamente a cada semana até atingir 70% de $VO_{2máx}$, sendo mantida até o fim do programa de treinamento. Para isso foram manipulados a velocidade, a inclinação da esteira e o tempo de treinamento. A primeira semana de treinamento foi dedicada à adaptação dos animais, assim a esteira funcionou em baixa velocidade, sendo 20 minutos/dia. Na segunda semana, o treinamento durou 50 minutos/dia. A partir da terceira semana, o treinamento assumiu duração de 60 minutos/dia. O treinamento era dividido em quatro fases:

aquecimento (5min), intermediária (20min) que pode ser subdividida em duas etapas de 10 minutos com velocidades diferentes, treino (30min) e desaceleração (5min). Somente na fase de treino foi atingido 70% do $VO_{2\text{máx}}$ (Figura 4).

Semanas	Velocidade (km/h)	Inclinação (°)	Duração (min)
1ª Semana (Adaptação)	0.3	0	5
	0.4	0	5
	0.5	0	5
	0.3	0	5
2ª Semana	0.4	0	5
	0.5	0	10
	0.6	0	30
	0.4	0	5
3ª Semana	0.5	0	5
	0.6	0	10
	0.8	0	10
	0.9	0	30
	0.5	0	5
4ª Semana	0.5	0	5
	0.8	0	10
	0.9	0	10
	1.1	0	30
	0.5	0	5
5ª Semana	0.5	5	5
	0.8	5	10
	0.9	5	10
	1.1	5	30
	0.5	0	5
6ª Semana	0.5	10	5
	0.8	10	10
	0.9	10	10
	1.1	10	30
	0.5	0	5
7ª Semana	0.5	10	5
	0.8	10	10
	0.9	10	10
	1.1	10	30
	0.5	0	5
8ª Semana	0.5	10	5
	0.8	10	10
	0.9	10	10
	1.1	10	30
	0,5	0	5

Figura 4: Protocolo de treinamento físico de acordo com a velocidade, inclinação e duração de cada sessão das oito semanas de treinamento. Fonte: LEANDRO et al., 2007.

4.4 Coleta dos tecidos

Aos 123 dias de vida, os animais foram sacrificados por decapitação, e o coração foi retirado e mantido a -80°C. Posteriormente, foram feitas as análises bioquímicas.

4.5 Análises bioquímicas

4.5.1 Preparo do homogeneizado do tecido cardíaco para utilização nas técnicas bioquímicas.

O coração foi homogeneizado em tampão de extração (Tris base 50 mM, pH 7,4; água destilada q.s.p. 10ml, com adição de inibidores de protease constituídos por EDTA 1mM, fluoreto de fenil metil sulfonila 2 mM, ortovanadato 1mM, AEBSF 2mM, acrotinina 0.3 µM, leupeptina 1 µM, E-64 e Bestatin 130 µM que são inibidores de protease). Após a homogenização, as amostras foram centrifugadas a 1.200 rpm, a 4° C, por 20 minutos e os sobrenadantes foram submetidos à quantificação de proteína.

4.5.2 Dosagem de proteína

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

Em seguida, foram realizadas as análises da atividade cinética das enzimas. As enzimas estudadas nesse trabalho foram analisadas no espectrofluorímetro FLUORStar, Omega, USA.

4.5.3 Determinação da atividade cinética da fosfofrutoquinase (E.C. 2.7.1.11)

A fosfofrutoquinase (PFK) catalisa a reação de conversão da frutose 6-fosfato em frutose 1,6-bifosfato utilizando ATP nessa reação. A atividade máxima da enzima foi avaliada pelo método descrito por Opie, Newsholme (1967). O sistema de reação enzimático contém 50mM Imidazol, 6 mM $MgCl_2$, 0,4 mM NADH, 5mM ATP, glicose-fosfato-desidrogenase, triose fosfato isomerase 5 μ g, glicerofosfato 5 μ g e aldolase 50 μ g, a cada 25 ml de tampão. O ensaio foi iniciado pela adição de 20mM frutose-6-fosfato. A determinação enzimática foi realizada a 25°C, a 340 nm.

4.5.4 Determinação da atividade cinética da β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (β -HAD) (E.C. 1.1.1.35)

A β -HAD catalisa a terceira reação no processo da beta-oxidação dos lipídios. A atividade máxima foi avaliada pelo método descrito por Civitarese, Carling, Heilbronn et al. (2007). O sistema de reação enzimático contém 0.1 M trietanolamina-HCl, 5 mM EDTA, 0,45 mM NADH, pH 7,0 A reação foi iniciada com a adição do substrato (0,1 mM acetoacetyl-CoA). A atividade enzimática foi determinada a 340nm, a 37°C.

4.5.5 Determinação da atividade cinética da citrato sintase (E.C. 1.1.1.49)

A citrato sintase é uma enzima importante do ciclo de Krebs, pois catalisa a entrada de carbono neste ciclo. A enzima catalisa a reação: oxaloacetato + acetyl-CoA + H_2O gerando citrato + CoA + H^+ .

A atividade máxima da enzima foi determinada segundo Alp et al. (1976) a partir da quantificação do complexo formado entre a CoA liberada com o DTNB do meio. O tampão utilizado consistiu de 1M Tris-HCL, 1 mM DTNB, 0,1 mM acetyl CoA, 10 mM oxaloacetato e Triton X-100 10% (v/v) pH 8,1. A reação foi iniciada pela adição de 10mM oxaloacetato. A atividade enzimática foi determinada à 412 nm, por 5 min a 25°C.

4.5.6 Determinação da Atividade Cinética da Ácido graxo sintase (E.C. 2.3.1.85)

Ácido graxo sintase é um sistema enzimático com função de sintetizar ácidos graxos. Segundo método de Cadon, Hammes (1982) modificado, cada reação consistiu de 90 mM de fosfato de potássio, pH 7.0, 0,1 mM de acetil-CoA, 0,2mM de NADPH, 0,18mM de EDTA. A reação foi iniciada pela adição de 0,2mM malonil-CoA. A atividade da enzima foi medida seguindo a diminuição na absorbância a 340 nm, 25 °C, resultante da oxidação de NADPH.

4.5.7 Determinação da atividade cinética da Glicose 6-fosfato desidrogenase (E.C. 1.1.1.49)

A glicose 6-fosfato desidrogenase é uma enzima importante do ciclo das Pentoses. É responsável por catalisar a reação de oxidação irreversível da glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconolactona, em uma reação que usa o NADP^+ como coenzima e forma o NADPH que pode ser utilizado por outras reações celulares. A atividade máxima foi realizada pelo método de Löhr, Waller (1974). O ensaio foi composto por tampão (50mM Tris, 1mM EDTA, 5mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1ml de água destilada e pH acertado para 8,0 com HCL); 0,5mM de NADP^+ , e 1,2mM glicose 6- fosfato responsável por iniciar a reação. A atividade enzimática foi determinada à 340 nm, a 25°C.

4.6 Análise estatística

Os valores foram expressos em Média e Erro Padrão da Média ($X \pm \text{EPM}$). Para a avaliação da atividade cinética das enzimas, foi utilizado o teste ANOVA one-away, seguido do teste Bonferroni, para os dados paramétricos. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns para os dados não-paramétricos. O nível de significância foi mantido em 5%. Toda a análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 para Windows.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estão presentes sob a forma de artigo original submetido à revista *Applied Physiology Metabolism and Nutrition* (Qualis B1).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo evidencia semelhanças entre desnutrição e treinamento físico quanto à atuação isolada desses fatores nas modificações ou não nas atividades enzimáticas analisadas. Tais efeitos em comum podem ser devido ao estresse patológico sofrido pelo coração desnutrido e pelo estresse fisiológico sofrido pelo coração treinado.

