



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DIEGO SANTOS DE ARAUJO

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO SOBRE O BALANÇO
OXIDATIVO NO CORAÇÃO DE RATOS JOVENS SUBMETIDOS À
DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL**

Recife

2018

DIEGO SANTOS DE ARAUJO

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO SOBRE O BALANÇO
OXIDATIVO NO CORAÇÃO DE RATOS JOVENS SUBMETIDOS À
DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

Orientadora: Claudia Jacques Lagranha

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Araújo, Diego Santos de

Efeito do exercício físico moderado sobre o balanço oxidativo no coração de ratos jovens submetidos à desnutrição proteica perinatal/ Diego Santos de Araújo- 2018.

71 folhas: fig., tab.

Orientadora: Claudia Jacques Lagranha

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em

Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2018.

Inclui referências e anexo

1. Desnutrição 2. Exercícios físicos 3. Dieta I. Lagranha, Claudia Jacques (orient.) II. Título

616.39

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-382

Elaborado por Elaine C. Barroso CRB4/1728

DIEGO SANTOS DE ARAUJO

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO SOBRE O BALANÇO OXIDATIVO
NO CORAÇÃO DE RATOS JOVENS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTEICA
PERINATAL**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

Aprovada em: 30/07/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Claudia Jacques Lagranha (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o Dr^o Eduardo Carvalho Lira (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Mariana Pinheiro Fernandes (Examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o Dr^o Diorginis José Soares Ferreira (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

*Dedico este trabalho à Deus,
por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu
guia, socorro presente nas horas da angústia.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me manter de pé mesmo em um momento na minha saúde tão difícil, Dando-me forças para poder prosseguir com a minha vida. Sem a força do senhor e o cuidado eu não teria conseguido. Cada pessoa que me socorreu em diversos lugares e momentos em todo esse período foram enviados e guiados por ele. Acredito com certeza que vivi o que está escrito no livro de Mateus, onde o Sr. expressa o seu cuidado ilustrando os lírios dos campos e a forma maravilhosa como eles se apresentam na natureza.

À minha orientadora Claudia Lagranha por TUDO, força, olhar humano, companheirismo, e principalmente a oportunidade concebida de um sonho a ser realizado, de ser mestre em uma área tão maravilhosa. Creio que o senhor vai ajudar a senhora em tudo, por que a sra consegue ser uma pessoa boa e ao mesmo tempo uma cuidadora, sinto-me lisongeados de poder um dia afirmar que no meu mestrado minha orientadora foi Claudia Lagranha, uma pessoa de tamanha competência e digna de admiração.

À professora Mariana Pinheiro pela amizade, apoio e principalmente os conselhos, creio que os laços são para a vida inteira. Foi vendo a sra que se concretizou mais ainda o desejo de ensinar. A professora mari é uma fonte de inspiração para muitos e com seu jeito ainda vai encantar muitos alunos para a área da bioquímica, agradeço também a Fernando por ser uma JOVEM tão simpático e desenrolado, também não pode falar a HB20 Azul que sem ela nada conseguiria. Agradeço a vocês duas Professoras incríveis que proporcionaram uma bioquímica surreal na minha vida, e a oportunidade de adentrar no mundo da pesquisa num laboratório tão esforçado e cheio de gás.

Agradeço a todo o LABMEX, Anderson, Rudá, Talitta, Cassia, Idelfonso, Aiany, Regis, Cris, David, Diorginis, Tercya, Aliffer, Dani, Flavia, Winglison, Ezequiel, Denis, Nilson e Aline, sem a ajuda de todos, nada teria conseguido, sou fruto de um laboratório alicerçado no Amor. Sentirei eternas Saudades.

À minha família por todo o apoio, Deus me concedeu uma família linda, Minha Mãe, Meus irmãos Mateus, Danielle, Gabriel e Vitória. Minha avó Maria. Meus Tios e Tias. Meu Pai e Família. Aos meus Primos, Rebeca, Marquinhos, Felipe, Elisângela e todos os pequeninos. Quero dizer Muito OBRIGADO! E a Minha Avó Maria que já partiu para o céu, sei que vc deve estar impressionando os anjos com seu sorriso, te agradeço por tudo de coração.

Creio que Deus colocou na minha vida diversos amigos que me ajudaram a entender o mundo e caminhar junto com eles, dentre os inúmeros: Wesley, Marcos, Elayne, Jaqueline,

Deise, Leandro, Rayane, Priscila, Camila, Victor, Bela, Marcílio, Wedja, Marcelo, Gleybson, Liliane, Rayane, Vitoria, Andinho, Diego Nascimento, Fernanda, Pablo, Os Sábidos, Henrique, Silvana e Bruno. Minha turma de Fronteiras nas pessoas de Yasmim, Fernada, Keila, Vanderlan e Anderson novamente por toda força nas disciplinas. O grupo Kadosh. Toda minha turma de Odonto: Egidio, Hênio, Catarina, Laís, Rebeka, Tiago S., Paulo, Cesar, Rayane, Tiago Queroz, Bruna, Val, Can, Luiza e Amanda. Também não tem como esquecer todos os meus professores da Escola Infantil, Fundamental, Médio, e Graduação nas pessoas do Prof Wagner Souza, Prof Fabíola, Prof Juliana, Prof José Carlos, Prof Ailton, Prof Emília, Prof Matilde, Prof Haroldo, Prof Magadã e Prof Tiago. Professores são em si seres que guiam o amor na humanidade. Gostaria também de agradecer ao Pastor Nilson e toda à família IBGA.

Acredito ainda que dignos desses sinceros agradecimentos são minha psicóloga Samid, a médica Aline, o psiquiatra Fred e todos do Núcleo de Atenção à Saúde do Estudante dessa Universidade. Agradeço também ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia na pessoa do Professor Eduardo Lira e todos que o compõe. Por último mas não menos importante agradeço a FACEPE pela bolsa de Mestrado que propiciou meu custeio ao longo dessa jornada.

MEU MUITO OBRIGADO A TODOS!!!!!!

Estudos epidemiológicos mostraram que aproximadamente 15,5% da população mundial, sendo um terço dessa parte crianças, são atingidas pela desnutrição, constituindo-se um sério problema de saúde pública (MONTEIRO *et al.*, 2006; BITTENCOURT *et al.*, 2009; UNITED NATIONS, 2013).

RESUMO

Uma dieta materna pobre em proteínas resulta em danos morfológicos e funcionais aos corações dos filhotes. O exercício físico moderado, por outro lado, é sabido que melhora o metabolismo e a função do coração, melhorando a saúde de forma geral na idade adulta. Assim, especulamos que o exercício moderado realizado durante o desenvolvimento pós-natal poderia melhorar o dano cardíaco resultante de uma privação proteica perinatal. Foi utilizado o modelo de restrição protéica em ratos durante a gestação e lactação para avaliar o efeito do exercício físico moderado pós-lactação sobre parâmetros de estresse oxidativo no coração. Foram utilizadas ratas divididas em dois grupos: normoproteína (NP) recebendo 17% de caseína na dieta e baixa proteína (LP), recebendo 8% de caseína. Aos 30 dias de idade, os filhotes do sexo masculino de cada grupo foram submetidos ao protocolo de treino com intensidade moderada a 50% da capacidade máxima subdivididos em: grupos controle (NP e LP) e exercitados (ENP e ELP). Com aproximadamente 52 dias de vida, os ratos foram sacrificados, tendo o sangue e coração coletados para as análises bioquímicas. Nós observamos nos ratos não exercitados do grupo LP aumento significativo na oxidação lipídica e protéica, com redução do sistema anti-oxidante enzimático. A aplicação do exercício moderado neste grupo, entretanto, resultou em reduções significantes (> 2 vezes) da oxidação lipídica e protéica que se correlacionou com uma aumento na defesa antioxidante não enzimática e diminuição significativa nos triglicerídeos séricos. Com esses dados, sugerimos que o a desnutrição materna causa dano cardíaco na prole, o que pode ser amenizado com o exercício físico moderado durante a infância, promovendo uma melhora a saúde de forma geral na vida adulta.

Palavras-chave: Ratos Desnutridos. Exercício Físico. Treinamento Moderado. Dieta hipoproteica.

ABSTRACT

A maternal diet low in protein results in morphologic and functional damage to the hearts of her offspring. Moderate exercise, on the other hand, is thought to improve heart metabolism and function, improving the overall health in adulthood. Thereby, we speculate that moderate exercise performed during early post-natal development could ameliorate the cardiac damage resulted from a perinatal protein deprivation. In the present study we used a rat model of protein restriction during gestation and lactation to assess the effect of moderate post-lactation physical exercise on oxidative stress parameters in the heart. Pregnant rats were divided into two groups: normoprotein (NP) receiving 17% casein in the diet, and low-protein (LP), receiving 8% casein. At 30 days of age, male pups from each group were submitted to a training protocol with a moderate intensity of 50% of the maximum capacity subdivided into: control group (NP and LP) and exercised (ENP and ELP).. At approximately 52 days of age, the rats were sacrificed and blood and heart were collected for biochemical analysis. Our results showed significant increases in lipid and protein oxidation, and reduction in enzymatic anti-oxidant systems in the un-exercised rats on LP group. Application of moderate exercise to this group, however, resulted in significant > 2-fold reductions in both lipid and protein oxidation that correlated with an increase in non-enzymatic antioxidant defense and a significant decrease in serum triglycerides. Taken together we suggest that cardiac damage occurring in children born to mothers lacking protein during early childhood development could be ameliorated to an extent with moderate physical exercise designed to improve cardiac oxidative balance.

Keywords: Weaned rats. Physical Exercise. Moderate Training. Low-protein diet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema das principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica.....	23
Figura 2 – Detoxificação de xenobióticos via ácidos mercaptúricos	26
Figura 3 – Modelo Experimental.....	32

Artigo 1- Moderate Exercise During Early Post-Natal Development in Wistar Rats Reduces the Harmful Effects of Protein Deprivation on Oxidative Stress Markers in the Heart.

Figura 1 – Effect of maternal low-protein diet and moderate physical training during childhood on citrate synthase activity in male offspring.....	59
Figura 2 – Effect of maternal low-protein diet and moderate physical training during childhood on cardiac oxidative stress biomarkers in male offspring	60
Figura 3 – Effect of maternal low-protein diet and moderate physical training on enzymatic antioxidant defense in male offspring.....	61
Figura 4 – Effect of maternal low-protein diet and moderate physical training during childhood on cardiac REDOX status in male offspring.....	62

LISTA DE TABELAS

Artigo 1- Moderate Exercise During Early Post-Natal Development in Wistar Rats Reduces the Harmful Effects of Protein Deprivation on Oxidative Stress Markers in the Heart.

Tabela 1 – Serum cholesterol and triglycerides in the male rat offspring of mothers receiving either a low-protein diet or normal diet during the gestational and lactation periods, and either exercised or not exercised for 4 weeks as described in Methods, beginning at 30 days of age.....57

LISTA DE REAÇÕES

Reação 1 – Redução da molécula de oxigênio à ânion superóxido.....	21
Reação 2 - Produção do peróxido de hidrogênio.....	21
Reação 3 – Reação de fenton (Formação do superóxido).....	21
Reação 4 – Reação de fenton (Formação do peróxido de hidrogênio).....	21
Reação 5 – Reação de fenton (Formação do radical hidroxila).....	21
Reação 6 - Reação de Haber-Weiss (Formação do gás oxigênio).....	21
Reação 7 - Reação de Haber-Weiss (Formação do radical hidroxila na presença do ferro ²⁺ e peróxido de hidrogênio).....	21
Reação 8 - Reação Haber-Weiss (Formação do radical hidroxila na presença do superóxido e peróxido de hidrogênio).....	21
Reação 9 – Produção do radical hidroxila a partir da fissão hemolítica do peróxido de hidrogênio.....	22
Reação 10 – Produção do peroxinitrito a partir do óxido nítrico e O ₂ ⁻ . (1).....	22
Reação 11 – Produção do peroxinitrito a partir do óxido nítrico e O ₂ ⁻ . (2).....	22
Reação 12 – Peroxidação lipídica (1).....	22
Reação 13 – Peroxidação lipídica (2).....	22
Reação 14 - Peroxidação lipídica (3).....	22
Reação 15 – Formação de oxigênio a partir do superóxido (Enzima e Cu).....	24
Reação 16 -Formação: Peróxido de hidrogênio do superóxido e hidrogênio (Enzima e Cu)..	24
Reação 17 – Formação de oxigênio a partir do superóxido (Enzima e Mn).....	24
Reação 18 – Formação: Peróxido de hidrogênio do superóxido e hidrogênio (Enzima e Mn)	24
Reação 19 - Formação de oxigênio a partir do superóxido (Enzima e Fe).....	24
Reação 20 – Formação: Peróxido de hidrogênio do superóxido e hidrogênio (Enzima e Fe)..	24
Reação 21 – Formação de água e oxigênio a partir de peróxido de hidrogênio.....	25
Reação 22 – Glutathiona oxidada e água a partir do peróxido de hidrogênio e glutathiona reduzida.....	25
Reação 23 – Glutathiona oxidada e água a partir de ácido graxo e glutathiona reduzida	25
Reação 24 – Produção de glutathiona reduzida na presença do NADPH.....	25
Reação 25 – Redução do peróxido de hidrogênio à água através da peroxiredoxina.....	26
Reação 26 – Reação de agentes antioxidantes derivados da dieta (1).....	26
Reação 27 - Reação de agentes antioxidantes derivados da dieta (2).....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

ATM	<i>Ataxia Telangectasia Mutated</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
CAT	Catalase
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene /1-cloro-2,4-dinitrobenzene
CS	Controle Sedentário
CT	Controle Treinado
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNPH	2-4 dinitrofenil-hidrazina
DS	Desnutrido Sedentário
DT	Desnutrido Treinado
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
GPx	Glutathione Peroxidase
GS	Glutathione Sintetase
GSH	Glutathione Reduzida
GSR	Glutathione Redutase
GSSG	Dissulfeto de Glutathione
GST	Glutathione S Transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ O	Água
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MDA	Ácido Malonaldeído
NADH	Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina Reduzida
NEM	N-etilmaleimida
O ₂ [•]	Ânion superóxido
OH ⁻	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OPT	<i>o-phthalaldehyde</i>
PNDS	Pesquisa Nacional de Demografia
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
PRXS	Peroxiredoxinas
REDOX	Potencial de Oxidação-Redução
SISVAM	Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TrxR1	<i>Thioredoxin reductase-1</i>
UCP	Proteína Desacopladora
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	16
1.1.1 GERAL	16
1.1.2 ESPECÍFICOS	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 DESNUTRIÇÃO	17
2.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ESTRESSE OXIDATIVO	20
2.3 EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO E ESTRESSE OXIDATIVO	27
2.4 EXERCICIO FISICO MODERADO E DESNUTRIÇÃO	29
3 METODOLOGIA.....	32
3.1 ANIMAIS E DIETA.....	32
3.2 PROTOCOLO DE TREINO	33
3.3 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO	33
3.4 DOSAGEM DE PROTEÍNA	33
3.5 BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	33
3.5.1 Dosagem de peroxidação lipídica (TBARS):	33
3.5.2 Medida dos níveis de oxidação de proteínas (Carbonilas):	34
3.6 AVALIAÇÕES DA DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA.....	34
3.6.1 Atividade da enzima antioxidante Superóxido Dismutase (SOD):	34
3.6.2 Atividade da enzima antioxidante Catalase (CAT):	35
3.6.3 Atividade da enzima antioxidante Glutathione-S-Transferase (GST):.....	35
3.7 AVALIAÇÃO DA DEFESA ANTIOXIDANTE NÃO-ENZIMÁTICA	35
3.7.1 Quantificação do balanço REDOX (razão GSH/GSSG):.....	35
3.7.2 Quantificação dos grupamentos Tióis Totais:	36
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
4 RESULTADOS – ARTIGO SUBMETIDO	37
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA.....	71

1 INTRODUÇÃO

Uma das atuais prioridades das políticas públicas para o combate às doenças crônico-degenerativas está na educação e conscientização frente à alimentação adequada e mudanças do estilo de vida, como a prática regular da atividade física desde idades precoces. Uma série de evidências experimentais e epidemiológicas têm reforçado que a deficiência nutricional na infância pode aumentar o risco para o desenvolvimento de doenças tais como, obesidade e doenças correlatas (hipertensão, diabetes tipo II, dislipidemias, hiperinsulinemia e outras doenças cardiovasculares) em idades posteriores.

A desnutrição vem sendo apontada como um dos principais fatores “ambientais” implicados na gênese dessas doenças supramencionadas. Os mecanismos subjacentes parecem estar associados ao desequilíbrio oxidativo induzido pela desnutrição durante o período crítico do desenvolvimento do indivíduo.

Sabendo que vários distúrbios cardiovasculares podem estar relacionados com o desbalanço oxidativo no coração induzidas por insultos nutricionais durante o desenvolvimento, o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares de tais enfermidades propicia subsídios para que estratégias de intervenção sejam melhores implementadas. O exercício físico moderado está relacionado a diversas adaptações bioquímicas; já existem estudos na literatura mostrando que indivíduos ativos possuem menor risco de desenvolver obesidade e cardiopatias. Dessa maneira, a prática do exercício físico moderado de forma regular, poderia ser uma prática terapêutica com o intuito de minimizar os possíveis efeitos deletérios induzidos por insultos nutricionais e com menor custo financeiro.