A diferença do tipo de estresse pode indicar que o coração desnutrido e o coração treinado estão sendo submetidos a diferentes modificações que podem ser histológicas, por exemplo. Isso é percebido quando se observa os dados dos animais desnutridos que foram treinados posteriormente e se verifica que não houve um maior aumento e redução nas enzimas que tiveram suas atividades aumentadas e diminuídas, respectivamente. Pelo contrário, nota-se a tendência das atividades de PFK e CS estarem mais próximas dos valores dos animais controle. Portanto, o treinamento físico utilizado nesse estudo induz alterações metabólicas no coração patológico, mesmo sendo de forma sutil.

Por fim, outras investigações metabólicas, como atividade de lactato desidrogenase e quantidade de ATP produzida na fosforilação oxidativa, poderiam ser feitas. O que enriqueceria ainda mais os pontos já aqui discutidos.

REFERÊNCIAS

- 1.ABOZGUIA K, et al. The heart metabolism: pathophysiological aspects in ischaemia and heart failure.Curr Pharm Des, v.15, n.8, p.827-35. 2009.
- 2.ALP, P. R., NEWSHOLME, E. A., ZAMMIT, V. A. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. Biochem J, Mar 15, v. 154, n. 3, p. 689-700. 1976.
- 3.BARKER, D. J., OSMOND, C., GOLDING, J., et al. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. BMJ, v. 298, n. 6673, p. 564-7, Mar. 1989.
- 4.BARKER, D.J., BULL, A.R., OSMOND, C. et al. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. BMJ, v.301,n.6746, Aug, p.259-62.1990.
- 5.BARKER, D. J. The intrauterine origins of cardiovascular disease. Acta Paediatr Suppl, v.82 Suppl 391, Sep, p.93-9. 1993.
- 6.BESSMAN, S.P., GEIGER, P.J. Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. Science.v.211,n.4481, Jan, p. 448-52.1981. Review.
- 7.BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem, v. 72, p.248-54. 1976.
- 8.BRUM, P.C., et al. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. Revista Paulista Educ. Física, São Paulo, v.18, p.21-31, ago. 2004.
- 9.BUCKINGHAM, M., MEILHAC, S., ZAFFRAN, S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. Nat Rev Genet, v.6, n.11, Nov, p.826-35.2005.
- 10.BURGGREN, W.W. What is the purpose of the embryonic heart beat? Or how facts can ultimately prevail over physiological dogma. Physiol Biochem Zool,May-Jun, v.77,n.3,p.333-45.2004.
- 11.CARDONT, J. W., HAMMES, G. G. Investigation of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate and Acyl-Binding Sites on Avian Fatty Acid Synthase? Biochemistry,v.21,n.2863,p. 2863-70.1982.
- 12.CASPERSEN, C.J.,POWELL, K.E.,CHRISTENSON, G.M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. Public Health Rep,v.100,n.2,Mar-Apr,p.126-31.1985.
- 13.CHEN, F., DIEGO, C., CHANG, M.G., et al. Atrioventricular Conduction and Arrhythmias at the Initiation of Beating in Embryonic Mouse Hearts. Dev Dyn, v.239,n.7, July, p. 1941–49.2010.
- 14.CARMO, J. C., PETERS, V. M., GUERRA, M. O. Cronologia do desenvolvimento embrionário e fetal de ratos, conforme a datação do início da prenhez. Boletim do Centro de Biologia da Reprodução de Juiz de Fora-MG, v. 23, p. 5- 16. 2004.
- 15.CIVITARESE, A.E., et al. Calorie Restriction Increases Muscle Mitochondrial Biogenesis in Healthy Humans. Plos clinal Trials, v. 4, n.3, p.485-94. 2007.
- 16.DENNISON, E., et al. Prenatal factors influencing long-term outcome. Horm Res, v.48 Suppl 1, p.25-9. 1997.
- 17.DOBHING, J., SANDS,J. Cell size and cell number in tissue growth and development. An old
- 18.DRENCKHAHN, J.D. Growth plasticity of the embryonic and fetal heart. Bioessays , Dec, v.31, n.12. p.1288-98.2009.

- 19.ERIKSSON J, TAIMELA S, KOIVISTO VA. Exercise and the metabolic syndrome. *Diabetologia*, v.40,p.125-35. 1997.
- 20.FLETCHER, G.F. et al. Exercise standards for testing and training: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*, v.104, p.1694-1740. 2001.
- 21.FOROUHAR, A.S., LIEBLING, M., HICKERSON, A. The embryonic vertebrate heart tube is a dynamic suction pump. *Science*. v.312,n.5774,May,p.751-3.2006.
- 22.GARCIA-MARTINEZ, V., SCHOENWOLF, G. C. Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos. *Dev Biol*, v.159, n.2, Oct, p.706-19. 1993.
- 23.GLUCKMAN, P. D., HANSON, M. A.. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science*, v.305, n.5691, Sep 17, p.1733-6. 2004.
- 24.GLUCKMAN, P.D., HANSON, M.A. Developmental plasticity and human disease: research directions.*J Intern Med*, v.261, n.5, May, p.461-71. 2007. Review.
- 25.GRANADOS-RIVERON, J. T., BROOK,J. D. Formation, Contraction, and Mechanotransduction of Myofibrils in Cardiac Development: Clues from Genetics. *Biochem Res Int*, Jun, v.10,2012. Review.
- 26.GUPTA, R. Recent trends in coronary heart disease epidemiology in India. *Indian Heart J*, v. 60, n. 2, Suppl B, p. B4-18, Mar-Apr. 2008.
- 27.HALES, C.N.,BARKER, D.J.,CLARCK, P.M., et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ*, v.303,p. 1019–22. 1991.
- 28.HANSON, M. A., GLUCKMAN, P. D. Developmental processes and the induction of cardiovascular function: conceptual aspects. *J Physiol*, v.565, n.Pt 1, May 15, p.27-34. 2005.
- 29.HANSON, M. A., et al. A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human beta2-adrenergic receptor. *Structure*, v.16, n.6, Jun, p.897-905. 2008.
- 30.HANSON, M. A., GODFREY, K. M.. Commentary: Maternal constraint is a pre-eminent regulator of fetal growth. *Int J Epidemiol*, v.37, n.2, Apr, p.252-4. 2008.
- 31.HANSON, A. E., SCOGIN, F. Older adults' acceptance of psychological, pharmacological, and combination treatments for geriatric depression. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*, v.63, n.4, Jul, p.245-P248. 2008.
- 32.HOLNESS, M.J., PRIESTMAN, D.A., SUGDEN, M.C.Impact of protein restriction on the carboxykinase in white muscle and red muscle. *Biochem.J*, v.103,p.391-99.1998.
- 33.IVANOVIC, D.; CASTRO, C. G.; IVANOVIC, R. Food and nutrition knowledge of elementary and high school-age children from Chile's Metropolitan Region. *Rev Med Chil*, v. 124, n. 9, Sep. p. 1058-70. 1996.
- 34.KUMON, M., et al. Maternal dietary restriction during lactation influences postnatal growth and behavior in the offspring of mice. *Neurochem Int*, v.57, n.1, Aug, p.43-50. 2010.
- 35.LANGLEY-EVANS, S. C., McMullen, S. Developmental Origins of Adult Disease. *Med Princ Pract*.v.19, p.87–98.2010.
- 36.LEANDRO, C. G., et al. A program of moderate physical training for *Wistar* rats based on maximal oxygen consumption. *J Strength Cond Res*, v.21, n.3, Aug, p.751-6. 2007.
- 37.LOBSTEIN, D. D., MOSBACHER, B. J., ISMAIL, A. H. Depression as a powerful discriminator between physically active and sedentary middle-age men. *Journal of Psychosomatic Research*, v.27, n.1, p. 69-76, 1973.
- 38.LOHR, G.W., WALLER, H.D. Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. IN *Methods of Enzymatic Analysis*. H.U. Bergmeyer, Editor, Academic press, New York, p. 636, 1974.

- 39.LOIMAALA, A., HUIKURI, H.V., KÖÖBI, T., et al. Exercise training improves baroreflex sensitivity in type 2 diabetes. *Diabetes*, Jul, v.52, n^o 7, p.1837-42. 2003.
- 40.LOPASCHUK, G.D.,USSHER, J.R.,FOLMES, C.D. et al. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*, Jan, v.90, n.1, p.207-58.2010.Review.
- 41.MARCONDES, F. K., BIANCHI, F. J., TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol, Nov*, v. 62, São Carlos. 2002.
- 42.MEDEIROS, A., et al. Swimming training increases cardiac vagal effect and induces cardiac hypertrophy in rats. *Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto. 2004.
- 43.MOORE, L.K., PERSAUD, T.V.N. *Embriologia Clínica*. São Paulo: Elsevier.2008.
- 44.MOORMAN, A.F., CHRISTOFFELS, V.M. Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiol Ver*, v.83,n.4,Oct,p.1223-67. 2003.Review.
- 45.MORGANE, P. J., et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev*, v.17, n.1, Spring, p.91-128. 1993.
- 46.MORGANE, P. J. et al. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 26, n. 4, Jun, p. 471-83. 2002.
- 47.NAKAJIMA, K., INAGAWA, M., UCHIDA,C. Coordinated regulation of differentiation and proliferation of embryonic cardiomyocytes by a jumonji (Jarid2)-cyclin D1 pathway. *Development*, v.138,n.9,May,p.1771-82.2011.
- 48.NEGRÃO, C.E., et al. Vagal function impairment after exercise training. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, v.72, n.5, p.1749-53, 1992b.
- 49.NOBACK, C.R., EISENMAN, L.M. Some effects of protein-calorie undernutrition on the developing central nervous system of the rat. *Anat Rec.* , v.201, n.1, Sep. p.67-73.1981.
- 50..OKEN, E.; GILLMAN, M. W. Fetal origins of obesity. *Obes Res*, v. 11, n. 4, p. 496-506. Apr 2003.
- 51.OPIE, L.H. Metabolism of the heart in health and disease. II. *Am Heart J*, Jan,v.77,n.1,p.100-22.1969.
- 52.OPIE, L.H. Myocardial energy metabolism. *Adv Cardiol*,v.12, n.0, p.70-83.1974.
- 53.OPIE, L.H., NEWSHOLME, E. A. The activities of fructose 1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in white muscle and red muscle. *Biochem.J.* v. 103, n.39, p. 391-99. 1967.
- 54.OSBORNE, G. L. et al. Relationships between cardiac dimensions, anthropometric characteristics and maximal aerobic power (vo_{2max}) in young men. *Int J Sports Med*, v.13, n.3, Apr, p. 219-24. 1992.
- 55.OZANNE, S.E.; HALES, C.N. The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*, Cambridge, v.58, p.615-9. 1999.
- 56.OZANNE, S.E., HALES, C.N. Pre- and early post-natal non-genetic determinants of type 2 diabetes. *Expert Review in Molecular Medicine*, (in the Press). 2002.
- 57.PASSOS, M. C. F., RAMOS, C. F., MOURA, E. G. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutrition Research*, v.20, n.11, p.1603-12. 2000.
- 58.PATE, R.R., et al. Physical activity and public health: a recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. *JAMA*, v. 273,p.402-7. 1995.

- 59.PELLICCIA, A. F. et al. Physiologic left ventricular cavity dilatation in elite athletes. *Ann Intern Med*, v.130, n.1, Jan 5, p.23-31. 1999.
- 60.PENALOZA, D., ARIAS-STELLA, J. The heart and pulmonary circulation at high altitudes: healthy highlanders and chronic mountain sickness. *Circulation*, v.115, n.9, Mar 6, p.1132-46. 2007.
- 61.PHILLIPS, D. I. Fetal growth and programming of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 28, n. 11, p. 967-70, Nov 2001.
- 62.POLLOCK, M.. L. The Quantification of Endurance Training Programs. *Exercise & Sport Sciences Reviews*. January V. 1, n. 1,p.155-188, Jan.1973.
- 63.PORRELLO, E. R., WIDDOP, R. E., DELBRIDGE, L. M. Early origins of cardiac hypertrophy: does cardiomyocyte attrition programme for pathological 'catch-up' growth of the heart? *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v.35, n.11, Nov, p.1358-64. 2008.
- 64.REMACLE, C., BIESWAL, F. BOL, V. REUSENS, B. Developmental programming of adult obesity and cardiovascular disease in rodents by maternal nutrition imbalance. *Am J Clin Nutr* , v.94,suppl 1, p.1846-52. 2011.
- 65.REEVES, P. G., NIELSEN, F. H. FAHEY JUNIOR, G. C.. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, v.123, n.11, Nov, p.1939-51. 1993.
- 66.ROSCA, M.G., HOPPEL, C.L. Mitochondria in heart failure.*Cardiovasc Res*.v.88,n.1,Oct, p.40-50.2010.Review.
- 67.SADLER, T. W. Susceptible periods during embryogenesis of the heart and endocrine glands. *Environ Health Perspect*, v.108 Suppl 3, Jun, p.555-61. 2000.
- 68.SADLER, T.W. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and heart defects: potential mechanisms for the observed associations. *Reprod Toxicol* , Dec, v.32, n.4, p.484-9. 2011.
- 69.SAIKI,Y.,KONIG, A., WADDELL, J. Hemodynamic alteration by fetal surgery accelerates myocyte proliferation in fetal guinea pig hearts. *Surgery*, v.122,n.2, Aug.p.412-9.1997.
- 70.SALTIN, B., NAZAR K, COSTILL D.L. et al. The nature of the training response: peripheral and central adaptations to one-legged exercise. *Actaphysiol*, v.96, p.289-305.1978.
- 71.SAWAYA, A. L. et al. "Obesity and Malnutrition in a Shantytown Population in the City of São Paulo, Brazil". *Obesity Research*, v.3, suppl. 2, p. 107-15. 1995.
- 72.SAWAYA, A. L. et al. Os dois Brasis: quem são, onde estão e como vivem os pobres brasileiros. *Estud. Av.*, v.17, n.48, May/Aug. São Paulo. 2003.
- 73.SCOLLETTA, S., BIAGIOLI, B. Energetic myocardial metabolism and oxidative stress: let's make them our friends in the fight against heart failure. *Biomed Pharmacother*, Mar, v.64,n.3, p.203-7.2010.
- 74.SECCARECCIA, F., MENOTTI, A. Physical activity, physical fitness and mortality in a sample of middle aged men followed-up 25 years. *Journal of Sports Medicine Physical Fitness*, Turin, v.32, n.2, p.206-13. 1992.
- 75.SEDMERA,D., MCQUINN,T. Embryogenesis of the heart muscle. *Heart Fail Clin*, v.4,n.3,July,p. 235-45.2008.Review.
- 76.SEDMERA,D., HU, N., WEISS KM. et al. Cellular changes in experimental left heart hypoplasia. *Anat Rec*, v.267,n.2,Jun,p.137-45.2002.
- 77.SCHRAMM, J. M. D. A. et al. Transição epidemiológica e o estudo de carga de doença no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*,v. 9, n. 4, p. 897-908. 2004.