Nesse sentido, o intuito do presente estudo foi verificar se o exercício físico moderado durante a infância (i.e. de 30 a 52 dias de vida) reverte os efeitos deletérios induzidos pela desnutrição proteica durante a gestação e lactação. Como hipótese trabalhamos a seguinte questão:

O exercício físico moderado praticado desde a infância diminui o estresse oxidativo cardíaco causado pela desnutrição proteica na gestação e lactação.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 GERAL

Avaliar o balanço oxidativo no coração de ratos jovens desnutridos submetidos ao treinamento físico moderado em esteira.

1.1.2 ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do treinamento físico moderado no tecido cardíaco de ratos jovens submetidos à desnutrição proteica durante a gestação e lactação sobre:

I – Biomarcadores de estresse oxidativo

1. Peroxidação lipídica (MDA);
2. Oxidação proteica (Carbonilas).

II – Defesa antioxidante enzimática

1. Atividade da enzima antioxidante Superóxido dismutase (SOD);
2. Atividade da enzima antioxidante Catalase (CAT);
3. Atividade da enzima antioxidante Glutathione-S-transferase (GST)

III – Defesa antioxidante não-enzimática

1. Quantificação do balanço REDOX - glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG);
2. Quantificação dos grupos tióis totais (Sulfidrilas).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 DESNUTRIÇÃO

A desnutrição é um estado onde há um desequilíbrio de energia, proteína, dentre outros micro e macronutrientes, ocasionando uma desordem em aspecto bioquímico e fisiológico dos tecidos (STRATTON; GREEN; ELIA, 2003). Em adição, a Organização Mundial de Saúde (2005) caracteriza a desnutrição como o resultado da relação entre alimentação, estado de saúde e condição socioeconômica. Podemos considerar que educação e saúde, a fonte de produção e o acesso à aquisição de alimentos estão intimamente associadas ao estado nutricional do indivíduo (MONTEIRO *et al.*, 2010; MONTEIRO; CONDE, 2000). A desnutrição está intimamente relacionada com aspectos biológicos, sociais e psicológicos como pobreza e abuso de drogas (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002). Estudos ainda demonstram que os efeitos deletérios associados à desnutrição proteica têm fatores agravantes nas gerações seguintes, uma vez que intervenções para uma reabilitação educacional, comportamental e nutricional devem ser propostas de forma intensiva para poder alcançar gerações e diminuir os efeitos da desnutrição (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002).

Estudos epidemiológicos mostraram que aproximadamente 15,5% da população mundial, sendo um terço dessa parte crianças, são atingidas pela desnutrição, constituindo-se um sério problema de saúde pública (MONTEIRO *et al.*, 2006; BITTENCOURT *et al.*, 2009; UNITED NATIONS, 2013).

Segundo o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF; 2016) cinco em cada seis crianças do mundo com menos de dois anos não estão recebendo nutrição adequada para o crescimento e desenvolvimento. O UNICEF mostrou que apenas metade das crianças entre 6 e 23 meses são alimentadas com o mínimo de nutrientes por dia necessários para sua idade, e que, tanto em países desenvolvidos, quanto em desenvolvimento, grandes períodos de amamentação estão associados a níveis mais altos de inteligência. A UNICEF afirmou ainda a necessidade de investimentos governamentais para programas e políticas alimentares que priorizem a nutrição na infância.

No Brasil de acordo com os dados da Pesquisa Nacional de Demografia – PNDS 2006, 7% das crianças menores de cinco apresentam desnutrição crônica (déficit de altura). Quando verificados dados de crianças de cinco a oito anos, 4,1% apresentam desnutrição

aguda (POF 2008-2009) e 6,8% das crianças apresentam desnutrição crônica. E segundo o Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional (SISVAM) no Relatório do Estado Nutricional dos indivíduos acompanhados por período, no Brasil no mês de julho de 2017, cerca de 15,26 % das gestantes apresentaram um estado nutricional de baixo peso, e 17,36 % desse total pertence ao Nordeste do nosso país. Dificuldades no desenvolvimento físico, muscular e ósseo, complicações fisiológicas, imunológicas e neurais são resultados severos que a desnutrição pode causar em crianças (CONDE; MONTEIRO, 2006; BITTENCOURT *et al.*, 2009; UNITED NATIONS, 2012).

A partir de estudos epidemiológicos por volta dos anos 80, Barker *et al.* (1993; 1997), observaram a relação entre o crescimento intrauterino, características fenotípicas e desenvolvimento de doenças cardiovasculares a longo prazo. Uma alimentação pobre em proteínas no período crítico de desenvolvimento afeta diversos tecidos, trazendo efeitos deletérios sobre o crescimento de vários órgãos e consequentemente do indivíduo (HALES, 1997; MILLER; GERMAN, 1999; PARK *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2010).

Wu *et al.* (2013) discutiram a existência de uma correlação com o baixo peso ao nascer e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, metabólicas e endócrinas no decorrer da vida adulta. Estudos em animais já demonstram que proles submetidas a uma ingestão de alimentos pobre em proteínas reflete em alterações metabólicas, como pressão arterial elevada no decorrer do crescimento e alterações nos níveis de catecolaminas (PASSOS *et al.*, 2000).

A desnutrição crônica ou baixa estatura altera a regulação dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos de conservação de energia e depósito de gordura, podendo promover obesidade na vida adulta (SAWAYA *et al.*, 1998; HOFFMAN *et al.*, 2000; SAWAYA *et al.*, 2003; SAWAYA, 2006). Crianças desnutridas e que não conseguem recuperar sua estatura tendem a apresentar um quociente respiratório maior do que as que não sofreram desnutrição. Um quociente respiratório elevado é inversamente proporcional a oxidação de gorduras. A criança cresce menos, ganha menos tecido muscular e ósseo. A desnutrição também afeta outros mecanismos metabólicos, como o de controle da pressão arterial (SAWAYA *et al.*, 1998; HOFFMAN *et al.*, 2000; SAWAYA *et al.*, 2003; SAWAYA, 2006).

Barreto *et al.* (2016) concluíram que a desnutrição em crianças além de diminuições na modulação parassimpática do sistema nervoso autonômico, também reduz a pressão

arterial sistólica e diastólica e eleva a frequência cardíaca em crianças. Outros estudos evidenciam que a deficiência nutricional materna, aumenta o risco para o desenvolvimento da obesidade na geração futura e consequentemente de doenças crônicas degenerativas na idade adulta (HALES e BARKER, 1992; SAWAYA *et al.*, 1995; LEVIN, 2006). Estudos adicionais também relatam que o crescimento e o desenvolvimento da criança não estão relacionados apenas a fatores genéticos, mas também a estímulos do meio, como por exemplo, a falta da prática regular de exercício físico (HALES, 1997; MILLER; GERMAN, 1999; PARK *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2010).

Já é bem estabelecido que estresses ambientais no período de organogênese, período tido como crítico do desenvolvimento, a qual compreende a formação dos órgãos, podem favorecer o aparecimento de doenças (LUCAS, 1991). Segundo Lucas (1991), a nutrição, é um fator ambiental chave, pode ser considerada como um dos mecanismos indutores de “programação”, ou insultos que influencia o estado de saúde de um indivíduo em longo prazo, podendo ser duradouro.

Lucas, Fewtrell e Cole (1999) enfatizam a importância de estudos na linha da compreensão da biologia chamada “programação”, pois achados na influência dos fatores ligados ao período pré-natal interferindo no pós-natal, como no aparecimento de disfunções na vida adulta, seriam de grande importância para o desenvolvimento de políticas públicas baseadas em pesquisas científicas, estimulando um olhar especial para os estudos associados ao período crítico do desenvolvimento (LUCAS, FEWTRELL E COLE 1999). A partir de estudos clínicos, experimentais e epidemiológicos foi observada uma forte tendência ao desenvolvimento de síndrome metabólica em adultos que sofreram insultos tanto farmacológicos como nutricionais, constatando-se que a patogênese não está somente alicerçada na expressão de genes induzida por uma adaptação a mudanças diversas no ambiente (VICKERS, 2011).

Estudos observando os efeitos deletérios da desnutrição proteica durante o desenvolvimento vem mostrando alterações nos níveis de estresse oxidativo em tecidos adultos, que podem acarretar mudanças subsequentes na função desse tecido. Instapad *et al.* (2014) avaliando no sistema cardiovascular, verificou que a desnutrição afetou o controle da pressão arterial e estava associado com o estresse oxidativo (INTAPAD S *et al.*, 2014). Em adição, um estudo em modelo experimental de nosso laboratório, mostrou que a restrição proteica durante a gestação e lactação pode prejudicar a bioenergética mitocondrial, com

aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e diminuição na atividade de enzimas antioxidantes resultando no estresse oxidativo em coração de ratos adultos (NASCIMENTO *et al.*, 2014).

Estudos adicionais do nosso grupo de pesquisa mostraram que as alterações induzidas pela desnutrição podem ser re-moduladas em tecidos centrais e periféricos responsáveis pelo controle da pressão e frequência cardíaca a depender da melhora nos níveis de antioxidantes (SOUSA *et al.*, 2017; BRAZ *et al.*, 2017).

A análise mostrou claramente que o efeito prejudicial da dieta materna com restrição proteica foi revertida quando a idade reprodutiva nas fêmeas foi alcançada onde os níveis de estrogênio apresentavam-se elevados em relação a idade com baixos níveis do hormônio (SOUSA *et al.*, 2017; BRAZ *et al.*, 2017).

Esses dados sugerem que os efeitos deletérios da desnutrição não são definitivos, e que a prática de exercício físico moderado, poderiam reduzir o risco para o desenvolvimento e aparecimento de doenças cardiovasculares induzidas pela desnutrição proteica materna durante períodos críticos do desenvolvimento.

2.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ESTRESSE OXIDATIVO

Radical livre é o termo genérico podendo ser definidos como espécies reativas que são capazes de existência independente, apesar de ter em seu último orbital elétrons desemparelhados (HALLIWELL, 1994). Quimicamente a estabilidade de uma molécula depende do pareamento dos elétrons em suas órbitas, um exemplo é o átomo de hidrogênio com um próton e um único elétron em sua última órbita, sendo assim um importante sequestrador de elétrons de qualquer tipo de biomolécula para alcançar sua estabilidade (HALLIWELL, 1994).

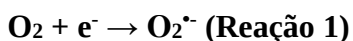
Segundo Halliwell (1994), o surgimento das defesas antioxidantes ocorreu em virtude da maior oferta de moléculas de oxigênio. Nos primórdios da vida, na Terra, a predominância era de organismos anaeróbicos, e que conseguiram se adaptar ao aumento progressivo do oxigênio atmosférico. Os seres que conseguiram evoluir desenvolveram uma forma de sintetizar moléculas para combater as formas tóxicas do oxigênio, desenvolvendo assim um mecanismo de defesa antioxidante. Os seres conhecidos como aeróbicos, são justamente aqueles que além da capacidade de combater, conseguiram desenvolver todo um aparato para

a produção de energia e sobrevivência tendo como a principal organela, a mitocôndria, que é responsável por cerca de 80 % da produção de ATP (HALLIWELL, 1994).

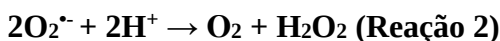
A concentração ideal de oxigênio para um organismo em homeostasia deve ser respeitada, pois o aumento ou uma diminuição pode gerar efeitos prejudiciais. Foi visto que os efeitos deletérios e concentrações ideais de oxigênio nos organismos aeróbios depende de fatores como idade, estado nutricional e estado fisiológico (HALLIWELL, 1994). Na busca de um entendimento mais amplo de como o oxigênio causava danos no metabolismo surgiram teorias e finalmente percebeu-se que as espécies reativas de oxigênio formadas eram as moléculas responsáveis pelos danos observados, sendo então consagrada pela descoberta da superóxido dismutase, enzima responsável pela dismutação de superóxidos formados no organismo (GERSCHMAN K. *et al.*, 1954; FRIDOVICH I., 1986; HALLIWELL, 1994).

Dentre esses radicais livres, mais especificamente as espécies reativas de oxigênio, destacam-se as seguintes moléculas:

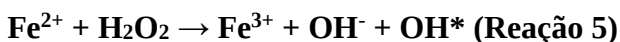
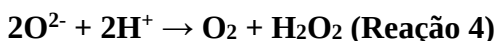
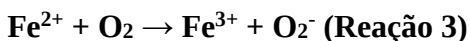
- 1) O ânion superóxido (O_2^-), que é produzido pela redução da molécula de oxigênio, (O_2) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007):



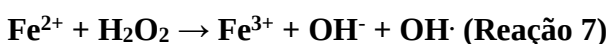
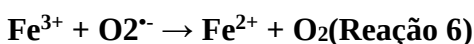
- 2) Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL, 1994):



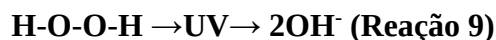
- 3) O radical hidroxila ($OH^\cdot$), formado geralmente pelas reações de fenton ou haber-weiss (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).



Reações Haber-Weiss;



Ou ainda além dessas reações de íons metálicos com H_2O_2 , pode ocorrer a partir de radiação ionizante uma fissão hemolítica do peróxido de hidrogênio. Como esquematizado:



- 4) O peroxinitrito (ONOO^-) obtido pela reação entre o óxido nítrico e o O_2^- (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007):

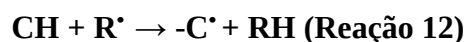


Segundo Halliwell e Gutteridge (2007) mesmo em organismos menos complexos, os níveis de oxigênio podem influenciar tanto de forma favorável como de forma desfavorável esse organismo, podendo o oxigênio assumir configurações reativas que atuam de forma a sequestrar elétrons de compostos importantes do metabolismo desse organismo.

A reatividade dessas espécies depende bastante de como elas estão sendo apresentadas (HALLIWELL, 1994), por exemplo, a formação de peroxinitrito pode ser classificada como uma reação que traz danos às moléculas, pois é formado a partir de dois radicais livres:



Havendo a formação de um radical livre com uma molécula estável, sabendo-se que a maioria das moléculas do nosso organismo são estáveis, isso significa que teria dano as moléculas proporcionando uma reação em cadeia negativa para o organismo. Podendo esses radicais reagir com cadeias laterais de ácidos graxos de lipoproteínas e membranas plasmáticas iniciando o processo de peroxidação lipídica, como adiante:

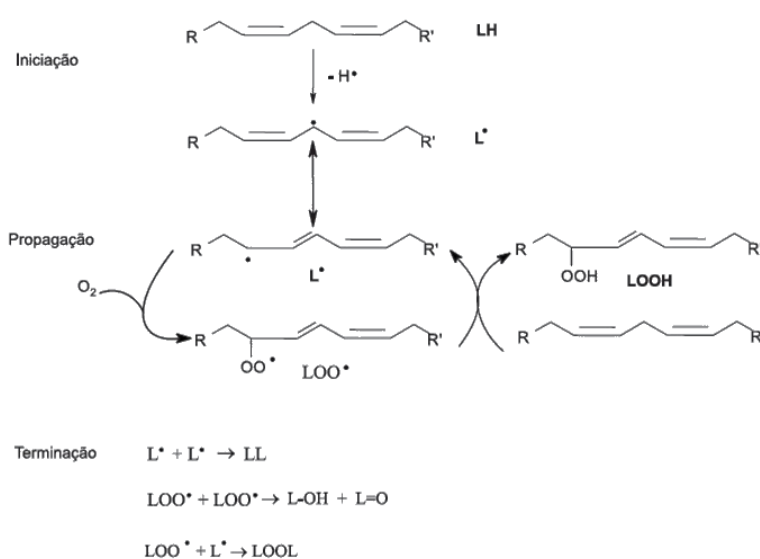


O processo de peroxidação lipídica estão associados com o desenvolvimento de inúmeras doenças, tais como aterosclerose, de mesma forma negativa, quando as espécies reativas de oxigênio reagem com o açúcar desoxirribose e as bases de purina e pirimidina do nosso ácido desoxirribonucleico (DNA) causando danos a biomolécula constantemente presente no câncer e em outras patologias (BECKMAN *et al.*, 1990; HALLIWELL; ARUOMA, 1993; BOUSQUET-SANTOS *et al.*, 2006; SIMMONS, 2006; GIUSSANI *et al.*,

2012; GUPTA *et al*, 2014; NASHED; BALENKO; SINGH, 2014; VARGHESE; PATEL; YADAV, 2017).

Os efeitos das espécies reativas de oxigênio nas membranas, promove a peroxidação lipídica, onde essas moléculas atuam nas ligações lipídicas dos ácidos graxos, produzindo uma variação de produtos e degradação (BECKMAN *et al.*,1990). A propagação, desses efeitos produz danos a lipídeos próximos. Havendo a perda da fluidez das membranas (MACHLIN; BENIDICH, 1987; SOUTHORN; POWIS, 1988).