78.STANLEY, W. C., RECCHIA, F. A., LOPASCHUK, G. D. Myocardial substrate metabolism in the normal e failing heart. *Physiol.v.85,p.1093-129. 2005.Review.*

79.STUEWE, S. R., et al. Exercise training enhances glycolytic and oxidative enzymes in canine ventricular myocardium.*J Mol Cell Cardiol,v.32,n.6,Jun,p.903-13.2000.*

80.TAPPIA, P.S., et al. Adverse cardiac remodeling due to maternal low protein diet is associated with alterations in expression of genes regulation glucose metabolism. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases. v.23, p.130-135. 2013.*

80.ZONDERLAND, N. L., et al. Different metabolic adaptation of heart and skeletal muscles to moderate intensity treadmill training in the rat. *European Journal of Applied Physiology, Berlin, v.79, p.391-396, 1999.*

81.WHELTON, S.P., et al. Effect of aerobic exercise on blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Intern Med, v.136, p.493-503.2002.*

82.WHO, W.H.O.Global status report on noncommunicable disaeses 2010. Geneva, World Health Organization, 2011.

APÊNDICE - ARTIGO

Title: Effect of moderate physical training on the changes induced perinatal protein undernutrition: evaluate of cardiac metabolism in adults rats

Running title: Maternal malnutrition and moderate physical training on cardiac metabolism.

Authors:

Michelly D. P. Barreto^{a,b#}, Anderson A. da S. Pedroza^b, Cristiane M. Freitas^b, Déborah S. Carthagenes M.^{a,b}, Wylla T. F. e Silva^{a,b}, Mariana P. Fernandes^b, Cláudia J. Lagranha^b

^aGraduate Program in Pathology- Federal University of Pernambuco (UFPE)

^b Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry, Academic Center of Vitoria-UFPE

#Mailing address:

Michelly D. P. Barreto

Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária - CEP: 50670-901- Graduate Program in Pathology, Recife, Pernambuco, Brasil

E-mail : michelly.paes@gmail.com

Phone/fax: 550418121268529

ABSTRACT

This study had the intention of evaluate the heart metabolism using experimental animals that were malnourished in the critical period development and after were trained chronically in moderate intensity. Pregnant rats were divided in two groups: Control (C), 17% casein diet, and undernutrition (U), 8% casein diet. The low-protein diet was maintained during the gestation and lactation. After the weaning, only male rats were used in the experiment and fed by Labina. At the age of 60 days of birth, the animals were divided according to physical training: Control (C), undernutrition (U), trained (T) and undernutrition trained (UT). The training protocol was carried-on in treadmill (5 weekly sessions of 60 minutes per 8 weeks at 70% of VO_{2max}). The analysis of the enzymes activity was performed according specific reference for each enzyme. In PFK, U group (10.13 ± 2.52) had higher enzymatic activity than C group (2.25 ± 0.39), T group (29.87 ± 5.07) show higher activity than C, UT group (4.42 ± 0.98) had smaller enzymatic activity than T group. In CS, U (1.85 ± 0.36) show smaller enzymatic activity than C (3.96 ± 0.78), T (1.47 ± 0.42) had also reduced activity than C. In FAS, U (35.91 ± 7.11) had greater activity than C (15.46 ± 1.40), T (52.39 ± 9.30) had also higher activity than C. β -HAD and G6PDH didn't observe difference between groups. The enzymatic alteration in sedentary undernutrition rats were the same in normonutrition trained rats. The trained physical in undernutrition rats can induce alteration in cardiac metabolism.

Key words cardiac metabolism; enzymes; perinatal undernutrition; physical training; rats; treadmill

INTRODUCTION

The heart is the organ that has a higher demand for energy (Scolleta and Biagioli 2010) and it hasn't energy reserves, so is necessary continuous production of adenosine triphosphate (ATP) (Opie,1974, 1969; Stanley et al. 2005; Lopaschuk et al.2010). The adult heart obtain ATP main through fatty acid oxidation (Taegtmeyer 1994). However, glucose and lactate are also source of ATP to this organ (Gavete et al. 2002). The oxidative pentose phosphate pathway is present in the heart and it is provides nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) which can be used for synthesis of free fatty acids (Eggleston and Krebs 1974) and to detoxification of reactive oxygen species (Zimmer and Ibel 1984).

Studies show that heart diseases can begin in uterine life (Hanson et al.. 2008; Hanson and Gluckman 2005; Remacle et al. 2004; Barker 1995,1993). Thus, organism during the gestation can suffer biochemistry and structural changes by external factors (Morgane 2002) as malnutrition (Remacle et al. 2011, 2004). Hales et al. (1991) and Barker et al. (1989) analyze people at mean 64 years old that were born in Hertfordshire during 1920 to 1930 and they conclude that death for cardiac ischemia is more frequent in people than were born with low weight than normal weight. Studies with rats and human show that malnutrition during critical period of development can induce metabolic syndrome showing that there is a tight correlation between perinatal undernutrition and the development of cardiovascular diseases in adults (Remacle et al. 2011; Bol et al. 2010; Bieswal et al. 2006; Remacle et al. 2004). Studies from our laboratory also showed that undernutrition during developmental period induce alteration in redox state in offspring rat hearts (Nascimento et al. unpublished data). Previous work had shown that protein restriction during critical period of development changes cardiac metabolism (Tappia et al. 2013; Holness et al. 1998).

On the other hand, it is well known that physical inactivity is a main risk factor for coronary disease, and it is recognized that aerobic physical exercise has been recommended to prevention and treatment of cardiovascular diseases (Whelton et al. 2002; Fletcher et al. 2001; Eriksson and Taimela 1997; Pate et al. 1995). The physical training induces the formation of cardiac sarcomeres (Stuewe et al. 2000) making the cardiovascular system more efficient (Loimaala et al. 2003).

MATERIALS AND METHODS

The experimental protocol was approved by the Ethical Committee of the Biological Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Brazil and followed the *Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animal* 23076.016335/2012-11.

Virgin female and male albino *Wistar* rats aged between 90 and 120 days and weighting between 240 and 260 g were obtained from the Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Brazil and they were mated.

Once detected gestation, female rats were housed in individual cages and they were divided in two groups: a group received 17 % casein diet, control group (C), and other group received 8 % casein diet, undernutrition group (U) (Table 1). The female rats received these diets during gestation and lactation.

After weaning, only male animals were used in the experiment and were fed by Labina (standard diet). At the age of 60 days of birth, the animals were further divided according to physical training in moderate intensity: Control (C), undernutrition (U), trained (T) and undernutrition trained (UT).

The physical training in moderate intensity followed Leandro et al. (2007) protocol (Figure 1). The experimental protocol was carried-on in treadmill (5 weekly sessions of 60 minutes per 8 weeks at 70% of VO_{2max}). To achieve the VO_{2max} intended, the

velocity, the incline of the treadmill and the exercise time were manipulated according to previous studies.

Around age of 120 days, the animals were sacrificed by decapitation, the heart was removed and storage in freezer -80°C. We used 4 to 7 animals per group. Posteriorly, the tissues were homogenized in extraction buffer (Tris base 50 mM, pH 7.4; distilled water q.s.p. 10ml, EDTA 1mM and addition protease inhibitors). Then, they were centrifuged (at 1.200 rpm, 4° C, during 20 minutes) and the protein quantitation was conducted in the supernatants.

The protein quantitation was measured by Bradford' method (1976). This method determines concentration of protein in the sample analyzed and was used bovine serum albumin (BSA) as standard at 595nm. After protein determination was quantified the enzymatic activity. The five enzymes were analyzed in the spectrofluorometer FLUORStar, Omega, USA.

Assay of phosphofructokinase (PFK) (E.C. 2.7.1.11)

PFK was usually assayed on the crude extract by a modification method Opie and Newsholme (1967). The enzymatic reaction system consisted of 50 mM Imidazole, 6 mM MgCl₂, 0,4 mM NADH, 5 mM ATP, glucose-phosphate-dehydrogenase (0,1U) and to each 25 ml of buffer were put 5µg triose phosphate isomerase, 5µg glycerolphosphate and 50 µg aldolase. The reaction was start with 20 mM fructose-6-phosphate to 25°C and absorbance of 340 nm. PFK was measured from oxidation of NADH.