Figura 1: Esquema das principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica



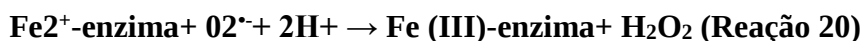
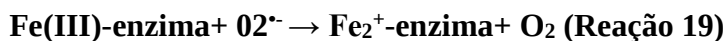
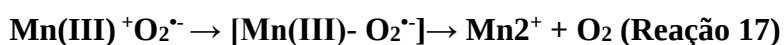
Fonte: LIMA; ABDALLA, 2001.

As espécies reativas de oxigênio estão sendo produzidas o tempo todo nas células tanto para fins metabólicos específicos, como também resultados de quadros patológicos (HALLIWELL, 1994). Para combater o excesso das moléculas reativas e minimizar seus efeitos, existe tanto um sistema de defesa como de reparo. O primeiro atua de forma a estabelecer os níveis fisiológicos de espécies reativas de oxigênio; ao passo que o segundo atua reparando as biomoléculas que chegaram a ser atingidas por essas espécies reativas. Ao nível do DNA, já se tem estudos que associam a atividade da proteína ATM "*ataxia telangectasia mutated*" como a principal enzima de reparo contra os danos do estresse oxidativo (HALLIWELL, 1994; BERRA; MENCK; MASCIIO, 2006; BALZER *et al.*, 2015).

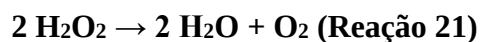
A atuação do sistema antioxidante é primordial para manutenção da vida aeróbica saudável com a manutenção das espécies reativas em níveis fisiológicos. O ânion superóxido, por exemplo, pode reagir com enzimas importantes do nosso metabolismo como, por exemplo, inibindo o complexo dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzida (NADH) desidrogenase, que desempenha papel fundamental na respiração mitocondrial (HALLIWELL, 1994).

Outra relação negativa desses compostos reativos é a reação entre o óxido nítrico e o superóxido tendo como produto dessa reação o peroxinitrito, interferindo na capacidade do óxido nítrico de promover o relaxamento da musculatura lisa dos vasos sanguíneos, induzindo então os quadro patológicos de hipertensão arterial e/ou aterosclerose (CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979; FRIDOVICH, 1986; HALLIWELL, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

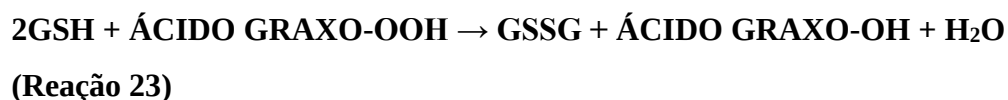
Dentre as defesas antioxidantes, não se identificou uma enzima ou molécula específica para a detoxificação do radical hidroxila, sendo umas das espécies mais danosa para a célula (HALLIWELL, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Entretanto, até o momento, a enzima superóxido dismutase é a primeira forma enzimática de combate à produção de espécies reativas de oxigênio, age por meio da dismutação do íon superóxido, tendo como co-fator ions metálicos:



Outra enzima antioxidante encontrada é a catalase, que possui forma tetraédrica com uma porção heme central. Tem como função catalisar a reação de formação de dióxido e água a partir de peróxido de hidrogênio, na presença de um grupo ferro heme (HALLIWELL, 1994). Encontrada nos peroxissomos, com maior expressão e atividade em tecidos como rins, fígado e nas hemácias, responsável pela seguinte reação (HALLIWELL, 1994):



O sistema das glutathionas é formado tanto por enzimas como pela glutathiona reduzida (GSH) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A enzima glutathiona peroxidase possui uma selenocisteína como centro catalítico responsável pela redução de peróxidos a água, utilizando como co-fator duas moléculas de glutathiona em sua forma reduzida, as quais sofrem oxidação do seu resíduo cisteína e formam glutathiona oxidada (GSSG) por uma ligação disulfeto:

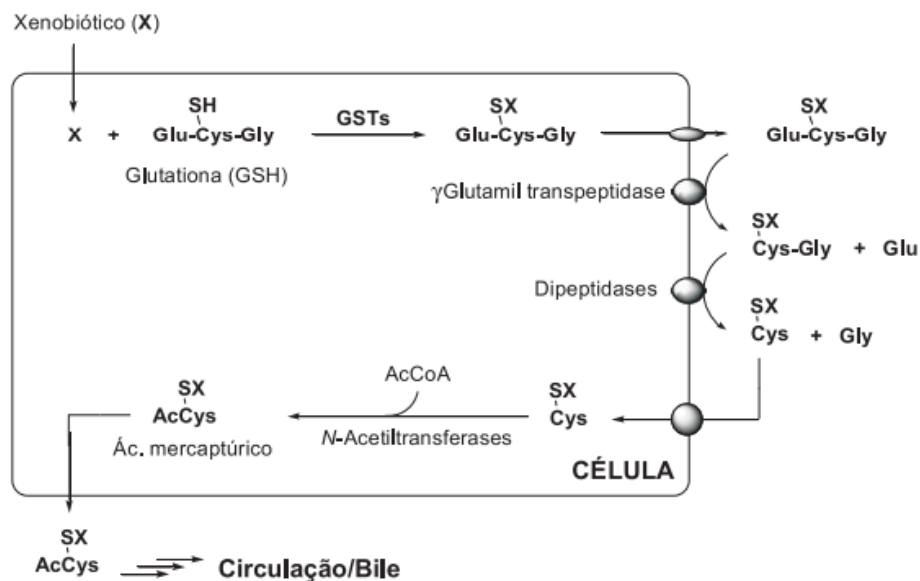


A enzima glutathiona redutase atua na manutenção dos níveis de (GSH) ajudando na atividade da glutathiona peroxidase. Essa enzima é uma flavoproteína que atua regulando os níveis celulares da GSH através da redução da GSSG à GSH, em um processo dependente de Nicotidamina Adenina Dinucleotídeo Fosfato em sua forma reduzida.



É a enzima glutathiona-S-transferase que tem como função a proteção da célula contra agentes tóxicos endógenos e exógenos, contra xenobióticos. Sua atuação é conjunta com a de outras enzimas, como a γ - glutamylcisteína sintetase (γ GluCysS) e a glutathiona sintetase (GS) e seguida de etapas como mostra o esquema a seguir (HALLIWELL; CHIRICO, 1993; HUBER; ALMEIDA; FATIMA; 2008; FERREIRA; LAGRANHA, 2013):

Estudos sugerem que uma deficiência em qualquer uma dessas enzimas de defesa não é tão facilmente revertido por uma alimentação rica em antioxidantes, acarretando o acúmulo de espécies reativas, resultando no processo de envelhecimento celular (HALLIWELL; CHIRICO, 1993; HALLIWELL, 2012).

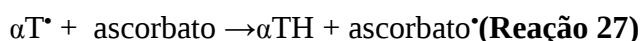
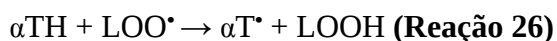
Figura 2: Detoxificação de xenobióticos via ácidos mercaptúricos.

Fonte: HUBER; ALMEIDA; FATIMA; 2008

Uma outra categoria de enzimas responsáveis pela detoxificação do peróxido de hidrogênio são as peroxiredoxinas quais apresentam uma atividade catalítica que permite o peróxido de hidrogênio seja um sinalizador de transição (HALLIWELL, 2012). As peroxiredoxinas (Prxs) são uma família de peroxidases que reduzem os peróxidos, com um resíduo de cisteína conservado (o Cys peroxidático) que serve como o local da oxidação por peróxidos (RHEE; WOO, 2011).



Além dessas defesas antioxidantes supra mencionadas, existe outros agentes antioxidantes derivado da dieta, como por exemplo vitamina E, vitamina C, carotenóides e/ou flavonoides (HALLIWELL; CHIRICO, 1993):



O termo estresse oxidativo é justamente o desequilíbrio entre a produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio e/ou redução da capacidade do sistema de defesa antioxidante que pode ser ocasionado, por exemplo, pela ingestão inadequada de nutrientes; levando o organismo a tentativa de aumento de suas defesas e/ou acionando o sistema de reparo

(GUTTERIDGE, 1986; HALLIWELL; CHIRICO, 1993; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Estudos mostram que a manifestação de algumas patologias tem suas características iniciais associadas as modificações no estado REDOX das células, caracterizado pelo estado de equilíbrio entre Glutathione Oxidada e Glutathione Reduzida (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

2.3 EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO E ESTRESSE OXIDATIVO

A Organização Mundial de Saúde afirma que atividade física fornece benefícios fundamentais para a saúde de crianças, jovens e adultos (WHO, 2011). A inatividade física é um fator de risco chave para a gênese e progressão de doenças crônicas (WHO, 2014).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, na sua Pesquisa Nacional de Saúde - PNS (2013), a prática regular de exercícios físicos ou esportes é considerada como fator de proteção à saúde das pessoas. Ainda assim, no Brasil a proporção de adultos classificados na condição de insuficientemente ativos foi de 46,0%. Estes indivíduos não praticaram atividade física ou praticaram menos do que 150 minutos por semana de atividade física considerando os três domínios: lazer, trabalho e deslocamento para o trabalho. Nas mulheres foram observadas proporções ainda maiores de inatividade. Nos homens estas proporções variaram de 37,3% no Nordeste a 41,0% no Sudeste (IBGE, 2013).

Um trabalho realizado no hospital Metodista de Houston, no Texas (EUA) com pacientes, concluiu que o exercício físico é um componente essencial da reabilitação cardíaca e um tratamento seguro, eficaz e orientado para a melhora da qualidade de vida e diminuição de morbidade em pacientes com insuficiência cardíaca. Ressaltando ainda a adaptação de uma prescrição de exercícios pautada nas preferências, habilidades e individualidades fisiológicas do paciente para uma melhor adesão e prazer ao exercício (ALVAREZ; HANNAWI; GUHA, 2016).

Já está estabelecido que com o treinamento físico de intensidade moderada e de longa duração, há o estímulo para o aumento da capacidade oxidativa no músculo, principalmente a oxidação de ácidos graxos (FARREL *et al.*, 1998; ZONDERLAND *et al.*, 1999). É possível afirmar que a prática regular de exercício físico está intimamente ligada à prevenção de doenças crônico-degenerativas e à promoção da saúde (BOUSQUET-SANTOS *et al.*, 2006).

Também se observam a eficácia do exercício físico na diminuição das complicações cardiovasculares relacionadas à diabetes mellitus (DE ANGELIS *et al.*, 2000). Inclusive na diminuição de danos oxidativos e da produção de pró-oxidantes, otimizando significativamente a defesa antioxidante e aumentando a resistência de tecidos e órgãos contra os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (POLIDORI *et al.*, 2000).

Estudos em modelo animal de insuficiência cardíaca demonstraram que o exercício físico melhora a capacidade funcional do coração. Independentemente das alterações estruturais sofridas durante a insuficiência cardíaca, o estresse oxidativo aumenta, no entanto o exercício físico regula genes que atuam na defesa oxidativa como um agente normalizador desses níveis (GOMES *et al.*, 2016).

O exercício de longa duração e baixa intensidade em pacientes cardíacos não traz riscos, em análise com grupo controle o exercício não mostrou danos a função cardíaca nem alteração nos biomarcadores da função cardíaca, e sim uma diminuição subclínica da contratilidade do ventrículo esquerdo e do enchimento diastólico precoce do ventrículo direito (BENDA *et al.*, 2016). O exercício físico pode melhorar os índices de desempenho cardíaco e pulmonar, tanto em idade média quanto em pacientes idosos com insuficiência cardíaca (ACANFORA *et al.*, 2016). Em dados experimentais, foi já relatado que a combinação do exercício físico com o óleo de coco promove redução da pressão arterial, como ainda atua na redução do estresse oxidativo em ratos com hipertensão espontânea (NAIANE *et al.*, 2013; SCHIMIDT *et al.*, 2014).

Gimenes *et al.* (2015) com um protocolo de exercício de baixa intensidade com duração de oito semanas observou redução do estresse oxidativo miocárdico e melhora na remodelação e função miocárdica em ratos diabéticos de tipo 1, visto que a diabetes induz aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e diminuição da capacidade antioxidante devido à redução da atividade das enzimas antioxidantes. No estudo, o exercício físico de baixa intensidade impediu o aumento da peroxidação lipídica (GIMENES *et al.*, 2015).

O exercício físico exerce também seus efeitos pela supressão de vias inflamatórias e, portanto, inibe fontes proeminentes de geração espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, além de ativar fatores de transcrição sensíveis ao estado REDOX, principalmente como o PGC-1 α , sendo um mecanismo de defesa antioxidante ao regular a expressão e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase, Glutathione Transferase - GPx,

Glutathione Redutase - GSR, Glutathione S Transferase - GST e *Thioredoxin reductase-1* - TrxR1 (SALLAM; LAHER, 2015). Além do controle das proteínas de reparo, complexo do proteossoma e atividade da telomerase (SALLAM; LAHER, 2015).

O exercício atua prevenindo doenças cardíacas, por combater e regular os níveis de estresse oxidativo, sendo assim um agente terapêutico. Dados da literatura demonstraram que o exercício após infarto de miocárdio tem função positiva na remodelação cardíaca através da regulação do sistema de defesa antioxidante e inibição da peroxidação lipídica, com uma reposta somatória a função cardíaca após o infarto. Um estudo em animais mostrou diminuição da peroxidação lipídica e aumento dos níveis da GPx, associados a uma diminuição da área do infarto, indicativo dos efeitos benéficos do exercício físico contra lesões oxidativas no tecido cardíaco em nível de remodelação e modificações nos miócitos (RANJBAR; NAZEM; NAZARI, 2015).

O exercício aumenta o fornecimento e extração de oxigênio no miocárdio, reduz a fibrose miocárdica e a apoptose dos cardiomiócitos, promove a angiogênese, e também melhora a função e sobrevivência de cardiomiócitos em várias doenças cardiovasculares (TAO *et al.*, 2015).

Além dos efeitos no metabolismo cardíaco, o exercício físico auxilia no crescimento e desenvolvimento na infância, modulando sistemas imunológico, nervoso e endócrino (NEMET *et al.*, 2013). Esses efeitos não são privilégio de estudos clínicos, estudos experimentais também mostraram que o exercício físico moderado em ratos juvenis também tem efeito positivo sobre o sistema imunológico, modulando a viabilidade e função dos neutrófilos em ratos jovens (BRAZ *et al.*, 2015).

2.4 EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO E DESNUTRIÇÃO

Estudos evidenciam que a elevação dos níveis pressóricos causados por uma desnutrição proteica no período perinatal é diminuída através do exercício físico, via disponibilidade e/ou liberação de óxido nítrico no endotélio (SÁ *et al.*, 2011).

Não é incomum a desnutrição estar associada à doença pulmonar obstrutiva crônica. A perda de peso e a perda de músculos não se mostra reversível quando combatida apenas com terapia nutricional, no entanto, os resultados apontaram um papel potencial da combinação de suporte nutricional e exercício de baixa intensidade no manejo de pacientes desnutridos com

doença pulmonar obstrutiva crônica, com redução significativa dos níveis de citocinas inflamatórias (SUGAWARA *et al.*, 2010).

Na Áustria, um estudo com idosos, onde a fragilidade imunológica e a desnutrição são muito comuns e podem acarretar sérios riscos para a saúde, tais como aumento da mortalidade, morbidez, dependência e redução da qualidade de vida, o exercício físico associado a uma alimentação adequada se mostrou efetivo para combater os efeitos negativos da desnutrição (DORNER *et al.*, 2013).

Um estudo experimental utilizando restrição proteica materna demonstrou que o exercício físico é capaz de reduzir o impacto negativo da dieta pobre em proteínas sobre o consumo de oxigênio durante a gestação e sobre a taxa de crescimento da prole (AMORIM *et al.*, 2009).

É possível sugerir que estímulos ambientais positivos, como o treinamento físico moderado possa reverter os insultos negativos sofridos no início da vida. Dados já publicados mostram que a desnutrição proteica perinatal prejudica o ganho no peso corporal durante o crescimento e altera a proporção de fibras musculares em animais na idade adulta (LEANDRO *et al.*, 2012). Em contrapartida, o treinamento físico moderado atua como terapia não farmacológica eficaz revertendo os efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre o ganho de peso corporal e que diminuem os efeitos de uma dieta perinatal de baixa proteína sobre a proporção de tipos de fibras no músculo esquelético (LEANDRO *et al.*, 2012).

Os diversos efeitos deletérios que a desnutrição proteica perinatal pode provocar ao organismo, estudos em animais demonstraram que filhotes de ratas desnutridas apresentam um aumento nas concentrações séricas de glicose e colesterol quando na idade adulta e o treinamento físico moderado antes e durante a gestação atenuou os efeitos da desnutrição perinatal sobre o crescimento somático nos níveis séricos de glicose e colesterol na prole (TEBAS *et al.*, 2012).

Segundo Brito *et al.* (2011) o treinamento físico de modo aeróbico com a modalidade natação em fases mais avançadas da vida de animais desnutridos no período de aleitamento mostrou-se, de forma parcial, um fator contribuinte para atenuar as alterações provocadas pela desnutrição, pois aumentou o diâmetro luminal da aorta torácica (BRITO *et al.* 2011).

Estudos realizados em conjunto com nosso grupo de pesquisa apontaram que o exercício físico moderado, em ratos adultos, reduz os danos causados no tecido cardíaco pela

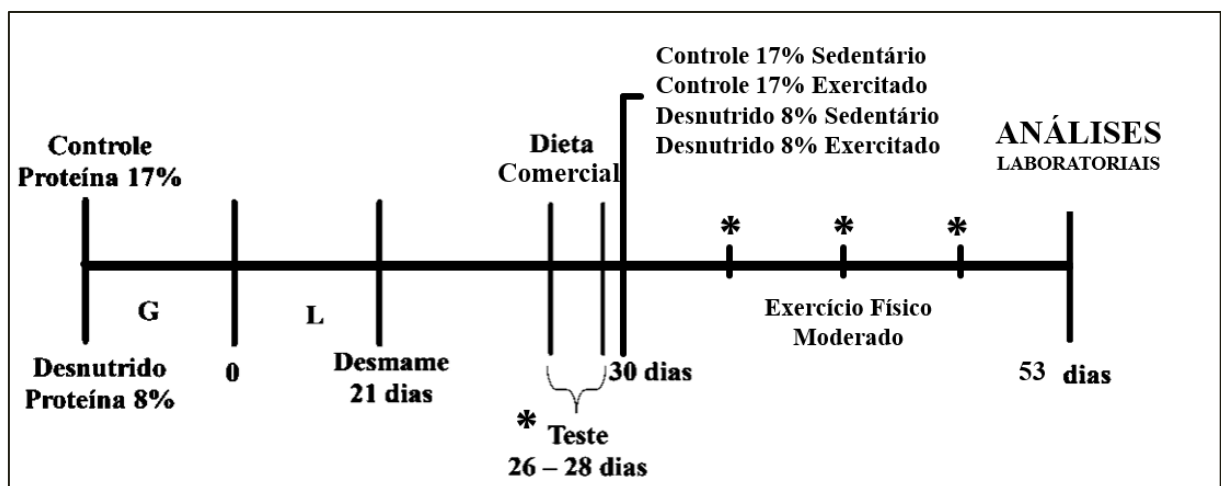
desnutrição proteica no período de gestação e lactação, por aumentar a capacidade de oxidação dos ácidos graxos e metabolismo oxidativo (CARTHAGENES *et al*, 2017). Em adição, vimos que a desnutrição proteica além de prejudicar o metabolismo oxidativo, reduz a capacidade enzimática antioxidante e altera negativamente a morfologia cardíaca, ao passo que o exercício físico moderado foi capaz de reduzir esses efeitos (CARTHAGENES *et al*, 2017).

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS E DIETA

Ratas fêmeas da linhagem Wistar provenientes da colônia do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco foram mantidas em biotério de experimentação com temperatura de 22°C, ciclo claro escuro de 12/12 horas. As ratas foram acasaladas na proporção de 2 fêmeas para 1 macho e a possível gestação foi confirmada através do esfregaço vaginal, correspondendo portanto ao dia zero. As ratas prenhas foram divididas em dois grupos de acordo com a dieta fornecida: controle (C, caseína a 17%) e desnutridas (D, caseína a 8%) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). As fêmeas permaneceram com a manipulação nutricional durante toda a gestação e lactação. Após o nascimento foram selecionados aleatoriamente 8 neonatos machos para composição dos grupos experimentais, estando seu peso entre 6-8g. Após o desmame (21 dias) estes passaram a receber dieta comercial de biotério (Labina), e foram subdivididos em quatro grupos de acordo com a prática ou não de treinamento físico: Controle sedentário (CS); Controle treinado (CT); Desnutrido sedentário (DS) e Desnutrido Treinado (DT). O protocolo de treinamento físico começou quando os animais completaram 30 dias e as análises ocorreram quando os animais completaram cerca de 52 dias (i.e. ao final do período de treino). A manipulação e os cuidados com os animais seguiram as recomendações do COBEA (Processo número: 23076.017809/2014-04).

Figura 3: Modelo Experimental



3.2 PROTOCOLO DE TREINO

Os animais foram submetidos no 26º, 27º e 28º dias de vida a um teste de corrida aeróbia incremental até a fadiga. Onde foi avaliado o desempenho dos animais com progressão da velocidade em 3m/min a cada 3 minutos (BROOKS; WHITE, 1978). A fadiga foi definida como um ponto em que os animais não eram mais capazes de manter o ritmo da esteira por mais de 10 segundos. Após 48 h do teste incremental, os animais dos grupos treinados e desnutrido treinado, foram submetidos a um programa de treinamento físico, em esteira ergométrica para ratos (modelo AVSprojetos) utilizando o seguinte protocolo experimental (60 min/dia, 5 dias/semana, 4 semanas e a 50% da capacidade máxima atingida para os determinados grupos experimentais). Os grupos sedentários permaneceram nas gaiolas, e no mesmo ambiente e tempo dos animais em treinamento (BELLÓ-KEIN *et al.*, 2000; BRAZ *et al.*, 2015).

3.3 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Ao finalizarem o período de treinamento físico e atingirem a idade experimental os animais foram sacrificados e submetidos à cirurgia para a remoção do tecido cardíaco.

3.4 DOSAGEM DE PROTEÍNA

A concentração de proteína da suspensão do tecido foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). O complexo formado com a amostra no método utilizado foi lido em um comprimento de onda de 595 nm. A absorbância foi considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de albumina de soro bovino a 1% foi utilizada como padrão.

3.5 BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

3.5.1 Dosagem de peroxidação lipídica (TBARS):

Para a dosagem de lipoperoxidação foi utilizada a técnica colorimétrica previamente publicada (BUEGE; AUST, 1978), uma técnica utilizada para avaliar oxidação de lipídios, pois o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da peroxidação lipídica, entre eles o malondialdeído e outros aldeídos. Foram adicionados 500 microgramas de proteínas da amostra, ácido tricloroacético 30%(TCA) (p/v) e Tris-HCL 10 mM (pH 7,4), no mesmo

volume, os quais passaram por agitação sequenciais de 1 minuto. Quando totalmente homogeneizadas, as amostras (500 microgramas proteínas) foram centrifugadas por 10 min a 2500xg a 4°C e ao seu sobrenadante, uma alíquota de TBA 0,73% em igual volume foi adicionado. Esta mistura foi incubada por 15 minutos a 100°C e imediatamente resfriada e transferidas para cubetas de quartzo, onde foram quantificadas em espectrofotômetro a uma absorbância de 535nm. Os resultados foram expressos em μm de MDA por mg de proteína (DA SILVA *et al.*, 2014).

3.5.2 Medida dos níveis de oxidação de proteínas (Carbonilas):

A avaliação da oxidação de proteínas foi realizada através da técnica das carbonilas. 1 ML de TCA 30% foi adicionado em 500 microgramas de proteínas da amostra, agitado ao vortex e em seguida levado a centrifuga por 5 minutos a 4000 RPM. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 10mM de 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) e incubado em sala escura a temperatura ambiente por uma hora com agitações programadas a cada 15 minutos. Após período de incubações, as amostras foram lavadas no tampão etil/acetato e centrifugadas três vezes e o pellet ressuscitado em 6M de hidrócloro de guanidina, incubado por 30 minutos a 37°C e a absorbância quantificada a 370nm. Os resultados foram expressos em μm /mg proteína (REZNICK; PACKER, 1994; ZANATTA; MOURA; *et al.*, 2013; ZANATTA *et al.*, 2013).

3.6 AVALIAÇÕES DA DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA

3.6.1 Atividade da enzima antioxidante Superóxido Dismutase (SOD):

A atividade da superóxido dismutase foi avaliada através do método da oxidação da adrenalina, o qual compete com a SOD podendo ser medido em espectrofotômetro a 480nm. Em uma cubeta de quartzo de 1 ML, foram adicionados tampão carbonato 0,1M (pH 10,2), EDTA 0,1mM, 500 microgramas de proteína, e adrenalina 150mM. A diminuição na absorbância foi seguida por 90 segundos a 37°C no comprimento de onda de 480nm e os resultados expressos em U/mg proteína a partir do coeficiente de extinção da adrenalina, $4020\text{m}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (MISRA; FRIDOVICH, 1972).

3.6.2 Atividade da enzima antioxidante Catalase (CAT):

A atividade da catalase foi avaliada através da taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, quantificada na absorção de 240 nm, numa temperatura de 20°C. Em um meio de reação, contendo tampão fosfato 50 mM (pH7,0), 500 microgramas de proteínas e H₂O₂ 0,3mM. A absorbância foi monitorada durante 3 minutos e os resultados expressos em U/mg de acordo com coeficiente de extinção 2,3 microM⁻¹ cm⁻¹ (AEBI, 1984).

3.6.3 Atividade da enzima antioxidante Glutathione-S-Transferase (GST):

A atividade da glutathione-S-transferase foi verificada através do seguinte processo, adição de tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 6,5); EDTA 1mM; GSH 1mM; 500 microgramas de proteína e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 1nM. A atividade da enzima foi avaliada a partir da formação de 2,4-dinitrofenil-s-glutathione (DNP-SG) por minuto a 30°C, o qual foi monitorado via espectrofotômetro em comprimento de onda igual a 340nm. A atividade da enzima foi expressa em U/mg proteína baseada no coeficiente de extinção do CDBN 9,6 mM⁻¹ cm⁻¹ (HABIG et al. 1974a, 1974b).

3.7 AVALIAÇÃO DA DEFESA ANTIOXIDANTE NÃO-ENZIMÁTICA

3.7.1 Quantificação do balanço REDOX (razão GSH/GSSG):

Para se quantificar o estado REDOX, o meio de ensaio foi composto por tampão fosfato 0,1M (pH 8,0) contendo EDTA 5mM, 500 microgramas de proteína os quais foram incubado com o-phthalaldehyde (OPT) 1mg/ML em temperatura ambiente por 15 minutos. Depois de incubado, o ensaio teve sua fluorescência verificada em um comprimento de excitação e emissão de 350nm e 420nm, respectivamente. Para a determinação dos níveis de GSH, as amostras foram comparadas a uma curva padrão de GSH com concentrações conhecidas, e o cálculo foi feito através da equação da reta gerada (HISSIN; HILF, 1976).

Para a determinação dos níveis de GSSG, 500 microgramas de proteína foram primeiramente incubadas com N-ethylmaleimida (NEM) 0,04M, por 30 minutos a temperatura ambiente seguido da adição do tampão NaOH 0,1M ao meio. Após esse

procedimento, as amostras também foram incubadas com o-phthalaldehyde (OPT) 1mg/ML em temperatura ambiente, por 15 minutos e tiveram sua fluorescência comparada a uma curva de concentrações conhecidas de GSSG (HISSIN; HILF, 1976).

3.7.2 Quantificação dos grupamentos Tióis Totais:

A quantificação dos tióis totais foi avaliada através da incubação de 500 microgramas de proteínas com DTNB (10mM de (5,5'-Dithiobis2-Ácido nitrobenzoico)) durante 30 min. A absorbância foi realizada em um comprimento de onda de 412nm conforme descrito por Ellman (1959). O cálculo foi realizado a partir da divisão na absorbância à 412 nm pelo coeficiente de extinção. Vezes a concentração proteica em mg (ELLMAN, 1959).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente os dados passaram por um teste de normalidade (Kalmogorov-Smirnov), para verificação da distribuição gaussiana. O teste de análise de variância realizado foi o (ANOVA) *two-way*, seguido do pós-teste de múltiplas comparações de *Tukey*. O banco de dados foi realizado no programa Excel (versão 2011, Microsoft, USA) e as análises no Graphpad Prisma 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

4 RESULTADOS – ARTIGO SUBMETIDO

Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism



Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism

Moderate Exercise During Early Post-Natal Development in Wistar Rats Reduces the Harmful Effects of Protein Deprivation on Oxidative Stress Markers in the Heart

Journal:	<i>Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Araujo, Diego; UFPE-CAV, Department of Physical Education and Sports Science, Freitas, Cristiane; UFPE-CAV, Graduate Program of Biochemistry and Physiology Lima, Talitta; UFPE-CAV, Department of Physical Education and Sports Science, Pedroza, Anderson; UFPE-CAV, Ferreira, Diorginis; UFPE-CAV, Fernandes, Mariana; UFPE-CAV, Department of Physical Education and Sports Science Sellitti, Donald; Uniformed Services University of the Health Sciences Lagranha, Cláudia; UFPE-CAV, Department of Physical Education and Sports Science,
Is the invited manuscript for consideration in a Special Issue? :	Not applicable (regular submission)
Keyword:	Weaned rats, Physical Exercise, Moderate Training, Low-protein diet

SCHOLARONE™
Manuscripts

<https://mc06.manuscriptcentral.com/apnm-pubs>

Moderate Exercise During Early Post-Natal Development in Wistar Rats Reduces the Harmful Effects of Protein Deprivation on Oxidative Stress Markers in the Heart

Running title: Exercise during childhood as non-pharmacological treatment

Diego Santos de Araujo¹, Cristiane M. Freitas¹, Talitta Arruda Lima², Anderson A. Pedroza¹, Diorginis S. Ferreira², Mariana P. Fernandes², Donald F. Sellitti³, Claudia J. Lagranha^{1,2#}

¹Biochemistry and Physiology Graduate Program, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

²Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry, Department of Physical Education and Sports Science, CAV- Federal University of Pernambuco, Brazil.

³Department of Anatomy, Physiology, and Genetics, School of Medicine, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, MD, USA

#Mailing address:

Claudia J. Lagranha

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

Phone/Fax: (00 55 81) 35233351

E-mail: lagranha@hotmail.com

Key-word: Weaned rats; Physical Exercise; Moderate Training; Low-protein diet

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Abstract

29

30 A maternal diet low in protein results in morphologic and functional damage to the hearts of her
31 offspring. Moderate exercise, on the other hand, is thought to improve heart metabolism and function,
32 improving the overall health in adulthood. Thereby, we speculate that moderate exercise performed
33 during early post-natal development could ameliorate the cardiac damage resulted from a perinatal
34 protein deprivation. We used a rat model of protein restriction during gestation and lactation to assess
35 the effect of moderate post-lactation physical exercise on oxidative stress parameters in the heart.
36 Pregnant rats were divided into two groups: normoprotein (NP) receiving 17% casein in the diet, and
37 low-protein (LP), receiving 8% casein. At 30 days of age, the male offspring born to each group were
38 further subdivided into control (NP and LP) and exercised (ENP and ELP) groups. At approximately
39 55 days of age, the rats were sacrificed and blood and heart were collected for biochemical analysis.
40 We observed significant increases in lipid and protein oxidation, and reduction in enzymatic anti-
41 oxidant systems in the un-exercised rats on LP group. Application of moderate exercise to this group,
42 however, resulted in significant > 2-fold reductions in both lipid and protein oxidation that correlated
43 with an increase in non-enzymatic antioxidant defense and a significant decrease in serum triglycerides.
44 We suggest that cardiac damage occurring in children born to mothers lacking protein during early
45 childhood development could be ameliorated to an extent with moderate physical exercise designed to
46 improve cardiac oxidative balance.

47

48 **Keywords:** Maternal low-protein diet; Childhood exercise; Heart; Oxidative stress

49

50

51 Introduction

52

53 According to World Health Organization, United Nations International Children's Fund and
 54 World Bank Group Interagency estimates, in 2016, 22.9 percent of children under 5 years of age
 55 exhibited low height-for-age (stunting) and 7.7 percent showed low weight-for-height (wasting). These
 56 children may never attain a normal height or normal brain function, and remain vulnerable to disease
 57 and an early death (Group 2017).

58 It has become clear over the last decades that long-term survivors of early malnutrition can
 59 sustain permanent damage resulting in chronic disease in later life, as evidenced by negative
 60 correlations of birth weight with coronary heart disease (Barker et al. 1989) diabetes/impaired glucose
 61 tolerance (Hales et al. 1991) and other chronic diseases, leading some authors to posit a 'fetal origins
 62 hypothesis' to explain the prevalence of several high morbidity diseases of adulthood (Barker 1995).
 63 Cardiovascular disease remains an especially critical consequence of poor early nutrition as it remains
 64 the major cause of death in the developed, and increasingly in the developing world, and a number of
 65 studies have examined the relationship between maternal malnutrition/ poor early diet and such
 66 precursors of cardiovascular disease as endothelial dysfunction and hypertension (Hanson et al. 2005).

67 Experimental studies in rodent models have shown, moreover, that heart disease can be
 68 'developmentally programmed' by nutritional deficits experienced during the intrauterine period
 69 (Barker 1995; Hanson and Gluckman 2005; Thornburg 2015; Zohdi et al. 2015). Similarly, obesity, an
 70 important independent risk factor for cardiovascular disease (Hubert et al. 1983), may be
 71 developmentally programmed through biochemical and structural changes that result from
 72 malnutrition during gestation (Remacle et al. 2004; Bieswal et al. 2006; Remacle et al. 2011).

73 Although much of the nutritional programming for adult cardiovascular disease involves low
 74 protein effects on risk factors such as insulin resistance, serum lipoprotein and elevated blood pressure
 75 (Barker 1995) it has also been shown that protein restriction during the critical perinatal developmental
 76 period can cause direct adverse effects on cardiac morphology, remodeling and muscle function
 77 (Tappia et al. 2013). Tappia et al (2013) have linked the changes in heart muscle to an alteration of
 78 cardiac glucose metabolism, but studies from other laboratories, including our own, point to increased
 79 oxidative stress as a major driver of cardiac damage, and damage to other critical organs associated

with malnutrition during the perinatal period (Nascimento et al. 2014; Ferreira et al. 2016a; Ferreira et al. 2016b; Braz et al. 2017; Ferreira et al. 2018).