Assay of β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase(β -HAD) (E.C. 1.1.1.35).

β -HAD was usually assayed on the crude extract by a modification method of Civitarese et al. (2007). The enzymatic reaction system consisted of 0,1 M triethanolamine, 1.2 mM EDTA, 0.18 mM NADH, pH 7.4. The reaction started with 0.1 mM acetoacetyl-CoA to 340nm, 37°C. β -HAD was measured from extinction of NADH.

Assay of citrate synthase (CS) (E.C. 1.1.1.49).

CS was usually assayed on the crude extract by a modification method of Alp et al. (1976). The enzymatic reaction system consisted of 1M Tris-HCL, in pH 8.1, 1mM DTNB, 0.006mM acetyl coenzyme A, 10mM oxaloacetate e Triton X-100 10% (v/v). The reaction started with 10 mM oxaloacetate to 412nm, 25°C. CS was measured from formation of coenzyme A.

Assay of fatty acid synthase (E.C. 2.3.1.85).

FAS was usually assayed on the crude extract by a modification method (Cardon, Hammes, 1982). The enzymatic reaction system consisted of 90 mM potassium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM de acetyl-CoA, 0.2mM NADPH, 0.18 mM EDTA. The reaction started with 0.2 mM malonyl-CoA to 340 nm absorbance, 25 °C. FAS was measured from oxidation of NADPH.

Assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase (E.C. 1.1.1.49).

G6PDH was usually assayed on the crude extract by a modification method of Löhr and Waller (1974). The enzymatic reaction system consisted of buffer (50mM Tris, 1mM EDTA, 5mM MgSO₄.7H₂O, 1ml de distilled water, reaching pH 8.0 with HCl),

0.5mM de NADP^+ and starting the reaction with 1.2mM glucose 6- phosphate to 340 nm, a 25°C.

Statistical analysis

Analyses were performed using GraphPad Prim (version 5.00). The analysis of the enzymes activity was performed according specific reference for each enzyme. For nonparametric data were used Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test, for parametric data, were used Anova One-Way test and Bonferroni post-test. The values were expressed in mean and standard error of mean ($X \pm \text{SEM}$). The significance level was maintained in 5% ($p < 0.05$).

Results

Our results showed that PFK activity in undernutrition group (U) induce an increase at 350% higher enzymatic activity than control group (C); comparing trained group (T) with control group (C) was observed 128% increased activity. When we compare undernutrition group (U) and undernutrition trained group (UT) we didn't observe significant difference between the groups; and we compare undernutrition trained (UT) to trained group we observe that PFK activity in UT group was 85% smaller than T group (table 2).

In CS activity we observe that U group had 53% smaller activity than C group, and T group had 63% smaller activity than C group. Related to nutritional manipulation, U and UT groups didn't show significant difference in activity; as same as observe between UT and T groups (table 2).

Studying lipid metabolism we evaluate the activity in beta-oxidation enzyme activity (β -HAD) and fatty acid synthesis (FAS). Related to β -HAD we didn't observe

difference between groups (table 2). In contrast, in FAS activity we observe that U group show 132% higher enzymatic activity than C group; T group had 239% higher compared to C group. Comparing U group to UT group we did not observed significant difference between groups; as same as when we compare UT group to T group (table 2).

Related to pentose phosphate synthase, the G6PDH activity showed no difference between groups (table 2).

DISCUSSION

Effect of undernutrition in heart metabolism

The results showed that maternal low-protein (LP) diet during gestation and lactation induces metabolic modifications in adult life. In the present article, the results suggest that restriction protein during the gestation and lactation increases activities of PFK and FAS, reduces activity of CS and did not change the activities of β -HAD and G6PDH in adult animals.

Although the adult heart prefer to user lipids to obtain energy (Taegtmeyer 1994), it also use glucose and in amount greater than skeletal muscle (Kraegen et al. 1993). In malnutrition, the amount of glucose is different in heart and in skeletal muscle (Gavete et al. 2002).

The glucose uptake is reduced by decrease in skeletal muscle (Agote et al. 2001) and it markedly increases it in the heart (Tappia et al. 2013;Gavete et al. 2002). Opposing to skeletal muscle, the heart hasn't energy reserve and cardiac cells don't stop of work, it requires produce ATP continuously (Opie 1974, 1969;Stanley et al. 2005; Lopaschuk et al. 2010).

A low protein diet during the gestation period increases gene expression and protein levels of keys components of glucose metabolism in rats with 8 weeks old (Tappia et al.

204 2013). Tappia et al. (2013) showed increase in GLUT 4 (glucose transportation)
205 expression. Tappia et al. (2013) suggest that the increase of ATP generated by
206 glycolysis is used in cardiac remodeling and isn't used in the contractility cardiac cells.
207 Studies show that the results of the cardiac remodeling in malnutrition animals is a
208 pathological hypertrophy (Cheema et al. 2005) characterized by a combination of
209 myocyte hypertrophy and also by increased fibrosis disproportionate to myocyte
210 hypertrophy (Joseph et al. 2003). It's known that the increased of glycolysis can
211 produce more pyruvate and consequently more acetyl CoA (Holzer and Goedde, 1957),
212 lactate (Randle, 1963), oxaloacetate (Utter and Keech, 1960) and malate (Mehler et al.
213 1948).

214 Our data suggest an increase in lactate production, since this substrate contributes
215 to ATP production under extreme condition (Scot et al. 1972). Our data are in
216 agreement with studies of Sharma et al. (2005) that observed in hearts with workload
217 increased more ATP production by lactate.

218 Although malnutrition induced increase in glycolysis pathway, the restriction in
219 protein didn't induce change in kinetic activity of β -HAD. This suggest that protein
220 malnutrition don't change in the oxidation of fatty acid corroborating with studies of
221 Holness et al. (1998) that analyzed the carnitine palmitoyltransferase enzyme (CPT1).
222 The kinetic activity of CPT1 wasn't changed. Then, this suggests that β -oxidation
223 continues to produce acetyl Coenzyme A (acetyl CoA) normally. Combining the
224 possible increase in ATP through lactate and no changes in β -HAD, our results suggest
225 that oxidative phosphorylation may be not the main route involved in ATP production
226 under extreme conditions, which may be liked with the decrease in citrate synthase (CS)
227 activity observed in protein restriction rats.

CS catalyzes the first reaction of the citric acid cycle formatting citrate by acetyl Coenzyme A (acetyl CoA) and oxalacetate (Wu and Yang 1970). Reduction citrate production indicates less acetyl-CoA in cytoplasm, and consequently less fatty acid is being produced. Although, in our result, there was increase in FAS activity, this doesn't negate our theory about CS and acetyl CoA.

Fatty acid synthesis (FAS) may be important not only for the synthesis of fatty acid. Razani et al. (2011) showed that FAS was involved in the maintenance of homeostasis in hemodynamic stressed hearts and that cardiomyocyte calcium signaling appears to be involved in this process. Suggesting that the alteration in FAS may not prevent pathological remodeling in advanced heart failure, but absence FAS could exacerbate cardiac dysfunction. Our finding showed an increase in FAS activity. We believe that this increase in undernutrition rats occurred to adapt heart to pathological stress.

In heart, pentose cycle is limited and activity of G6PDH is lower than liver and kidney (Zimmer 1996). Pentose cycle is the main source of NADPH to be used in fatty acid synthesis in lipogenic tissues, as liver and adipose tissue (Kletzien et al. 1994), having G6PDH enzyme as participant of this reaction. This enzyme suffers activity alteration of dietary status in lipogenic tissues (Peavy and Hanse 1975; Louie et al. 1990). However, in present article, protein restriction didn't change activity of G6PDH in heart. Suggesting that NADPH continues be produced normally by G6PDH independent of stress conditions.