Physical exercise, on the other hand, is recognized to lessen the risk of developing cardiovascular disease by reducing risk factors such as obesity and hypertension (Blair et al. 1989; Smith 2010; Youtz et al. 2014). Moreover, it has been shown that exercise up-regulates antioxidant defense mechanisms that lead to an improvement in the cellular resistance to oxidative stress (Ji 2002; Radak et al. 2008; Silva et al. 2017). Exercise, therefore would appear to have potential as a countermeasure against cardiovascular disease resulting from perinatal protein deprivation, in part by up-regulating antioxidant defenses that reduce oxidative stress in the heart.

The efficacy of moderate physical exercise during childhood in protecting protein-restricted offspring from cardiovascular disease, however, remains largely unknown. Therefore, we designed the present study to investigate the effect of moderate physical exercise applied post-weaning to male offspring of protein-deprived rats on oxidative stress parameters and antioxidant mechanisms in the heart.

Material and methods

Drugs and reagents

All drugs and reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and Sovereign (Sao Paulo, Brazil).

Animals and experimental design

All experiments were carried out with offspring from an outbred colony strain of Wistar rats obtained from the Nutrition Department of the Federal University of Pernambuco (Brazil). All experiments were performed in accordance with the guidelines of the Institutional Ethics Committee for Animal Research (approval protocol no. 23076.017809/2014-04), complying with the "Principles of Laboratory Animal Care" published by the National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. Females aged between 80-90 days were mated in a ratio of 1 male to 2 females, and then were checked daily for the appearance of spermatozoa in the vaginal smear to determine the day of conception. Pregnant rats were initially divided into two groups, based on diet: a normoprotein group receiving 17% casein

in the diet (n=4) and a low-protein group receiving 8% casein (n=8) maintained throughout the perinatal period (i.e. gestation and lactation). Both diets had the same energetic value and were prepared at the Laboratory of Dietetic Technic at the Academic Center of Vitoria – the Federal University of Pernambuco-UFPE according to previous studies (Nascimento, Freitas et al. 2014; Ferreira, Liu et al. 2016b; Ferreira, Pedroza et al. 2018). Twenty-four hours after delivery, the litters were standardized to 8 pups each and female pups maintained only to keep the litters at a constant size. No adoption was used in this study. To avoid any variability due to litter influence, at weaning, four male animals from each mother were randomly chosen to continue in the study. At 30 days of age, offspring from mothers that had received either a low-protein diet or a normal diet were again divided into separate groups, this time based on the presence or absence of a moderate physical training regimen. A total of four groups were formed: control – 1) normoprotein diet without exercise (NP); 2) low-protein diet without exercise (LP); 3) normoprotein diet with exercise (ENP); and 4) low-protein diet with exercise (ELP).

122

123 *Treadmill exercise*

Indirect maximal oxygen consumption was determined 3 times throughout the protocol to standardize the exercise at 60% indirect VO_2 max. The first measurement was taken one day before beginning treadmill exercise, the second VO_2 max test was taken 9 days after the initial test, and the third 9 days later to assure that a moderate exercise intensity was attained. Exercise was performed for 1 h per day, 5 days per week, during a 4 week period. The protocol was as follows: 5 min warm-up (average speed of 0.3 to 0.4 km/h), 50 min main speed (average speed of 0.5 to 0.7 km/h, at the beginning and towards the end of protocol training), and 5 min cool-down (average speed of 0.3 to 0.4 km/h). This protocol has effectively improved cardiovascular (Bello-Klein et al. 2000) and immune system (Braz et al. 2015) performance in juvenile rats in previous studies. The activity of citrate synthase, an important Krebs cycle enzyme commonly used as a marker of oxidative metabolism was measured at the end of the training period. More than 40 years ago, Holloszy and his colleagues first reported that endurance exercise training improves oxidative metabolism and it is generally recognized that endurance exercise training elevates the activities of mitochondrial enzymes (Holloszy et al. 1970). Rats from the control groups were placed on the treadmill as were the exercised animals, but the treadmill remained off. Twenty-four hours after the last exercise session, all rats had their hearts collected for biochemical analysis. All animals completed the experimental protocol.

140

141 *Serum lipids*

142 At 55 days of age, trunk bloods of all four groups were collected for measurement of total
 143 serum cholesterol and triglycerides. After 5 min of centrifugation of blood at 903 x g, serum samples
 144 were assayed using an automatic analyzer for clinical chemistry (Pioway, model PW2280, China)
 145 according to the manufacturer's protocol (Biotecnic, MG, Brazil).

146

147 *Heart preparation for biochemical analysis*

148 Rat hearts were collected as previously described (Nascimento, Freitas et al. 2014). Atria were
 149 removed and discarded and the ventricles were completely homogenized in cold buffer containing 50
 150 mM-TRIS and 1mM-EDTA (pH 7.4), with the addition of 1 mM-sodium orthovanadate and 1.1 mM
 151 phenylmethyl sulfonyl fluoride using a sampling homogenizer (Tecnal, Sao Paulo, Brazil). Ventricular
 152 homogenates were centrifuged at 4000 RPM for 10 min at 4°C and the supernatants were saved.
 153 Protein concentration was determined in the supernatant using the Bradford protocol (Bradford 1976)
 154 and this supernatant was used for the biochemical analyses described below.

155

156 *Evaluation of malondialdehyde production*

157 A total of 0.2 mg/ml ventricle homogenate was used to measure malondialdehyde production
 158 (MDA) following reaction with thiobarbituric acid (TBA) at 100 °C according to the method of Draper
 159 (Draper et al. 1993). In the TBA reaction, malondialdehyde (MDA) or MDA-like substances react to
 160 produce a pink pigment with a maximum absorption at 535 nm. The reaction was developed by the
 161 sequential addition to the sample of 30% trichloroacetic acid (TCA) and Tris-HCl (3mM) followed by
 162 thorough mixing and centrifugation at 2500 x g for 10 min. Supernatant was transferred to another tube
 163 and 0.8% TBA (v/v) was added before mixing and boiling for 30 min. After cooling, the absorbance of
 164 the organic phase was read at 535 nm in a spectrophotometer. Results were expressed as nmol per mg
 165 of protein (Cardoso et al. 2012).

166

167 *Evaluation of protein oxidation*

168 Reactive oxygen species (ROS) can induce the oxidation of amino acid residues on proteins,
 169 thus yielding protein carbonyls. Protein carbonyl content, the most widely used marker of oxidative

modification of proteins, was measured here using the procedures described by Reznick and Packer (1994). Briefly, TCA of 30% (w/v) was added to the sample on ice, and then this mixture was centrifuged for 15 min at 1180 x g. The pellet was suspended in 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine and immediately incubated in a dark room for 1 h with shaking every 15 min. Thereafter, the samples were centrifuged and washed three times with ethyl/acetate buffer, and the final pellet was suspended in 6 M guanidine hydrochloride and incubated for 5 min in a water bath, at 37°C. Absorbance of the reaction product was measured at 370 nm. Results were expressed as $\mu\text{mol/mg protein}$ (Reznick et al. 1994; Braz et al. 2016).

178

179 *Measurement of Superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) activity*

The determination of total superoxide dismutase enzyme activity (t-SOD) was performed according to the method of Misra and Fridovich (Misra et al. 1972). Supernatants (0.1 mg/ml) collected from homogenized ventricle following centrifugation were incubated with 880 μl sodium carbonate (0.05%, pH 10.2, 0.1 mM EDTA) at 37°C before development of the reaction by the addition of 30 mM epinephrine (in 0.05% acetic acid) and determined by measuring the kinetics of the inhibition of adrenalin auto-oxidation at 480 nm expressed as U/mg protein (Misra and Fridovich 1972; Cardoso et al. 2014).

187

188 *Measurement of Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) activity*

CAT activity was measured according to the method described by Aebi (1984). The principle of the assay is based on the determination of the rate constant (k) of H_2O_2 decomposition, which under our conditions of temperature and pH, was defined as 4.6×10^7 . The assay mix consisted of 50 mM-phosphate buffer (pH 7.0), 300 mM H_2O_2 and 0.3 mg/mL sample. The rate constant of the enzyme was determined by measuring change in absorbance (at 240 nm) per minute over a 4-minute period at 30 °C. CAT activity was expressed as U/mg protein (Aebi 1984).

195

196 *Measurement of Glutathione-S-Transferase (GST) (EC 2.5.1.18) activity*

GST activity was measured as described previously by Habig (1974). Two hundred μg of protein was added to 0.1 M-phosphate buffer (pH 6.5) containing 1mM-EDTA at 30° C and the assay was initiated with 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and 1 mM glutathione reduced (GSH). The

formation of 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione was monitored at 340 nm absorbance and enzymatic activity was defined as the amount of protein required to catalyze the formation of 1 μmol -2,4-dinitrophenyl S-glutathione (Habig et al. 1974; da Silva et al. 2015).

203

204 *Measurement of citrate synthase (CS) (EC 2.3.3.16) activity*

CS activity was determined as previously described (Wiegand et al. 1986). For citrate synthase activity, 0.3 mg/ml of sample was incubated in a reaction mixture containing (in mM) 100 Tris-HCl (pH 8.1), 1 MgCl_2 , 1 EDTA, 0.2 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ($\epsilon=13.6 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), 0.1 acetyl-CoA, and 0.5 oxaloacetate at 25 °C. CS activity was measured by assessing the rate of change in absorbance at 412 nm over a period of 3 min at 30 s intervals (Braz, Freitas et al. 2016).

211

212 *Measurement of Redox Status (GSH and GSSG)*

We first analyzed each glutathione compound separately. To assess GSH levels, the samples were diluted 10-fold in 0.1 M phosphate buffer containing 5 mM-EDTA (pH 8.0) and an aliquot from the diluted sample was incubated with 1mg/ml o-Phthaldialdehyde (OPT) at room temperature for 15 min and the fluorescence intensity was assessed at 350 excitation and 420 nm emission wavelengths, respectively.

To determine glutathione oxidized (GSSG) levels, the samples were incubated with 0.04 M N-ethylmaleimide for 30 min in RT followed by addition of 0.1 M NaOH buffer up to 0.2 mL. Aliquots of the mix were incubated with OPT and fluorescence intensity assessed as described for GSH. Both GSH and GSSG values were compared to standard curves with known concentrations of GSH and GSSG and the Redox State determined as the ratio of GSH/GSSG (Hissin et al. 1976; Braz, Emiliano et al. 2017).

224

225 *Measurement of total sulfhydryl (SH) groups*

Quantification of sulfhydryls was based on the reduction of DTNB by thiols as described by Aksenov and Markesberkv (2001). Briefly, an aliquot of the homogenate (200 μg of protein) was incubated in the dark with 30 μL of DTNB 10 mM and a final volume of 1 mL was obtained with the addition of extraction buffer (pH 7.4). Absorbance at 412 nm was read in a spectrophotometer LIBRA

230 S12 UV / VISIBLE. Results were expressed as mmol/mg of protein (Ellman 1959; Aksenov et al.
231 2001; Ferreira, Pedroza et al. 2018).

232

233 *Statistical analysis*

234 Analyses were performed using GraphPad Prism, version 6.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). For
235 nonparametric data, the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test were used; for parametric
236 data, two-way ANOVA followed by the Tukey post-test were used. Values are expressed as mean $\pm$
237 standard error of mean (SEM). Comparisons were considered as statistically significant at $p \leq 0.05$.

238

239 **Results**

240 *Serum lipids*

241 Table 1 compares serum cholesterol and triglyceride levels among the four groups receiving normal
242 protein or low protein either with or without the addition of an exercise regimen. Results show that the
243 protein content of the maternal diet had no effect on the serum content of either lipid. However the
244 addition of exercise to rats born to either normal protein or protein-deprived mothers resulted in
245 approximately 10% and 30% reductions in cholesterol and triglycerides, respectively, with only the
246 difference in triglycerides reaching significance.

247

248 *Confirmation of effect of exercise on citric acid cycle*

249 To confirm that the exercise regimen employed was sufficient to alter cardiac metabolic rate, we
250 measured citrate synthase in rat hearts from all four groups (Figure 1). Results showed that exercise
251 increased citric synthase in ventricles the in the NP and LP animals by approximately 3-fold and 2-fold,
252 respectively, compared with their respective controls, confirming that the level of exercise employed
253 achieved the desired goal of increasing cardiac metabolism.

254

255 *Oxidative stress biomarkers*

256 Measurements of lipid peroxidation and protein oxidation were made to assess the degree of oxidative
257 stress in the ventricle in each group (Figure 2). Results showed that an LP diet significantly elevated
258 levels of both oxidized lipid (Fig 2A) and oxidized protein (Fig 2B) by approximately 2-fold compared
259 to their respective normal protein controls. Moreover, although exercise had no effect on either lipid or

protein oxidation in normally fed animals, it significantly reduced the LP-associated increases these parameters back toward normal levels (Fig 2A and B), suggesting that moderate exercise regimen applied in this study was sufficient to protect the ventricles of low-protein animals from oxidative damage.

Enzymatic antioxidant system

The antioxidant enzymes, SOD, CAT, and GST are responsible for the protection of cells from oxidative damage caused by ROS formation (Halliwell et al. 2007), and we and others have shown them to be significantly reduced with a low protein diet (Nascimento, Freitas et al. 2014; Rodriguez-Rodriguez et al. 2017). Fig 3 shows that consistent with the increased oxidative damage to protein and lipid noted above, the activities of these antioxidant enzymes were overall significantly lower in the inadequately nourished animals compared to controls. Only GST measured in the LP group did not differ from its control (Fig 3C). SOD and CAT, on the other hand, were reduced approximately 18% in the protein-deprived animals (SOD: NP control vs LP control, $p = 0.0056$; CAT: NP control vs LP control, $p = 0.0053$, $N = 8$ per group).

Non-enzymatic antioxidant system

In addition to the enzymatic system, ROS-induced damage is also managed by non-enzymatic means, with GSH and the thiol group representing the two major compounds involved in reducing oxidative stress. Measurement of these anti-oxidant compounds (Figure 4) in the four treatment groups showed that most non-enzymatic means of controlling oxidative stress in the heart ventricles were significantly increased by moderate exercise. Moreover, exercise was able to restore the significantly elevated GSSG level in the LP group back toward its value in the unexercised NP group (Fig 4B). Similarly, exercise raised the GSH/GSSG ratio in the LP group approximately 3-fold to a level matching the ratio in the exercised NP group (Fig 4c).

Discussion

Current epidemiologic and clinical data support the hypothesis that a poor maternal diet during a critical period of early development encompassing both gestation and lactation increases the occurrence of cardiovascular and other chronic, non-infectious diseases in those mothers' offspring

later in life (Fattal-Valevski et al. 2001; Gluckman et al. 2007; Barker et al. 2009). A large body of clinical and experimental data, moreover, suggests that physical exercise can counteract the deleterious effects of maternal malnutrition on cardiovascular and related metabolic diseases (Smith 2010; Lee et al. 2012; Youtz, Isfort et al. 2014; Tan et al. 2017). In the present study we examined the effects of post-natal physical training on cardiac REDOX status in juvenile offspring that had suffered perinatal nutritional insult. The data show for the first time that moderate physical exercise during the juvenile period counteracts the damaging effects of maternal low protein on cardiac oxidative stress in the rat. These findings suggest that moderate physical exercise in childhood may be useful as an inexpensive strategy to prevent long-term cardiac injury due to maternal low-protein restriction by restoring normal oxidative function in heart muscle.

The contribution of developmental malnutrition to adult disease is often explained by the developmental origins of health and disease hypothesis, a theory proposing that nutritional insult during fetal and early post-natal development induces certain physiologic adaptations in the individual that allow that individual to survive in an adverse postnatal environment (e.g., one with limited food resources) (Hanson et al. 2008). A number of studies have suggested that these theoretically beneficial adaptive responses for early postnatal life may eventually lead to an increase in the risk for chronic diseases in adulthood as, for example, when an individual with permanent changes in energy utilization due to low protein in utero is later exposed to abundant food resources (Gluckman et al. 2008; Nettle et al. 2013; Lin 2018).

Earlier studies have addressed the concept of using moderate physical training as a possible treatment for the maladaptation caused by perinatal undernutrition, and have demonstrated that adaptations in the individual induced by nutritional insult can be effectively re-modulated by the effects of physical exercise on several cell types (Fidalgo et al. 2013; Gatford et al. 2014; Mathias et al. 2014; Senna et al. 2015). Moreover, moderate exercise protocols have been shown to ameliorate abnormalities in cardiac metabolism, due at least in part to the beneficial modulation of lipid profiles (Jones et al. 1967; Enger et al. 1980; Cullinane et al. 1982; Botezelli et al. 2011; Kawamoto et al. 2016; Kim et al. 2017). The results of the present study corroborate this previous work and suggest that the cardioprotection due to exercise may be due in part to changes in cardiac oxidative stress.

A number of earlier studies have suggested that cardiac damage can be induced by oxidative stress (Chuang et al. 2014; Yancey et al. 2015; Cuevas-Duran et al. 2017). Tarry-Adkins *et*

320 *al.* previously demonstrated that maternal poor nutrition diet induces oxidative stress in the heart, and
 321 suggest that this effect may contribute to the development of disease in adulthood (Tarry-Adkins *et al.*
 322 2013). In addition, a study from our laboratory demonstrated in adult rats that had suffered nutritional
 323 deprivation during the perinatal period of development, an impairment of mitochondrial function (i.e.
 324 decrease in mitochondrial oxygen consumption and increase in ROS-production) associated with a
 325 marked oxidative stress in hearts (Nascimento, Freitas *et al.* 2014). Taking together the present data and
 326 the literature, we can suggest that moderate physical training in childhood can to some degree prevent
 327 the deleterious effects of undernutrition by increasing antioxidant defenses (primarily of the non-
 328 enzymatic variety) and diminishing oxidative stress in adult organs. These results corroborate and
 329 extend the multiple studies demonstrating that exercise is a positive health modulator (Sanchis-Gomar
 330 *et al.* 2012; Fiuza-Luces *et al.* 2013; Ji *et al.* 2016; Maessen *et al.* 2016; Poljsak *et al.* 2016; Fan *et al.*
 331 2017; Del Pozo-Cruz *et al.* 2018; Fiuza-Luces *et al.* 2018).

332 The present data also corroborate the findings of Horowitz *et al.* who demonstrated that endurance
 333 training increases the skeletal muscle expression of citrate synthase, concomitant with increased
 334 mitochondrial oxidative capacity (Horowitz *et al.* 2000). Our results also support those of Laker *et al.*,
 335 who using an experimental rat model of intrauterine growth restriction, showed that treadmill exercise
 336 training increases skeletal muscle citrate synthase enzymatic activity in the muscle of the
 337 undernourished offspring (Laker *et al.* 2012). Based on these results, we can speculate that moderate
 338 physical training can induce an energy metabolic re-adaptation in the heart reflecting an increased
 339 capacity for mitochondrial metabolism, thus minimizing the pathological effect of an early nutritional
 340 insult to the heart.

341

342 **Conclusion**

343 A maternal low-protein diet in female rats results in negative changes in the cardiac redox status of
 344 their offspring. Moderate physical training of the offspring during the juvenile stage of development
 345 restores cardiac oxidative balance toward normal. Based on these results we speculate that early
 346 intervention with moderate physical training in children who had suffered from poor nutrition in utero
 347 or in early childhood can delay or prevent the occurrence of chronic diseases of developmental origin.

348

349 **Acknowledgement**

The authors are thankful to FACEPE and CNPq (Foundation for the Support of Science and Research from Pernambuco State—Brazil, APQ-0765-4.05/10; -1026-4.09/12; Universal-408403/2016) for the financial support to acquire the equipment and reagents used in this work. We are also grateful to CAPES, CNPQ and FACEPE that provided scholarships.

References

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol* **105**: 121-6
- Aksenov, M.Y. and Markesbery, W.R. (2001). Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **302**: 141-5. S0304394001016366 [pii]
- Barker, D.J. (1995). Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* **311**: 171-4
- Barker, D.J., Osmond, C., Kajantie, E., and Eriksson, J.G. (2009). Growth and chronic disease: findings in the Helsinki Birth Cohort. *Ann Hum Biol* **36**: 445-58. 10.1080/03014460902980295
- Barker, D.J., Winter, P.D., Osmond, C., Margetts, B., and Simmonds, S.J. (1989). Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* **2**: 577-80. S0140-6736(89)90710-1 [pii]
- Bello-Klein, A., Lagranha, C.J., Bock, P., Bello, A.A., Khaper, N., and Singal, P.K. (2000). Submaximal exercise training in postnatal rats: Hemodynamic and oxidative stress changes. *Exp Clin Cardiol* **5**: 149-153
- Bieswal, F., Ahn, M.T., Reusens, B., Holvoet, P., Raes, M., Rees, W.D., and Remacle, C. (2006). The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity (Silver Spring)* **14**: 1330-43. 14/8/1330 [pii] 10.1038/oby.2006.151
- Blair, S.N., Kohl, H.W., 3rd, Paffenbarger, R.S., Jr., Clark, D.G., Cooper, K.H., and Gibbons, L.W. (1989). Physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy men and women. *JAMA* **262**: 2395-401
- Botezelli, J.D., Cambri, L.T., Ghezzi, A.C., Dalia, R.A., PP, M.S., Ribeiro, C., Voltarelli, F.A., and Mello, M.A. (2011). Different exercise protocols improve metabolic syndrome markers, tissue triglycerides content and antioxidant status in rats. *Diabetol Metab Syndr* **3**: 35. 10.1186/1758-5996-3-35
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54. S0003269776699996 [pii]
- Braz, G.R., Ferreira, D.S., Pedroza, A.A., da Silva, A.I., Sousa, S.M., Pithon-Curi, T.C., and Lagranha, C. (2015). Effect of moderate exercise on peritoneal neutrophils from juvenile rats. *Appl Physiol Nutr Metab* **40**: 959-62. 10.1139/apnm-2015-0056

- 394 Braz, G.R., Freitas, C.M., Nascimento, L., Pedroza, A.A., da Silva, A.I., and Lagranha, C. (2016).
 395 Neonatal SSRI exposure improves mitochondrial function and antioxidant defense in rat
 396 heart. *Appl Physiol Nutr Metab* **41**: 362-9.10.1139/apnm-2015-0494
 397
- 398 Braz, G.R.F., Emiliano, A.S., Sousa, S.M., Pedroza, A.A.S., Santana, D.F., Fernandes, M.P., da
 399 Silva, A.I., and Lagranha, C.J. (2017). Maternal low-protein diet in female rat heart: possible
 400 protective effect of estradiol. *J Dev Orig Health Dis* **8**: 322-330.10.1017/S2040174417000058
 401
- 402 Cardoso, H.D., dos Santos Junior, E.F., de Santana, D.F., Goncalves-Pimentel, C., Angelim,
 403 M.K., Isaac, A.R., Lagranha, C.J., Guedes, R.C., Beltrao, E.I., Morya, E., Rodrigues, M.C.,
 404 and Andrade-da-Costa, B.L. (2014). Omega-3 deficiency and neurodegeneration in the
 405 substantia nigra: involvement of increased nitric oxide production and reduced BDNF
 406 expression. *Biochim Biophys Acta* **1840**: 1902-12.10.1016/j.bbagen.2013.12.023
 407
- 408 Cardoso, H.D., Passos, P.P., Lagranha, C.J., Ferraz, A.C., Santos Junior, E.F., Oliveira, R.S.,
 409 Oliveira, P.E., Santos Rde, C., Santana, D.F., Borba, J.M., Rocha-de-Melo, A.P., Guedes, R.C.,
 410 Navarro, D.M., Santos, G.K., Borner, R., Picanco-Diniz, C.W., Beltrao, E.I., Silva, J.F.,
 411 Rodrigues, M.C., and Andrade da Costa, B.L. (2012). Differential vulnerability of substantia
 412 nigra and corpus striatum to oxidative insult induced by reduced dietary levels of essential
 413 fatty acids. *Front Hum Neurosci* **6**: 249.10.3389/fnhum.2012.00249
 414
- 415 Chuang, C.Y., Degendorfer, G., and Davies, M.J. (2014). Oxidation and modification of
 416 extracellular matrix and its role in disease. *Free Radic Res* **48**: 970-
 417 89.10.3109/10715762.2014.920087
 418
- 419 Cuevas-Duran, R.E., Medrano-Rodriguez, J.C., Sanchez-Aguilar, M., Soria-Castro, E., Rubio-
 420 Ruiz, M.E., Del Valle-Mondragon, L., Sanchez-Mendoza, A., Torres-Narvaez, J.C., Pastelin-
 421 Hernandez, G., and Ibarra-Lara, L. (2017). Extracts of *Crataegus oxyacantha* and *Rosmarinus*
 422 *officinalis* Attenuate Ischemic Myocardial Damage by Decreasing Oxidative Stress and
 423 Regulating the Production of Cardiac Vasoactive Agents. *Int J Mol Sci*
 424 **18**.10.3390/ijms18112412
 425
- 426 Cullinane, E., Siconolfi, S., Saritelli, A., and Thompson, P.D. (1982). Acute decrease in serum
 427 triglycerides with exercise: is there a threshold for an exercise effect? *Metabolism* **31**: 844-7
 428 da Silva, A.I., Braz, G.R., Silva-Filho, R., Pedroza, A.A., Ferreira, D.S., Manhaes de Castro, R.,
 429 and Lagranha, C. (2015). Effect of fluoxetine treatment on mitochondrial bioenergetics in
 430 central and peripheral rat tissues. *Appl Physiol Nutr Metab* **40**: 565-74.10.1139/apnm-2014-
 431 0462
 432
- 433 Del Pozo-Cruz, B., Carrick-Ranson, G., Reading, S., Nolan, P., and Dalleck, L.C. (2018). The
 434 relationship between exercise dose and health-related quality of life with a phase III cardiac
 435 rehabilitation program. *Qual Life Res* **27**: 993-998.10.1007/s11136-018-1784-9
 436
- 437 Draper, H.H., Squires, E.J., Mahmoodi, H., Wu, J., Agarwal, S., and Hadley, M. (1993). A
 438 comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of
 439 malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med* **15**: 353-63
 440 Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* **82**: 70-7
 441 Enger, S.C., Stromme, S.B., and Refsum, H.E. (1980). High density lipoprotein cholesterol,
 442 total cholesterol and triglycerides in serum after a single exposure to prolonged heavy
 443 exercise. *Scand J Clin Lab Invest* **40**: 341-5.10.3109/00365518009092653
 444

- 445 Fan, W. and Evans, R.M. (2017). Exercise Mimetics: Impact on Health and Performance. *Cell*
446 *Metab* **25**: 242-247.10.1016/j.cmet.2016.10.022
447
- 448 Fattal-Valevski, A., Bernheim, J., Leitner, Y., Redianu, B., Bassan, H., and Harel, S. (2001).
449 Blood pressure values in children with intrauterine growth retardation. *Isr Med Assoc J* **3**:
450 805-8
- 451 Ferreira, D.J., da Silva Pedroza, A.A., Braz, G.R., da Silva-Filho, R.C., Lima, T.A., Fernandes,
452 M.P., Doi, S.Q., and Lagranha, C.J. (2016a). Mitochondrial bioenergetics and oxidative status
453 disruption in brainstem of weaned rats: Immediate response to maternal protein restriction.
454 *Brain Res.*10.1016/j.brainres.2016.04.049
455
- 456 Ferreira, D.J.S., Pedroza, A.A., Braz, G.R.F., Fernandes, M.P., and Lagranha, C.J. (2018).
457 Mitochondrial dysfunction: maternal protein restriction as a trigger of reactive species
458 overproduction and brainstem energy failure in male offspring brainstem. *Nutr Neurosci*: 1-
459 11.10.1080/1028415X.2018.1444543
460
- 461 Ferreira, D.S., Liu, Y., Fernandes, M.P., and Lagranha, C.J. (2016b). Perinatal low-protein diet
462 alters brainstem antioxidant metabolism in adult offspring. *Nutr Neurosci* **19**: 369-
463 375.10.1179/1476830515Y.0000000030
464
- 465 Fidalgo, M., Falcao-Tebas, F., Bento-Santos, A., de Oliveira, E., Nogueira-Neto, J.F., de Moura,
466 E.G., Lisboa, P.C., de Castro, R.M., and Leandro, C.G. (2013). Programmed changes in the
467 adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are
468 attenuated by maternal moderate-low physical training. *Br J Nutr* **109**: 449-
469 56.10.1017/S0007114512001316
470 S0007114512001316 [pii]
471
- 472 Fiuza-Luces, C., Diez-Bermejo, J., Fernandez-de la Torre, M., Rodriguez-Romo, G., Sanz-Ayan,
473 P., Delmiro, A., Munguia-Izquierdo, D., Rodriguez-Gomez, I., Ara, I., Dominguez-Gonzalez, C.,
474 Arenas, J., Martin, M.A., Lucia, A., and Moran, M. (2018). Health Benefits of an Innovative
475 Exercise Program for Mitochondrial Disorders. *Med Sci Sports*
476 *Exerc.*10.1249/MSS.0000000000001546
477
- 478 Fiuza-Luces, C., Garatachea, N., Berger, N.A., and Lucia, A. (2013). Exercise is the real polypill.
479 *Physiology (Bethesda)* **28**: 330-58.10.1152/physiol.00019.2013
480 28/5/330 [pii]
481
- 482 Gatford, K.L., Kaur, G., Falcao-Tebas, F., Wadley, G.D., Wlodek, M.E., Laker, R.C., Ebeling,
483 P.R., and McConnell, G.K. (2014). Exercise as an intervention to improve metabolic outcomes
484 after intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **306**: E999-
485 1012.10.1152/ajpendo.00456.2013
486 ajpendo.00456.2013 [pii]
487
- 488 Gluckman, P.D., Hanson, M.A., Beedle, A.S., and Spencer, H.G. (2008). Predictive adaptive
489 responses in perspective. *Trends Endocrinol Metab* **19**: 109-10; author reply
490 112.10.1016/j.tem.2008.02.002
491
- 492 Gluckman, P.D., Lillycrop, K.A., Vickers, M.H., Pleasants, A.B., Phillips, E.S., Beedle, A.S.,
493 Burdge, G.C., and Hanson, M.A. (2007). Metabolic plasticity during mammalian development
494 is directionally dependent on early nutritional status. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 12796-
495 800.10.1073/pnas.0705667104

- 496 Group, U.W.W.B. (2017). Level and Trends in child malnutrition WHO 1: 1-16
- 497 Habig, W.H., Pabst, M.J., andJakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first
- 498 enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* **249**: 7130-9
- 499 Hales, C.N., Barker, D.J., Clark, P.M., Cox, L.J., Fall, C., Osmond, C., andWinter, P.D. (1991).
- 500 Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* **303**: 1019-22
- 501 Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (2007). **Free Radicals in Biology and Medicine**. United
- 502 Kingdom: Oxford UK.
- 503 Hanson, M. and Gluckman, P. (2005). Endothelial dysfunction and cardiovascular disease:
- 504 the role of predictive adaptive responses. *Heart* **91**: 864-6.10.1136/hrt.2004.047381
- 505
- 506 Hanson, M.A. and Gluckman, P.D. (2008). Developmental origins of health and disease: new
- 507 insights. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **102**: 90-3.10.1111/j.1742-7843.2007.00186.x
- 508
- 509 Hissin, P.J. and Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and
- 510 reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* **74**: 214-26.0003-2697(76)90326-2 [pii]
- 511
- 512 Holloszy, J.O., Oscai, L.B., Don, I.J., andMole, P.A. (1970). Mitochondrial citric acid cycle and
- 513 related enzymes: adaptive response to exercise. *Biochem Biophys Res Commun* **40**: 1368-
- 514 73.0006-291X(70)90017-3 [pii]
- 515
- 516 Horowitz, J.F., Leone, T.C., Feng, W., Kelly, D.P., andKlein, S. (2000). Effect of endurance
- 517 training on lipid metabolism in women: a potential role for PPARalpha in the metabolic
- 518 response to training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**: E348-55
- 519 Hubert, H.B., Feinleib, M., McNamara, P.M., andCastelli, W.P. (1983). Obesity as an
- 520 independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the
- 521 Framingham Heart Study. *Circulation* **67**: 968-77
- 522 Ji, L.L. (2002). Exercise-induced modulation of antioxidant defense. *Ann N Y Acad Sci* **959**: 82-
- 523 92
- 524 Ji, L.L., Kang, C., andZhang, Y. (2016). Exercise-induced hormesis and skeletal muscle health.
- 525 *Free Radic Biol Med* **98**: 113-122.10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.025
- 526
- 527 Jones, N.L. and Havel, R.J. (1967). Metabolism of free fatty acids and chylomicron
- 528 triglycerides during exercise in rats. *Am J Physiol* **213**: 824-
- 529 8.10.1152/ajplegacy.1967.213.4.824
- 530
- 531 Kawamoto, R., Katoh, T., Ninomiya, D., Kumagi, T., Abe, M., andKohara, K. (2016). Synergistic
- 532 association of changes in serum uric acid and triglycerides with changes in insulin resistance
- 533 after walking exercise in community-dwelling older women. *Endocr Res* **41**: 116-
- 534 23.10.3109/07435800.2015.1094085
- 535
- 536 Kim, D.D., Lang, D.J., Warburton, D.E., Barr, A.M., Smith, G.N., Thornton, A.E., White, R.F.,
- 537 Honer, W.G., andProcysyn, R.M. (2017). Effects of Exercise on Serum Triglycerides and
- 538 Symptoms of Schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* **37**: 273-
- 539 274.10.1097/JCP.0000000000000648
- 540
- 541 Laker, R.C., Wlodek, M.E., Wadley, G.D., Gallo, L.A., Meikle, P.J., andMcConell, G.K. (2012).
- 542 Exercise early in life in rats born small does not normalize reductions in skeletal muscle PGC-
- 543 1alpha in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **302**: E1221-
- 544 30.10.1152/ajpendo.00583.2011
- 545
- 546 ajpendo.00583.2011 [pii]