Effect of physical trained in heart metabolism

Rare are the articles that real about cardiac metabolism in trained animals. Our dates indicated that the moderate physical training increased activities of PFK and FAS,

reduced CS activity and it didn't change the activities of β -HAD and G6PDH in adult animals.

In agreement to our results, Zonderland et al. (1999) also showed, in heart, increase in PFK activity and not change in β -HAD activity by moderate-intensity treadmill training in the adult male *Wistar* rats. Suggesting chronic physical training prefer glycolysis than fatty acid oxidation. In the same study, Zonderland et al. (1999) found a tendency to decreased CS activity in heart, in our study we observe a significant decreased in CS activity. Suggesting that less ATP is being produced by oxidative phosphorylation pathway. Taken together, PFK and CS activities, the results suggest that non-oxidative glycolytic pathway is increased, having higher lactate production.

This was verified by Gollnick and Hearn (1961), Gollnick et al. (1967) and York et al. (1975) when they showed an increase in lactate dehydrogenase activity in hearts of adult swimming rats. LDH catalyzes pyruvate in lactate (Randle 1963). Penny (1974) believes that change in cardiac LDH activity is relation the cellular events during hypertrophy.

Our results also showed that the physical trained induced increased FAS. Dobrzyn et al. (2013) trained male *Wistar* rats in treadmill training during 6 weeks, maintained at 28 m/min for the remaining 2 weeks. They didn't analyze FAS, but observed the expression of others lipogenic genes, as SCD1, SCD2, GPAT and ACS. Indicating that FAS can to be involved in the regulation to cardiac stress induced by physiology hypertrophy (Dobrzyn et al. 2013). In heart, the molecular mechanisms are poorly understood in physiological stress (Maillet et al. 2012; Bente and Klarlund, 2005; Shephard 2001).

Lastly, was evaluated the pentose cycle through of kinetic activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). Like the undernutrition, the kinetic activity of the

enzyme wasn't modified. Reinforcing the idea that pentose cycle wasn't main source of NADPH to heart.

Effect of moderate training on alterations induced by undernutrition

To evaluate the effect of the physical training about undernutrition rats, we compare the UT and U groups in studied enzymes. The difference absence between these groups corroborates with the idea that the pathological and physiological stress are induced for different mechanism. Otherwise, the PFK and FAS enzymes activities tend to increase and the CS enzyme activity tends to decrease.

To observe UT group with C group is perceived that in PFK and CS the values of enzymatic activity tend to return to the values of the C group. In the PFK this alteration is more evidence, because there is difference between UT and T-groups.

CONCLUSION

In face of what was found, it can be said that, in the heart, the activity of glycolysis, fatty acid oxidation, krebs cycle, fatty acid synthesis and pentose cycle have similar action in both undernutrition heart and trained heart. Probably, that change occurs to adapt the heart to pathological stress and hypertrophy in undernutrition, and, also, to physiological stress and hypertrophy in physical trained. We can say also that enzymatic activity of PFK in heart is sensible to changes in undernutrition rats, trained rats and undernourished trained rats. The trained physical in undernutrition rats can induce alteration in cardiac metabolism.

Acknowledgement

The acquisition of the reagents used in this work was supported by the financial support from the Foundation to Support Science and Research from Pernambuco State—Brazil (FACEPE). We are also grateful to CAPES, CNPQ and FACEPE which provided scholarships for MDPB, AASP, CMF, DSCM.

REFERENCES

- Agote, M., Goya, L., Ramos, S., Alvarez, C., Gavete, M.L., Pascual-Leone, A.M., Escriva, F. 2001. Glucose uptake and glucose transporter proteins in skeletal muscle from undernourished rats. *Am. J. Physiol.* **281**: E1101–EE1109.
- Alp, P.R., Newsholme, E.A., Zammit, V.A. 1976. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem. J.* **154**: 689-700.
- Barker, D. J. 1995. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* **311**:171-4.
- Barker, D.J. 1993. The intrauterine origins of cardiovascular disease. *Acta Pediatr. Suppl.* **82**: 93-99.
- Barker, D.J., Osmond, C., Golding, J., Kuh, D., Wadsworth, M.E. 1989. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* **298**: 564-567.
- Bente, K.P. 2005. Natural immunity—effect of exercise. *Nat. Immun.* **5**: 263–288.
- Bieswal, F., Ahn, M.T., Reusens, B., Holvoet, P., Raes, M., Rees, W.D., Remacle, C. 2006. The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity.* **14**:1330–43.
- Bol, V., Desjardins, F., Reusens, B., Balligand, J.L., Remacle, C. 2010. Does early mismatched nutrition predispose to hypertension and atherosclerosis, in male mice? *PLoS One*.5.doi: 10.1371/ e12656
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* **72**:248-254.
- Cardont, J.W., Hammes, G.G. 1982. Investigation of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate and Acyl-Binding Sites on Avian Fatty Acid Synthase? *Biochemistry.* **21**: 2863-2870.
- Cheema, K.K., Dent, M.R., Saini, H.K., Aroutiounova, N., Tappia, P.S. 2005. Prenatal exposure to maternal undernutrition induces adult cardiac dysfunction. *Br J Nutr.* **93**:4: 471-477.

- 331 Civitarese, A.E., Carling, S., Heilbronn, L.K., Hulver, M.H., Ukropcova, B., Deutsch, W.A., Smith,
332 S.R., Ravussin, E. 2007. Calorie Restriction Increases Muscle Mitochondrial Biogenesis in Healthy
333 Humans. *Plos clinal Trials* **4**: 485-94.
- 334 Dobrzyn, P., Pyrkowska, A., Duda, M.K., Bednarski, T., Maczewski, M. Langfort, J. Dobrzyn, A. 2013
335 Expression of lipogenic genes is upregulated in the heart with exercise training-induced but not pressure
336 overload-induced left ventricular hypertrophy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*
337 doi:10.1152/ajpendo.00603.
- 338 Eggleston, L.V., Krebs, H.A. 1974 Regulation of the pentose phosphate cycle. *Biochem J.* **138**: 425-435.
- 339 Eriksson, J., Taimela, S., Koivisto, V.A. 1997. Exercise and the metabolic syndrome. *Diabetologia*
340 **40**:125-135.
- 341 Fletcher, G.F., Balady, G.J., Amsterdam, E.A., Chaitman, B., Eckel, R., Fleg, J., Froelicher, V.F., Leon,
342 A.S., Piña, I.L., Rodney, R., Simons-Morton, D.A., Williams, M.A., Bazzarre, T. 2011 Exercise
343 standards for testing and training: a statement for healthcare professionals from the American Heart
344 Association. *Circulation*. **104**:1694-1740.
- 345 Gavete, M.L., Agote, M., Martin, M.A., Alvarez, C., Escriva, F. 2002. Effects of Chronic Undernutrition
346 on Glucose Uptake and Glucose Transporter Proteins in Rat Heart. *Endocrinology*. **143**,11:4295–4303.
- 347 Gollnick, P.D., Struck, P.J., Bogoy, T.P. 1967. Lactic dehydrogenase activities of rat heart and skeletal
348 muscle after exercise and training. *J. Appl Physiol*. **22**: 623-627.
- 349 Gollnick, P.D., Heam, G.R. 1961. Lactic dehydrogenase activities of heart and skeletal muscle of
350 exercised rats. *Am. J. Physiol.* **201**: 694-696.
- 351 Hales, C.N., Barker, D.J., Clarck, P.M., Cox, L.J., Fall, C., Osmond, C., Winter, P.D. 1991 Fetal and infant
352 growth and impaired glucose tolerance at age 64 *BMJ*. **303**: 1019–1022.
- 353 Hanson, M.A., Cherezov, V., Griffith, M.T., Roth, C.B., Jaakola, V.P., Chien, E.Y., Velasquez, J., Kuhn,
354 P., Stevens, R.C. 2008. A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the
355 human beta2-adrenergic receptor. *Structure*. **16**: 897-905.
- 356 Hanson, M.A., Gluckman, P.D. 2005. Developmental processes and the induction of cardiovascular
357 function: conceptual aspects. *J Physiol*. **565**: 27-34.
- 358 Holness, M.J., Priestman, D.A., Sugden, M.C. 1998. Impact of protein restriction on the carboxykinase in
359 white muscle and red muscle. *Biochem.J.* **103**:391-99.