- 547
548 Lee, D.C., Sui, X., Church, T.S., Lavie, C.J., Jackson, A.S., and Blair, S.N. (2012). Changes in
549 fitness and fatness on the development of cardiovascular disease risk factors hypertension,
550 metabolic syndrome, and hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* **59**: 665-
551 72.10.1016/j.jacc.2011.11.013
552 S0735-1097(11)05026-1 [pii]
553
554 Lin, Y.J. (2018). Metabolic syndrome in children and adolescents born premature and small-
555 for-gestational age: A scenario of Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD).
556 *Pediatr Neonatol* **59**: 109-110.10.1016/j.pedneo.2018.02.009
557
558 Maessen, M.F., Verbeek, A.L., Bakker, E.A., Thompson, P.D., Hopman, M.T., and Eijssvogels,
559 T.M. (2016). Lifelong Exercise Patterns and Cardiovascular Health. *Mayo Clin Proc* **91**: 745-
560 54.10.1016/j.mayocp.2016.02.028
561
562 Mathias, P.C., Elmhiri, G., de Oliveira, J.C., Delayre-Orthez, C., Barella, L.F., Tofolo, L.P.,
563 Fabricio, G.S., Chango, A., and Abdennebi-Najar, L. (2014). Maternal diet, bioactive
564 molecules, and exercising as reprogramming tools of metabolic programming. *Eur J Nutr* **53**:
565 711-22.10.1007/s00394-014-0654-7
566
567 Misra, H.P. and Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of
568 epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* **247**: 3170-5
569 Nascimento, L., Freitas, C.M., Silva-Filho, R., Leite, A.C., Silva, A.B., da Silva, A.I., Ferreira,
570 D.S., Pedroza, A.A., Maia, M.B., Fernandes, M.P., and Lagranha, C. (2014). The effect of
571 maternal low-protein diet on the heart of adult offspring: role of mitochondria and oxidative
572 stress. *Appl Physiol Nutr Metab* **39**: 880-7.10.1139/apnm-2013-0452
573
574 Nettle, D., Frankenhuys, W.E., and Rickard, I.J. (2013). The evolution of predictive adaptive
575 responses in human life history. *Proc Biol Sci* **280**: 20131343.10.1098/rspb.2013.1343
576 rspb.2013.1343 [pii]
577
578 Poljsak, B. and Milisav, I. (2016). NAD⁺ as the Link Between Oxidative Stress, Inflammation,
579 Caloric Restriction, Exercise, DNA Repair, Longevity, and Health Span. *Rejuvenation*
580 *Res*.10.1089/rej.2015.1767
581
582 Radak, Z., Chung, H.Y., and Goto, S. (2008). Systemic adaptation to oxidative challenge
583 induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med* **44**: 153-9.S0891-5849(07)00055-X [pii]
584 10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.029
585
586 Remacle, C., Bieswal, F., Bol, V., and Reusens, B. (2011). Developmental programming of
587 adult obesity and cardiovascular disease in rodents by maternal nutrition imbalance. *Am J*
588 *Clin Nutr* **94**: 1846S-1852S.10.3945/ajcn.110.001651
589 ajcn.110.001651 [pii]
590
591 Remacle, C., Bieswal, F., and Reusens, B. (2004). Programming of obesity and cardiovascular
592 disease. *Int J Obes Relat Metab Disord* **28 Suppl 3**: S46-53.0802800 [pii]
593 10.1038/sj.ijo.0802800
594
595 Reznick, A.Z. and Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric
596 method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* **233**: 357-63

- Rodriguez-Rodriguez, P., Lopez de Pablo, A.L., Garcia-Prieto, C.F., Somoza, B., Quintana-Villamandos, B., Gomez de Diego, J.J., Gutierrez-Arzapalo, P.Y., Ramiro-Cortijo, D., Gonzalez, M.C., and Arribas, S.M. (2017). Long term effects of fetal undernutrition on rat heart. Role of hypertension and oxidative stress. *PLoS One* **12**: e0171544.10.1371/journal.pone.0171544
- Sanchis-Gomar, F., Garcia-Gimenez, J.L., Perez-Quilis, C., Gomez-Cabrera, M.C., Pallardo, F.V., and Lippi, G. (2012). Physical exercise as an epigenetic modulator: Eustress, the "positive stress" as an effector of gene expression. *J Strength Cond Res* **26**: 3469-72.10.1519/JSC.0b013e31825bb594
- Senna, S.M., Torres, M.K., Lopes, D.A., Alheiros-Lira, M.C., de Moura, D.B., Pereira, V.R., de Aguiar, F.C., Jr., Ferraz, J.C., and Leandro, C.G. (2015). Moderate physical training attenuates perinatal low-protein-induced spleen lymphocyte apoptosis in endotoxemic adult offspring rats. *Eur J Nutr*.10.1007/s00394-015-0925-y
- Silva, S.D., Jr., Jara, Z.P., Peres, R., Lima, L.S., Scavone, C., Montezano, A.C., Touyz, R.M., Casarini, D.E., and Michelini, L.C. (2017). Temporal changes in cardiac oxidative stress, inflammation and remodeling induced by exercise in hypertension: Role for local angiotensin II reduction. *PLoS One* **12**: e0189535.10.1371/journal.pone.0189535
- Smith, J.K. (2010). Exercise and cardiovascular disease. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* **10**: 269-72.BSP/CHDDT/E-Pub/00030 [pii]
- Tan, S., Chen, C., Sui, M., Xue, L., and Wang, J. (2017). Exercise Training Improved Body Composition, Cardiovascular Function, and Physical Fitness of 5-Year-Old Children With Obesity or Normal Body Mass. *Pediatr Exerc Sci* **29**: 245-253.10.1123/pes.2016-0107
- Tappia, P.S., Guzman, C., Dunn, L., and Aroutiounova, N. (2013). Adverse cardiac remodeling due to maternal low protein diet is associated with alterations in expression of genes regulating glucose metabolism. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **23**: 130-5.10.1016/j.numecd.2011.03.010
- S0939-4753(11)00090-1 [pii]
- Tarry-Adkins, J.L., Martin-Gronert, M.S., Fernandez-Twinn, D.S., Hargreaves, I., Alfaradhi, M.Z., Land, J.M., Aiken, C.E., and Ozanne, S.E. (2013). Poor maternal nutrition followed by accelerated postnatal growth leads to alterations in DNA damage and repair, oxidative and nitrosative stress, and oxidative defense capacity in rat heart. *FASEB J* **27**: 379-90.10.1096/fj.12-218685
- Thornburg, K.L. (2015). The programming of cardiovascular disease. *J Dev Orig Health Dis* **6**: 366-76.10.1017/S2040174415001300
- S2040174415001300 [pii]
- Wiegand, G. and Remington, S.J. (1986). Citrate synthase: structure, control, and mechanism. *Annu Rev Biophys Chem* **15**: 97-117.10.1146/annurev.bb.15.060186.000525
- Yancey, D.M., Guichard, J.L., Ahmed, M.I., Zhou, L., Murphy, M.P., Johnson, M.S., Benavides, G.A., Collawn, J., Darley-Usmar, V., and Dell'Italia, L.J. (2015). Cardiomyocyte mitochondrial oxidative stress and cytoskeletal breakdown in the heart with a primary volume overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **308**: H651-63.10.1152/ajpheart.00638.2014

- 648 ajpheart.00638.2014 [pii]
649
650 Youtz, D.J., Isfort, M.C., Eichenseer, C.M., Nelin, T.D., andWold, L.E. (2014). In vitro effects of
651 exercise on the heart. *Life Sci* **116**: 67-73.10.1016/j.lfs.2014.08.015
652
653 Zohdi, V., Lim, K., Pearson, J.T., andBlack, M.J. (2015). Developmental programming of
654 cardiovascular disease following intrauterine growth restriction: findings utilising a rat model
655 of maternal protein restriction. *Nutrients* **7**: 119-52.10.3390/nu7010119
656 nu7010119 [pii]
657
658
659

Draft

660 Table 1

	NP	ENP	LP	ELP
Cholesterol	88.32 ± 3.78	80.96 ± 5.50	89.65 ± 7.85	79.57 ± 4.71
Triglycerides	201.77 ± 18.16	130.32 ± 16.72*	202.59 ± 19.25	122.10 ± 11.58*

661

662

Draft

663 **Figure Captions**

664

665 **Table 1:** Serum cholesterol and triglycerides in the male rat offspring of mothers receiving either a
 666 low-protein diet or normal diet during the gestational and lactation periods, and either exercised or not
 667 exercised for 4 weeks as described in Methods, beginning at 30 days of age.: normo-protein diet; LP:
 668 low-protein diet; E: exercised group. Data are shown as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ vs. non-exercised; (NP
 669 control vs NP exercised, N=6 per group; LP control vs LP exercised, N=4 and 6 per group,
 670 respectively).

671

672 **Figure 1:** Effect of maternal low-protein diet and moderate physical training during childhood on
 673 citrate synthase activity in male offspring. NP: normoprotein diet; LP: low-protein diet. Data are shown
 674 as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$. (NP control vs NP, N=6 per group; LP control vs LP
 675 exercised, N=6 per group).

676

677 **Figure 2:** Effect of maternal low-protein diet and moderate physical training during childhood on
 678 cardiac oxidative stress biomarkers in male offspring. Lipid peroxidation evaluated by MDA levels (A)
 679 and Protein oxidation evaluated by carbonyl levels (B). NP: normoprotein diet; LP: low-protein diet.
 680 Data are shown as mean $\pm$ SEM. **** $p < 0.0001$. (NP control vs LP control, N= 8 per group; LP
 681 control vs LP exercised, N= 8 and 6 per group, respectively).

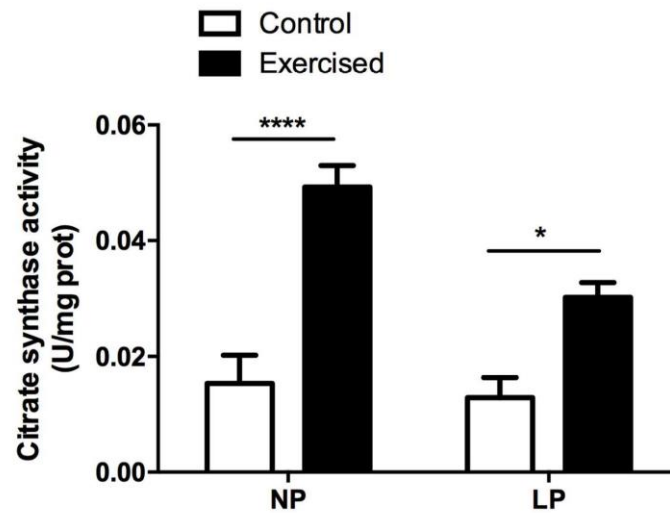
682

683 **Figure 3:** Effect of maternal low-protein diet and moderate physical training on enzymatic antioxidant
 684 defense in male offspring. Superoxide dismutase-SOD activity (A); Catalase-CAT activity (B) and
 685 Glutathione-S-transferase-GST activity (C). NP: normoprotein diet; LP: low-protein diet. Data are
 686 shown as mean $\pm$ SEM. ** $p < 0.01$.

687

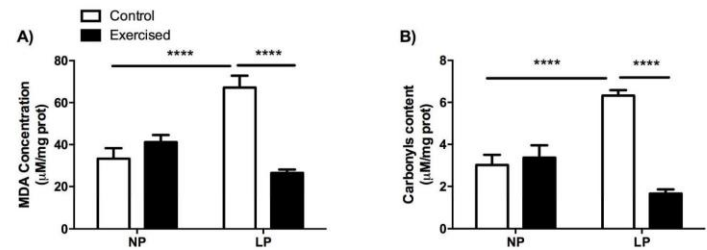
688 **Figure 4:** Effect of maternal low-protein diet and moderate physical training during childhood on
 689 cardiac REDOX status in male offspring. Reduced glutathione - GSH (A); oxidized glutathione -
 690 GSSG (B), GSH/GSSG ratio (C), and total thiols - SH (D). NP: normo-protein diet; LP: low-protein
 691 diet. Data are shown as mean $\pm$ SEM. ** $p < 0.01$.

692



Effect of maternal low-protein diet and moderate physical training during childhood on citrate synthase activity in male offspring. NP: normoprotein diet; LP: low-protein diet. Data are shown as mean + SEM. * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$. (NP control vs NP, $N=6$ per group; LP control vs LP exercised, $N=6$ per group).

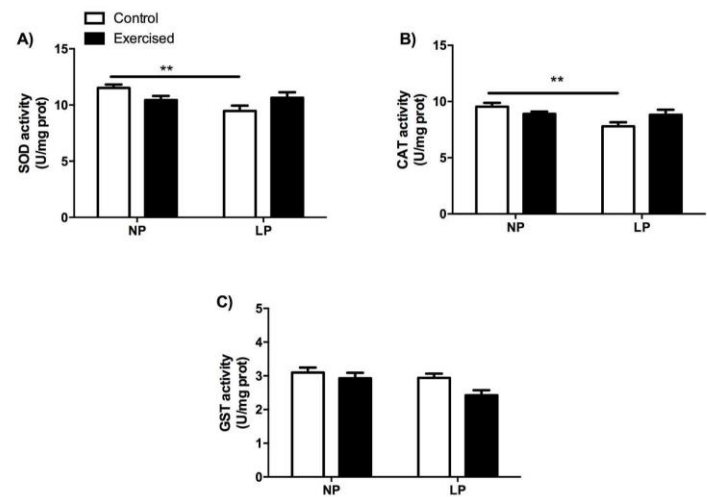
108x77mm (300 x 300 DPI)



Effect of maternal low-protein diet and moderate physical training during childhood on cardiac oxidative stress biomarkers in male offspring. Lipid peroxidation evaluated by MDA levels (A) and Protein oxidation evaluated by carbonyl levels (B). NP: normoprotein diet; LP: low-protein diet. Data are shown as mean + SEM. **** p<0.0001. (NP control vs LP control, N= 8 per group; LP control vs LP exercised, N= 8 and 6 per group, respectively).

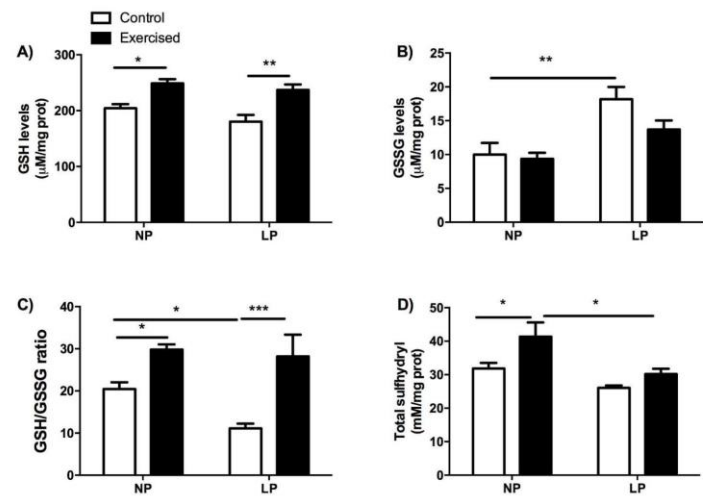
226x82mm (300 x 300 DPI)

Draft



Effect of maternal low-protein diet and moderate physical training on enzymatic antioxidant defense in male offspring. Superoxide dismutase-SOD activity (A); Catalase-CAT activity (B) and Glutathione-S-transferase-GST activity (C). NP: normoprotein diet; LP: low-protein diet. Data are shown as mean + SEM. ** $p < 0.01$.

226x157mm (300 x 300 DPI)



Effect of maternal low-protein diet and moderate physical training during childhood on cardiac REDOX status in male offspring. Reduced glutathione - GSH (A); oxidized glutathione - GSSG (B), GSH/GSSG ratio (C), and total thiols - SH (D). NP: normo-protein diet; LP: low-protein diet. Data are shown as mean + SEM. ** p<0.01.

228x158mm (300 x 300 DPI)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo conclui que a restrição proteica na gestação e lactação pode induzir um maior risco a doenças crônicas uma vez que propicia o aumento do quadro de estresse oxidativo cardíaco, associado ao desbalanço no estado REDOX em coração de ratos jovens. Adicionalmente concluimos que um protocolo de exercício físico moderado é capaz de atenuar os danos causados pela desnutrição. Com esse estudo, sugerimos que o investimento em políticas públicas relacionadas à adesão a prática de exercício físico moderado configuram uma importante terapia não farmacológica capaz de minimizar o crescente número de doenças crônicas degenerativas.