- 360 Holzer, H., Goedde, H.W. 1957 .Two ways from pyruvate to acetyl-coenzyme a in yeast. *Biochem Z.***329**:
361 175-191.
- 362 Joseph, J.,Joseph, L.,Shekhawat, N.S., Devi, S., Wang, J., Melchert, R.B., Hauer-Jensen, M.,Kennedy,
363 R.H.2003.Hyperhomocysteinemia leads to pathological ventricular hypertrophy in normotensive rat.
364 *American Journal of Physiology -Heart and Circulatory Physiology* Published. **285**: H679-686.
- 365 Kletzien, R.F., Harris, P.K.W., Foellmi, L.A. 1994. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a
366 "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress.
367 *Faseb J.* **8**: 174-180.
- 368 Kraegen, E.W., Sowden, J.A., Halstead, M.B., Clark, P.W., Rodnick, K.J., Chisholm, D.J., James, D.E.
369 1993. Glucose transporters and in vivo glucose uptake in skeletal and cardiac muscle: fasting, insulin
370 stimulation and immunoisolation studies of GLUT1 and GLUT4. *Biochem. J.* **295**:287–293.
- 371 Leandro, C.G., Castro, R.M., Nascimento, E., Pithon-Curi, T.C., Curi, R. 2007. A program of moderate
372 physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. *J. Strength Cond. Res.* **21**:751-6.
- 373 Lohr, G. W., Waller, H.D.1974.Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. IN *Methods of Enzymatic*
374 *Analysis*. H.U. Bergmeyer, Editor, Academic press., New York: 636-649.
- 375 Loimaala, A., Huikuri, H.V., Kööbi, T., Rinne, M., Nenonen, A., Vuori, I. 2003. Exercise training
376 improves baroreflex sensitivity in type 2 diabetes. *Diabetes.* **52**: 1837-1842.
- 377 Lopaschuk, G.D., Ussher, J.R., Folmes, C.D., Jaswal, J.S., Stanley, W.C. 2010. Myocardial fatty acid
378 metabolism in health and disease. *Physiol Rev.* **90**: 207–258.
- 379 Maillet, M., Van Berlo, J.H., Molkentin JD (2012) Molecular basis of physiological heart
380 growth:Fundamental concepts and new players. *Nat. Rev. Mo. Cell. Biol.* **14**: 38–48.
- 381 Mehler, A.H., Kornberg, A., Grisolia S., Ochoa, S. 1948 The enzymatic mechanism of oxidation-
382 reductions between malate or isocitrate and pyruvate. *J. Biol. Chem.***174**(3):961-977
- 383 Morgane, P. 2002. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci.*
384 *Biobehav. Rev.* **26**: 471-483.
- 385 Nascimento, L. et al.*Applied Physiology Nutrition and Metabolism* unpublished data.
- 386 Opie, L.H. 1974. Myocardial energy metabolism. *Adv. Cardiol.* **12**: 70-83.
- 387 Opie, L.H. 1969. Metabolism of the heart in health and disease II. *Am. Heart. J.* **77**: 100-22.
- 388 Pate, R.R., Pratt, M., Blair, S.N., Haskell, W.L., Macera, C.A., Bouchard, C., Buchner, D., Ettinger, W.,
389 Heath, G.W., King, A.C., Kriska, A., Leon, A.S., Bess, H.M., Morris, J., Paffenbarger Jr, R.D., Patrick,

- 390 K., Pollock, M.L., Rippe, J.M., Sallis, J., Wilmore, J.H. 1995. Physical activity and public health: a
391 recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of
392 Sports Medicine. *Jama*. **273**:402-7.
- 393 Peavy, D.E., Hansen, R.J. 1975. Immunological titration of rat liver glucose-6-phosphate dehydrogenase
394 from animals fed high and low carbohydrate diets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**:1106-1111.
- 395 Penney, D.G. 1974. Lactate dehydrogenase subunit and activity changes hypertrophied heart of the
396 hypoxically exposed rat. *Biochimica et Biophysica Acta*. **358**: 21-24.
- 397 Randle, P.J. 1963. Endocrine control of metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* **25**:291-324.
- 398 Razani, B., Zhang, H., Schulze, C., Schilling, J.D., Versky, J., Lodhi, I.J., Topkara, V.K., Feng,
399 C., Coleman, T., Kovacs, A., Kelly, D.P., Saffitz, J.E., Dorn, G.W., Nichols, C.G., Semenkovich, C.F. 2011.
400 Fatty acid synthase modulates homeostatic response to myocardial stress. *The journal of biological*.
401 **286**:3049-3061.
- 402 Reeves, P.G., Nielsen, F.H., Fahey Junior, G.C. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final
403 report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-
404 76A rodent diet. *J. Nutr.* **123**: 1939-1951.
- 405 Remacle, C., Bieswal, F., Reusens, B. 2011. Developmental programming of adult obesity and
406 cardiovascular disease in rodents by maternal nutrition imbalance. *Am. J. Clin. Nutr.* **94**: 1846-1852.
- 407 Remacle, C., Bieswal, F., Reusens, B. 2004. Programming of obesity and cardiovascular disease.
408 *International Journal of Obesity*. **28**: S46–S53.
- 409 Scolletta, S., Biagioli, B. 2010. Energetic myocardial metabolism and oxidative stress: let's make them
410 our friends in the fight against heart failure *Biomed Pharmacother.* **64**:203-207.
- 411 Sharma, N., Okere, I.C., Brunengraber, D.Z., McElfresh, T.A., King, K.L., Sterk, J.P., Huang, H.,
412 Chandler, M.P., Stanley, W.C. 2005. Regulation pyruvate of dehydrogenase activity and citric acid cycles
413 intermediates during high cardiac power generation. *J. physiol.* **562**: 593-603.
- 414 Shephard, R.J. 2001. Sepsis and mechanisms of inflammatory response: is exercise a good model. *Br. J.*
415 *Sports Med.* **35**: 223–230.
- 416 Stanley, W.C., Recchia, F.A., Lopaschuk, G.D. 2005. Myocardial substrate metabolism in the normal
417 and failing heart. *Physiol. Rev.* **85**: 1093–129.
- 418 Stuewe, S.R., Gwartz, P.A., Agarwal, N., Mallet, R.T. 2000. Exercise training enhances glycolytic and
419 oxidative enzymes in canine ventricular myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32**: 903-913.