REFERÊNCIAS

- ACANFORA, D. et al. **Exercise training effects on elderly and middle-age patients with chronic heart failure after acute decompensation: A randomized, controlled trial.** *International Journal of Cardiology*, v. 225, p. 313-323, 2016.
- AEBI, H. **Catalase in vitro.** *Methods Enzymol*, v. 105, p. 121–126, 1984.
- ALVAREZ, P.; HANNAWI, B.; GUHA, A. **Exercise and heart failure: advancing knowledge and improving care.** *Metodista DeBakey Cardiovasc J.*, v. 12, n. 2, p. 110-115, 2016.
- AMORIM, M. F. et al. **Can physical exercise during gestation attenuate the effects of a maternal perinatal low-protein diet on oxygen consumption in rats?** *Experimental Physiology*, v. 94, n. 8, p. 906-913, 2009.
- BALZER, J. et al. **Non-Thermal Dielectric Barrier Discharge (DBD) Effects on Proliferation and Differentiation of Human Fibroblasts Are Primary Mediated by Hydrogen Peroxide.** *Plus One*, v. 10, 2015.
- BARKER, D. J. P. **Maternal Nutrition, Fetal Nutrition, and Disease in Later Life.** *Nutrition*, v. 13, n. 9, p. 807-813, 1997.
- BARKER, D. J. P.; OSMOND, C.; SIMMONDS, S. J.; et al. **The relation of small head circumference and thinness at bii to death from cardiovascular disease in adult life.** *Br. Med. J.*, p. 306:422, 1993.
- BARRETO, G. S. C. et al. **Impact of malnutrition on cardiac autonomic modulation in children.** *J. Pediatr.*, v. 92, n. 6, p. 638-644, 2016.
- BECKMAN, J S. et al. **Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide.** *Proc Natl Acad Sci.*, v. 87, p. 1620–1624, 1990.
- BELLÓ-KLEIN, A. et al. **Effect of moderate exercise on peritoneal neutrophils from juvenile rats.** *Exp. Clin. Cardiol.*, v. 5, n. 3, p. 149-153, 2000.
- BENDA, N. M. M. et al. **Impact of prolonged walking exercise on cardiac structure and function in cardiac patients versus healthy controls.** *European Journal of Preventive Cardiology*, p. 1-9, 2016.
- BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; MASCIO, P. D. **Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular.** *Quim. Nova*, v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.
- BITTENCOURT, S. A. et al. **Care for malnourished children: na analysis of Brazilian National Health Service Hospital Information System data.** *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant. Recife*, v. 9, n. 3, p. 263-273, 2009.

BOUSQUET-SANTOS, K. et al. **Resistance Training Improves Muscle Function and Body Composition in Patients With Hyperthyroidism.** Arch. Phys. Med. Rehabil., v. 87, p. 1123-1130, 2006.

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

BRAZ, G. R. et al. **Effect of moderate exercise on peritoneal neutrophils from juvenile rats.** Appl. Physiol. Nutr. Metab., v. 40, p. 959-962, 2015.

BRAZ, G. R. F. et al. **Maternal low-protein diet in female rat heart: possible protective effect of estradiol.** Journal of Developmental Origins of Health and Disease, v. 8, n. 3, p. 322-330, 2017.

BRITO, V. C. et al. **Impact of Malnutrition and Moderate Aerobic Training on the Structure of Arterial Wall in Aging Rats.** Ver. Bras. Med. Esporte, v.17, n. 4, p. 279-283, 2011.

BROOKS, G. A.; WHITE, T. P. **Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise.** J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol., v. 45, p. 1009-1015, 1978.

BUEGE, J. A. Aust, S. D. **Microsomal lipid peroxidation.** Methods Enzymol., v. 52, p. 302–310, 1978.

CARTHAGENES, D. S. et al. **Moderate physical training counterbalances harmful effects of low-protein diet on heart: metabolic, oxidative and morphological parameters.** Motriz: rev. educ. Fis., v. 23, n. 3, 2017.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. **Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.** Physiol Rev. v. 59:527-605, 1979.

CONDE, W. L.; MONTEIRO, C. A. **Body mass index cutoff points for evaluation of nutritional status in Brazilian children and adolescents.** Jornal de Pediatria, v. 82, n. 4, p. 266-272, 2006.

DA SILVA, A. I. et al. **Fluoxetine treatment of rat neonates significantly reduces oxidative stress in the hippocampus and in behavioral indicators of anxiety later in postnatal life.** Can. J. Physiol. Pharmacol., v. 92, p. 330-337, 2014.

DE ANGELIS, K. L. D. et al. **Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 33, p. 635-641, 2000.

DORNER, T. E. et al. **Nutritional intervention and physical training in malnourished frail community-dwelling elderly persons carried out by trained lay “buddies”: study protocol of a randomized controlled trial.** BMC Public Health, v. 13, 2013.

ELLMAN, G. L. **Tissue sulfhydryl groups.** Arch Biochem Biophys, v. 82, p. 70–77, 1959.

FARREL, S. W. et al. **Influências dos níveis de aptidão cardiorrespiratória e outros preditores sobre a mortalidade por doença cardiovascular em homens.** *Medicine e Science in Sport e Exercise*, v. 30, n. 6, p. 899-905, 1998.

FERREIRA, D. J. S.; LAGRANHA, C. J. **Oxidative imbalance: A biochemical mechanism associated with cardiovascular disorders induced early in life.** *Neurobiologia*, v. 76, p. 50-60, 2013.

FRIDOVICH, I. **Superoxide dismutases.** *Methods Enzymol*, v. 58, p. 61-97, 1986.

GERSCHMAN, K. et al. **Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common.** *Science*, v. 119, p. 623-626, 1954.

GIMENES, C. **Low Intensity Physical Exercise Attenuates Cardiac Remodeling and Myocardial Oxidative Stress and Dysfunction in Diabetic Rats.** Hindawi Publishing Corporation, 2015.

GIUSSANI, D. A. et al. **Developmental Programming of Cardiovascular Dysfunction by Prenatal Hypoxia and Oxidative Stress.** *Plos One*, v. 7, n. 2, 2012.

GOMES, M. J. et al. **Beneficial Effects of Physical Exercise on Functional Capacity and Skeletal Muscle Oxidative Stress in Rats with Aortic Stenosis-Induced Heart Failure.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

GUPTA, R. K. **Oxidative Stress and Antioxidants in Disease and Cancer: A Review.** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 15, 4405-4409, 2014.

GUTTERIDGE, J. M. C. **Aspects to consider when detecting and measuring lipid peroxidation.** *Free Radic. Res. Commun.*, v. 1, n. 3, p. 173-184, 1986.

HABIGa, W. H. et al. **The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver.** *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 71, p. 3879-3882, 1974.

HABIGb, W. H. et al. **Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation.** *J. Biol. Chem.*, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

HALES, C. N. **Metabolic consequences of intrauterine growth retardation.** *Acta Radiatr.*, v. 423, p. 184-187, 1997.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. **Type2(non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis.** *Diabetologia*, v. 35, p. 595-601, 1992.

HALLIWELL, B. **Free Radicals and Antioxidants: A Personal View.** *Nutrition Reviews*, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HALLIWELL, B. **Free radicals and antioxidants: updating a personal view.** *Nutrition Reviews*, v. 70, n. 5, p. 257-265, 2012.

HALLIWELL, B. G.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radical in biology and medicine.** New York: United States by Oxford University Press; 2007.

HALLIWELL, B.; ARUOMA, O. I. **DNA and free radicals**. Chichester: Ellis-Harwood, 1993.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. **Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance**. Am. J. Clin. Nutr., v. 57, p. 715-725, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**, 2nd ed. Oxford, England: Clarendon Press, 1989.

HISSIN, P. J.; HILF, R. **A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues**. Anal Biochem., v. 74, n. 1, p. 214–226, 1976.

HOFFMAN, D. J. **Why are nutritionally stunted children at increased risk of obesity? Studies of metabolic rate and fat oxidation in shantytown children from São Paulo, Brazil**. Am. J. Clin. Nutr., v. 72, p.702-707, 2000.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FATIMA, A. **Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos**. Quim. Nova, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

IBGE. **Pesquisa Nacional de Saúde: Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas**. 2013.

INTAPAD, S. et al. **Sex Differences in the Developmental Origins of Cardiovascular Disease**. Physiology, v. 29, p. 122-132, 2014.

LEANDRO, C. G. et al. **Moderate physical training attenuates muscle-specific effects on fibre type composition in adult rats submitted to a perinatal maternal low-protein diet**. Eur. J. Nutr., v. 51, p. 807-815, 2012.

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

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. **Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 37, n. 3, p.294-303, 2001.

LUCAS, A. **Programming by early nutrition in man**. Ciba Found Symp., v. 156, p. 38-50, 1991.

LUCAS, A.; FEWTRELL, M. S.; COLE, T. J. **Fetal origins of adult disease-tue hypothesis revisited**. BMJ, v. 319, p. 245-249, 1999.

MACHLIN, L. J.; BENIDICH, A. **Free radical tissue damage: protective role of antioxidante nutrientes**. The FASEB Journal, v. 1, n. 6, p.441-445, 2018.

MILLER, J. P.; GERMAN, R. Z. **Protein Malnutrition Affects the Growth Trajectories of the Craniofacial Skeleton in Rats**. J. Nutr., v. 129, n. 11, p. 2061-2069, 1999.

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

MONTEIRO, C. A. et al. **Narrowing socioeconomic inequality in child stunting: the Brazilian experience, 1974–2007.** Bull World Health Organ., v. 88, p. 305–311, 2010.

MONTEIRO, C. A.; CONDE, W. L. **Secular trends in malnutrition and obesity among children in S. Paulo city, Brazil (1974-1996).** Rev. Saúde Pública, v. 34, n. 6, p. 52-61, 2000.

MONTEIRO, D. A., ALMEIDA, J. A., RANTIN, F. T., KALININ, A. L. **Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, Brycon cephalus, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion).** Comp. Biochem. Physiol. C., v. 143, p. 141–149, 2006.

MORGANE, J. P.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. **Effect of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation.** Neurosci. Biobehav. Rev., v. 26, p. 471-483, 2002.

NAIANE, F. B. A. et al. **Coconut oil supplementation and physical exercise improves baroreflex sensitivity and oxidative stress in hypertensive rats.** Appl. Physiol. Nutr. Metab., v. 40, p. 393-400, 2015.

NASCIMENTO, L.; FREITAS, C. M.; SILVA-FILHO, R.; LEITE, A. C.; SILVA, A. B.; DA SILVA, A. I.; et al. **The effect of maternal low-protein diet on the heart of adult offspring: role of mitochondria and oxidative stress.** Appl. Physiol. Nutr. Metab., v. 39, p. 880–887, 2014.

NASHED, M. G.; BALENKO, M. D.; SINGH, G. **Cancer-Induced Oxidative Stress and Pain.** Curr Pain Headache Rep., v. 18, 2014.

NEMET, D. et al. **Effects of a Multidisciplinary Childhood Obesity Treatment Intervention on Adipocytokines, Inflammatory and Growth Mediators.** Horm. Res. Paediatr., v. 79, n. 6, p. 325-332, 2013.

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

PASSOS, M. C. F. et al. **Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring.** Nutrition Research, v. 20, n. 2, p. 1603-1612, 2000.

POLIDORI, M. C. **Plasma levels of lipophilic antioxidants in very old patients with Type 2 diabetes.** Diabetes Metab. Res. Rev., v. 16, p. 15-19, 2000.

RANJBAR, K.; NAZEM, F.; NAZARI, A. **Effect of Exercise Training and L-arginine on Oxidative Stress and Left Ventricular Function in the Post-ischemic Failing Rat Heart.** Cardiovasc. Toxicol., v. 16, p. 122-129, 2016.

REEVES, P. G.; NILELSEN, F. H.; FAHEY, G. G. Jr. **Dietas purificadas AIN-93 para roedores laboratoriais: relatório final do comitê de escrita ad hoc do American Institute of Nutrition sobre a reformulação da dieta de roedores AIN-76A.** J. Nutr., v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. **Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay.** Methods Enzymol, v. 233, p. 357–363, 1994.

RHEE, S. G.; WOO, H. A. **Multiple Functions of Peroxiredoxins: Peroxidases, Sensors and Regulators of the Intracellular Messenger H₂O₂, and Protein Chaperones.** Antioxidants & Redox Signaling, v. 15, n. 3, p. 781-794, 2011.

RUIZ-RAMÍREZ, A. et al. **Cell Death and Heart Failure in Obesity: Role of Uncoupling Proteins.** Oxid. Med. Cell. Longev., 2016.

SÁ, F. G. et al. **Desnutrição e exercício físico no início da vida: Estudos de alguns parâmetros cardiovasculares em ratos adultos.** UFPE, Recife., 2011.

SALLAM, N.; LAHER, I. **Exercise Modulates Oxidative Stress and Inflammation in Aging and Cardiovascular Diseases.** Hindawi Publishing Corporation, 2016.

SAWAYA, A. L. **Desnutrição: consequências em longo prazo e efeitos da recuperação nutricional.** Estudos Avançados, v. 20, p. 147-158, 2006.

SAWAYA, A. L. et al. **Mild Stunting Is Associated with Higher Susceptibility to the Effects of High Fat Diets: Studies in a Shantytown Population in São Paulo, Brazil.** American Society for Nutritional Sciences, v. 128, n. 2, p. 415-420, 1998.

SAWAYA, A. L. et al. **Obesity and Malnutrition in a Shantytown Population in the City of São Paulo, Brazil.** Obesity Research, v. 3, n. 2, 1995.

SAWAYA, A. L. et al. **Os dois Brasis: quem são, onde estão e como vivem os pobres brasileiros.** Estudos Avançados, v. 17, p. 21-45, 2003.

SCHIMIDT, H. L. et al. **Memory deficits and oxidative stress in cerebral ischemia-reperfusion: neuroprotective role of physical exercise and green tea supplementation.** Neurobiol Learn. Mem., v. 114, p. 242-250, 2014.

SILVA, J. H. C.; ALVES, A. C. S.; FERNANDES, M. P. **Developmental Origins of Cardiometabolic Diseases: Role of the Maternal Diet.** Frontiers in Physiology, v. 7, 2016.

SIMMONS, R. A. **Developmental origins of diabetes: The role of oxidative stress.** Free Radical Biology & Medicine, v. 40, p. 917-922, 2006.

SOUSA, S. M. et al. **Oxidative injuries induced by maternal low-protein diet in female brainstem.** Nutritional Neuroscience, v. 11, p. 1-9, 2017.

SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. **Free Radicals in Medicine. II. Involvement in Human Disease.** Mayo Clin. Proc., v. 63, p. 390-408, 1988.

STRATTON, R. J.; GREEN, C. J.; MELIA, M. **Disease-related Malnutrition: An Evidence Based Approach to Treatment.** Wallingford, Oxon. CABI Publishing, 2003.

SUGAWARA, K. et al. **Effects of nutritional supplementation combined with low-intensity exercise in malnourished patients with COPD.** Respiratory Medicine, v. 104, p. 1883-1889, 2010.

TAO, L. et al. **Exercise for the heart: signaling pathways.** Oncotarget, v. 6, n. 25, p.20773-20784, 2015.

TEBAS, F.; et al. **Maternal low-protein diet-induced delayed reflex ontogeny is attenuated by moderate physical training during gestation in rats.** Br. J. Nutr., v. 107, p. 372-377, 2012.

UNICEF. **From the first hour of life.** 2016.

UNITED NATIONS. **World Population Prospects the 2012 Revision: Highlights and Advance Tables.** New York, 2013.

VARGHESE, J. F.; PATEL, R.; YADAV, U. C. S. **Novas informações sobre o estresse oxidativo induzido pela síndrome metabólica e a aterosclerose mediada por inflamação.** Curr. Cardiol. Rev., 2017.

VICKERS, M. H. **Developmental programming of the metabolic syndrome - critical windows for intervention.** World J. Diabetes, v. 2, n. 9, p. 137-148, 2011.

WHO. **World Health Statistics.** 2011.

WHO. **World Health Statistics.** 2014.

WU, G. et al. **Impacts of arginine nutrition on embryonic and fetal development in mammals.** Amino Acids, v. 45, p. 241-256, 2013.

ZANATTA A. et al. **Disturbance of redox homeostasis by ornithine and homocitrulline in rat cerebellum: a possible mechanism of cerebellar dysfunction in HHH syndrome.** Life Sci., v. 93, n. 4, p. 161-8, 2013.

ZANATTA, A. et al. **Neurochemical Evidence that the Metabolites Accumulating in 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Deficiency Induce Oxidative Damage in Cerebral Cortex of Young Rats.** Cell. Mol. Neurobiol., v. 33, p. 137-146, 2013.

ZONDERLAND, M. L. et al. **Different metabolic adaptation of heart and skeletal muscles to moderate-intensity treadmill training in the rat.** Eur. J. Appl. Physiol., v. 79, p. 391-396, 1999.

ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

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

Recife, 10 de julho de 2014.

Ofício nº 26/14

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Mariana Pinheiro Fernandes**
Centro Acadêmico de Vitória (CAV)
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.017809/2014-04

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, *"Avaliação do efeito da desnutrição protéica perinatal no metabolismo hepático e bioenergético mitocondrial de ratos treinados."*

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: Biotério; Animais: rato heterogênico;
Linhagem; Wistar; Idade; 50 dias; Sexo; macho e fêmea;
Peso; 70-80g; Número de animais previsto no protocolo: 44.

Atenciosamente,

M. Vasconcelos

111 Prof.ª Marcia Vasconcelos
112 Prof.ª Marcia Vasconcelos
113 Prof.ª Marcia Vasconcelos
114 Vice-Presidente do CEUA-UFPE
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

CCB: Integrar para desenvolver