- 420 Taegtmeyer, H. 1994. Energy metabolism of the heart: from the basic concepts to clinical applications.
 421 *Curr Prob Cardiol.* **19**:59–113.
- 422 Tappia, P.S., Guzman, C., Dunn, L., Aroutiounova, N. 2013. Adverse cardiac remodeling due to maternal
 423 low protein diet is associated with alterations in expression of genes regulation glucose
 424 metabolism. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases.* **23**: 130-135.
- 425 Utter, M.F., Keech, D.B.J. 1960. Formation of oxaloacetate from pyruvate and carbon dioxide. *Biol*
 426 *Chem*, 235:17-8.
- 427 Whelton, S.P., Chin, A., Xin, X., He, J. 2002. Effect of aerobic exercise on blood pressure: a meta-
 428 analysis of randomized, controlled trials. *Ann. Intern. Med.* **136**: 493-503.
- 429 Who.2011.Global status report on noncommunicable diseases. 2010. Geneva, World Health Organization.
- 430 Wu, J.Y., Yang, J.T.1970.Effects of salts and organic solvents on the activity of citrate synthase. *J. Biol.*
 431 *Chem.* **245**: 3561-3564.
- 432 York, J.W., Renney, L.B., Oscai, L.B. 1975. Effects of physical training on several glycolytic enzymes in
 433 rat heart. *Biochimica et Biophysica Acta.* **381**: 22-27.
- 434 Zimmer, H.G.1996. Regulation of and intervention into the oxidative pentose phosphate pathway and
 435 adenine nucleotide metabolism in the heart. *Molecular and Celhdar Biochemist.***160/161**: 101-109.
- 436 Zimmer, H.G., Ibel, H. 1984. Ribose accelerates the repletion of the ATP pool during recovery from
 437 reversible ischemia of the rat myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **16**: 863-866.
- 438 Zonderland, N.L., Bär, P.R., Reijneveld, J.C., Spruijt, B.M., Keizer, H.A., Glatz, J.F. 1999. Different
 439 metabolic adaptation of heart and skeletal muscles to moderate intensity treadmill training in the rat.
 440 *European Journal of Applied Physiology, Berlin*, **79**, 391-396.

TABLES

Table 1: Composition of the diets

Ingredients	Amount per 1kg of diet	
	Low-protein (8% casein)	Control-diet (17% casein)
Casein	79.3 g	179.3 g
Vitamin mix*	10 g	10 g
Mineral mixture [#]	35 g	35 g
Celullose	50 g	50 g
Coline bitartrate	2.5 g	2.5 g
dl-Methionine	3.0 g	3.0 g
Soya oil	70 ml	70 ml
Corn starch	750.2 g	650.2 g

* Vitamin mixture contained the following (in mg kg⁻¹ of diet): retinol, 12; cholecalciferol, 0.125; thiamine, 40; riboflavin, 30; pantothenic acid, 140; pyridoxine, 20; inositol, 300; cyanocobalamin, 0.1; menadione, 80; nicotinic acid, 200; choline, 2720; folic acid, 10; *p*-aminobenzoic acid, 100; and biotin, 0.6.

[#] Mineral mixture contained the following (in mg kg⁻¹ of diet): CaHPO₄, 17 200; KCl, 4000; NaCl, 4000; MgO, 420; MgSO₄, 2000; Fe₂O₃, 120; FeSO₄.7H₂O, 200; and trace elements, 400 (MnSO₄.H₂O, 98; CuSO₄.5H₂O, 20; ZnSO₄.7H₂O, 80; CoSO₄.7H₂O, 0.16; and KI, 0.32; with sufficient starch to bring to 40 g [per kg of diet]) (Reeves et al. 1993).

Table 2: Results of activity, in U/mg, of phosphofructokinase (PFK), β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (β -HAD), citrate synthase (CS), fatty acid synthase (FAS) AND glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) of the control (C), undernutrition (U), trained (T) and undernutrition trained (UT) groups.

Enzymes	Groups			
	C	U	T	UT
PFK	2.25 $\pm$ 0.39 (n=5)	10.13 $\pm$ 2.52* (n=5)	29.87 $\pm$ 5.07* (n=4)	4.42 $\pm$ 0.98& (n=4)
β -HAD	3.08 $\pm$ 0.79 (n=5)	4.86 $\pm$ 0.47 (n=5)	3.48 $\pm$ 0.57 (n=5)	5.05 $\pm$ 1.34 (n=4)
CS	3.96 $\pm$ 0.78 (n=5)	1.85 $\pm$ 0.36* (n=6)	1.47 $\pm$ 0.42* (n=4)	2.51 $\pm$ 0.17 (n=7)
FAS	15.46 $\pm$ 1.40 (n=4)	35.91 $\pm$ 7.11* (n=6)	52.39 $\pm$ 9.30* (n=5)	31.61 $\pm$ 5.85 (n=4)
G6PDH	4.93 $\pm$ 0.40 (n=7)	4.38 $\pm$ 0.68 (n=5)	4.41 $\pm$ 0.26 (n=5)	5.18 $\pm$ 0.70 (n=4)

n=indicates the amount of animals used in each group. * indicates difference compared to C group, & indicates difference compared to T group. The values were expressed in mean and standard error of mean (X $\pm$ SEM). The significance level was maintained in 5% (p<0,05).

FIGURE

Weeks	Velocity (km/h)	Inclination (°)	Duration (min)
-------	-----------------	-----------------	----------------

Figure**1.**

1ªWeek (Adaptation)	0.3	0	5
	0.4	0	5
	0.5	0	5
	0.3	0	5
2ª Week	0.4	0	5
	0.5	0	20
	0.6	0	30
	0.4	0	5
3ª Week	0.5	0	5
	0.6	0	10
	0.8	0	10
	0.9	0	30
	0.5	0	5
4ª Week	0.5	0	5
	0.8	0	10
	0.9	0	10
	1.1	0	30
	0.5	0	5
5ª Week	0.5	5	5
	0.8	5	10
	0.9	5	10
	1.1	5	30
	0.5	0	5
6ª Week	0.5	10	5
	0.8	10	10
	0.9	10	10
	1.1	10	30
	0.5	0	5
7ª Week	0.5	10	5
	0.8	10	10
	0.9	10	10
	1.1	10	30
	0.5	0	5
8ª Week	0.5	10	5
	0.8	10	10
	0.9	10	10
	1.1	10	30
	0.5	0	5

Figure 1. Treadmill training program according to speed, inclination and duration of each session, for the 8 week period of training (Leandro et al. 200)

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO B – Documento de encaminhamento do artigo ao periódico

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 Recife - PE - Brasil
Fones: (81) 33 0000 3340 3341 3342 3343
Fax: (81) 33 0000 4000
www.ufpe.br



Recife, 02 de maio de 2012

Ofício nº 435/12

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Profª. Claudia Jacques Lagranha**
Departamento de Educação Física e Ciências do Esporte (CAV)
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.016335/2012-11

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **"EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO SOBRE MODIFICAÇÕES INDUZIDAS PELA DESNUTRIÇÃO PROTEICA REI-NATAL: AVALIAÇÃO DO METABOLISMO CARDÍACO"**.

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

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

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

Origem dos animais: Departamento de Nutrição-UFPE;
Animais: Ratos; Linhagem: Wistar; Sexo: Machos e Fêmeas;
Número de animais previsto no protocolo: 32 filhotes e 12 ratas;
Peso: 240-260g; Idade: 90 a 120 dias.

Atenciosamente,


Profª. Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEA

CCB: Integrar para desenvolver

Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism



Applied Physiology,
Nutrition, and Metabolism
Physiologie appliquée,
nutrition et métabolisme

**Effect of moderate physical training on the changes induced
perinatal protein undernutrition: evaluate of cardiac
metabolism in adults rats**

Journal:	<i>Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism</i>
Manuscript ID:	apnm-2014-0033
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	30-Jan-2014
Complete List of Authors:	Barreto, Michelly; University Federal of Pernambuco, Pedrosa, Anderson; UFPE-CAV, Freitas, Cristiane; UFPE-CAV, Morais, Déborah; University Federal of Pernambuco, Silva, Wylla; Academic Center of Vitory-UFPE CAV, Fernandes, Mariana; UFPE-CAV, Department of Physical Education and Sports Science Lagranha, Claudia; UFPE-CAV, Department of Physical Education and Sports Science,
Keyword:	exercise metabolism < exercise, exercise nutrition < exercise, exercise training < exercise, lipid metabolism < lipid metabolism, carbohydrate metabolism < metabolism

SCHOLARONE™
Manuscripts